

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS



⑪ Número de publicación: 2 541 311

51 Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 11.06.2007 E 07718492 (7)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 01.04.2015 EP 2035457

54) Título: Portador de vacuna

30) Prioridad:

09.06.2006 AT 9942006

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2015

73 Titular/es:

BIOMAY AG (100.0%)
LAZARETTGASSE 19 TOP 1
1090 WIEN, AT

72 Inventor/es:

VALENTA, RUDOLF;
FOCKE-TEJKL, MARGARETE;
LINHART, BIRGIT;
VRTALA, SUSANNE;
VALENT, PETER;
REININGER, RENATE;
SPITZAUER, SUSANNE;
SWOBODA, INES;
VAN HAGE, MARIANNE;
GRÖNLUND, HANS;
TINHOFER, JOHANNA;
WESTRITSCHNIG, KERSTIN Y
POPOW-KRAUPP, THERESIA

74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

E-S 2 541 311 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

Portador de vacuna

- 5 La presente invención se refiere a moléculas hipoalergénicas novedosas y a usos de las mismas.

La alergia tipo I es una enfermedad de hipersensibilidad mediada por IgE que afecta a casi el 25% de la población. Se basa en el reconocimiento de antígenos inocuos aéreos, de insectos, de veneno, de alérgenos alimentarios y de alérgenos por contacto derivados de fuentes de antígenos inocuos en sí mismos tales como proteínas de animales, 10 mohos, insectos y polen por inmunoglobulina E específica. La reticulación de anticuerpos IgE unidos a células efectoras conduce a la liberación de mediadores inflamatorios (por ejemplo, histamina, leucotrienos) y por tanto a los síntomas inmediatos de alergia (por ejemplo, rinoconjuntivitis, asma, dermatitis, anafilaxia). La activación de células T por medio de mecanismos dependientes de IgE así como independientes de IgE contribuye a la inflamación 15 alérgica crónica.

15 Probablemente, la única forma eficaz de tratamiento de la alergia es la inmunoterapia específica de alérgeno, que se basa en la administración repetida de cantidades crecientes de extractos de alérgenos para la mayoría de las fuentes. Numerosos estudios clínicos han documentado la eficacia clínica de la inmunoterapia por inyección y hay evidencias de varios mecanismos inmunológicos subyacentes a este tratamiento. Debido a la dificultad para 20 preparar extractos de alérgenos de alta calidad para determinadas fuentes de alérgenos y al hecho de que la administración de alérgenos a pacientes puede provocar efectos secundarios intensos, la inmunoterapia específica de alérgeno sólo puede recomendarse para determinados grupos de pacientes y manifestaciones patológicas. Es especialmente difícil tratar a pacientes con sensibilizaciones conjuntas frente a diversas fuentes de alérgenos 25 diferentes y a pacientes que padecen manifestaciones patológicas intensas tales como asma alérgica. El asma alérgica es una de las manifestaciones más vigorosas de la alergia, porque afecta intensamente a la calidad de la vida diaria, provoca una alta tasa de ingresos hospitalarios y puede manifestarse por sí misma en formas graves, potencialmente mortales, que requieren cuidados intensivos del paciente.

30 Los extractos de alérgenos preparados a partir de fuentes de alérgenos naturales están en bruto en la naturaleza y es imposible influir sobre la calidad y las cantidades de alérgenos individuales en tales preparaciones mediante medios técnicos. También contienen numerosos componentes no alergénicos indefinidos, y varios estudios recientes indican la mala calidad de tales extractos y documentan su gran heterogeneidad.

35 En la última década se ha avanzado mucho en el campo de la caracterización molecular de alérgenos usando tecnología de ADN recombinante. Un gran número de los alérgenos que provocan enfermedades más importantes se han caracterizado a nivel molecular, y se han producido alérgenos recombinantes que imitan la complejidad de epítopos de extractos de alérgenos naturales. Además, varios grupos de investigación han usado el conocimiento referente a estructuras de alérgenos para desarrollar nuevas vacunas definidas para la alergia. Se han usado ingeniería genética, química de péptidos sintéticos y conjugación de alérgenos con secuencias de ADN 40 inmunoestimulantes para reducir la actividad alergénica de las nuevas vacunas y por tanto la tasa de efectos secundarios inducidos por la terapia. En primer lugar se realizaron estudios clínicos prometedores con tales derivados de alérgenos. De manera interesante, resultó que aunque podía reducirse fuertemente o incluso eliminarse la reactividad frente a IgE de alérgenos recombinantes modificados por ingeniería genética y péptidos que 45 contenían epítopos de células T sintéticos derivados de alérgenos, estos derivados todavía podían inducir efectos secundarios sistémicos que aparecían varias horas tras la inyección. Por ejemplo, se notificó que péptidos de epítopos de células T del alérgeno de gato principal, Fel d 1, inducían asma e hiperreactividad bronquial varias horas tras la inyección intracutánea, y hay fuertes evidencias de que este efecto está mediado por células T y restringido por el MHC.

50 Estos resultados indican que la eliminación de la reactividad frente a IgE disminuye los efectos secundarios mediados por IgE ya que no se registraron reacciones inmediatas en el transcurso de estos estudios de inmunoterapia. Sin embargo, los epítopos de células T específicos de alérgenos que se han conservado en los derivados de alérgenos recombinantes así como en las mezclas de péptidos son responsables de los efectos secundarios tardíos (por ejemplo dermatitis atópica o muy problemática, manifestación cutánea alérgica crónica 55 mediada por células T). Los efectos secundarios provocados en el caso de derivados de alérgenos recombinantes eran relativamente leves y en el caso de las vacunas de péptidos de células T pueden superarse mediante una dosificación adecuada. Por tanto, ambos de los dos nuevos enfoques parecen muy prometedores para la inmunoterapia de rinoconjuntivitis alérgica pero pueden tener limitaciones en cuanto al tratamiento de formas intensas de asma alérgica, en las que la inducción de efectos secundarios tardíos en el pulmón puede ser muy problemática.

60 Con el fin de administrar y en consecuencia provocar una respuesta inmunitaria eficaz frente a péptidos, polipéptidos y proteínas, de manera habitual se usan adyuvantes y/o portadores. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund es uno de los adyuvantes más potentes disponibles. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios, su uso no está aprobado para seres humanos. Por tanto, existe una necesidad de composiciones de vacuna que puedan inducir fuertes respuestas inmunitarias frente a péptidos y polipéptidos derivados de alérgenos y evidentemente de otros

- antígenos evitando el uso de adyuvante completo de Freund. Además, aunque se ha usado BSA satisfactoriamente como portador en modelos animales, puede no ser apropiado para su uso en composiciones de vacuna para seres humanos debido al riesgo de reacciones adversas tales como el riesgo de transmitir enfermedad priónica (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante). Un desafío adicional para el desarrollo de una vacuna eficaz frente a alérgenos es la necesidad de una respuesta inmunitaria que pueda disminuir rápidamente los alérgenos en un individuo o animal. Por tanto, se necesitan altas concentraciones de anticuerpos específicos de alérgenos en la sangre, que son principalmente del subtipo IgG. En superficies mucosas, los anticuerpos IgA son el subtipo principal.
- 5 La toxina del cólera, una proteína portadora conocida en la técnica, también se usa de manera habitual como adyuvante, eliminando la necesidad de adyuvante completo de Freund en una composición de vacuna. Sin embargo, la toxina del cólera aumenta los niveles de anticuerpos IgE totales y específicos y conduce a reacciones inflamatorias asociadas con IgE.
- 10 Debido a los efectos secundarios provocados por la mayoría de las proteínas portadoras usadas para la vacunación, existe una necesidad de sistemas portadores que puedan estimular respuestas inmunitarias frente a alérgenos u otros antígenos, sin usar adyuvantes tóxicos, sin usar proteínas portadoras mal toleradas y, en determinadas situaciones, sin estimulación de respuestas inmunitarias posiblemente patológicas. Pueden usarse sistemas portadores novedosos que cumplen estas especificaciones para la formación de conjugados y composiciones novedosas adecuados para el tratamiento o la prevención de enfermedades tales como enfermedades alérgicas.
- 15 20 En Bohle B. *et al.* (J. Immunol. 172 (11) (2004): 6642-6648) se describe una proteína de fusión recombinante que comprende un resto de proteína de la capa S y un resto de Bet v 1. Esta molécula comprende la proteína Bet v 1 hiperalergénica nativa.
- 25 El documento WO 2004/004761 se refiere a partículas de tipo virus que se fusionan con un inmunógeno y que pueden usarse para la inmunización.
- 30 En el documento WO 2004/003143 se da a conocer el uso de proteínas de fusión que comprenden una partícula de tipo virus y una molécula hiperalergénica como inmunógeno para la vacunación.
- 35 40 El documento WO 03/072601 A se refiere a un método para producir alérgenos hipoalergénicos aplicando un esquema de purificación específico. El alérgeno hipoalergénico según este documento puede ser Bet v1 recombinante que puede comprender modificaciones adicionales (por ejemplo sustituciones, delecciones, etc., de aminoácidos) y puede fusionarse con otras proteínas o péptidos.
- 45 El documento WO 02/40676 A se refiere a alérgenos recombinantes que comprenden múltiples mutaciones y que muestran una afinidad de unión a IgE reducida. Las propiedades hipoalergénicas de Bet v1 pueden lograrse introduciendo mutaciones en la secuencia de Bet v1. Pueden fusionarse Bet v1 de tipo natural y Bet v1 mutado con una molécula adicional de una fuente no alergénica que puede ser un resto de proteína que se une a maltosa.
- 50 55 El documento WO 2006/058359 A se refiere a un método para producir proteínas hipoalergénicas dividiendo una proteína de tipo natural en dos partes y volviendo a unir los fragmentos resultantes en orientación inversa. Para la purificación de proteínas se fusiona la molécula hipoalergénica según este documento con una cola de his.
- 60 65 Breitweiser *et al.*, Protein Eng.; 15(3) (2002): 243-249, describen una proteína de fusión de alérgeno del polen de abedul principal-superficie de célula bacteriana (capa S) recombinante.
- 70 En Elfman *et al.*, Int. Arch. Allergy Immunol., 117(3) (1998):167-173, se describen proteínas de fusión que comprenden un resto de GST fusionado con fragmentos del alérgeno Lep d2 que muestran afinidad de unión a IgE reducida.
- 75 Bauer *et al.*, J. Allergy and Clin. Immunol., 118 (2006):269-276, se refieren a la generación de vacunas de ADN hipoalergénicas que codifican para el alérgeno del polen de abedul principal Bet v1 unido de manera estable a ubiquitina que es un marcador bien conocido en una célula eucariota y da la señal para degradar el polipéptido marcado.
- 80 85 El documento WO 2004/092210 A se refiere a proteínas de fusión del polipéptido Fve (que comprende actividad inmunomoduladora) y un alérgeno como pareja de fusión. Este documento da a conocer péptidos hipoalergénicos derivados de alérgeno del polen de gramíneas principal Phl p 1, que se acoplan a la proteína portadora no alergénica KLH.
- 90 En el documento WO 02/12503 A se dan a conocer proteínas de fusión que comprenden entre otras cosas moléculas hipoalergénicas.
- 95 100 El documento WO 2006/008018 A da a conocer proteínas de fusión con cola de his que comprenden moléculas hipoalergénicas.

En Gonzalez *et al.*, Mol. Immunol, 43(6) (2006):570-578, se dan a conocer proteínas de fusión de GST que consisten en un resto de GST y péptidos derivados del alérgeno Ole e1.

5 En el documento WO 2005/085278 A se dan a conocer proteínas de fusión que comprenden alérgenos hipoalergénicos fusionados con otro alérgeno.

En el documento US 2006/088549 se dan a conocer composiciones inmunogénicas que comprenden un rinovirus humano químérico, que consisten en una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de cápside de rinovirus humano fusionada con una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica para un antígeno.

10 En el documento WO 02/04007 se da a conocer usar proteínas de cápside viral recombinantes como vacunas, agentes terapéuticos y agentes de diagnóstico.

15 El documento EP 0 358 485 se refiere a péptidos antigenicos derivados de proteínas de rinovirus humano que pueden emplearse en vacunación.

20 Un objeto de la presente invención es proporcionar medicamentos y portadores que superen los inconvenientes mencionados anteriormente y permitan una vacunación con alérgenos con efectos secundarios reducidos.

25 Por tanto, la presente invención se refiere a una proteína hipoalergénica para su uso en el tratamiento o la prevención de una alergia en un ser humano o animal que consiste en al menos una molécula hipoalergénica derivada de un alérgeno, que se fusiona con al menos una segunda proteína no alergénica, en la que la al menos una molécula hipoalergénica derivada de un alérgeno muestra una capacidad de unión a IgE reducida en al menos el 50% y una reactividad frente a células T reducida en al menos el 30% en comparación con el alérgeno de tipo natural y en la que la al menos una segunda proteína es una proteína viral.

30 Con el fin de provocar una respuesta inmunitaria potenciada frente a una molécula, en particular una molécula hipoalergénica según la presente invención, dicha molécula se fusiona (mediante modificación por ingeniería genética) con un portador.

35 La segunda proteína (el "portador" o la "proteína portadora") que va a fusionarse con una molécula hipoalergénica de la invención no se deriva de un alérgeno ("no alergénica"). Sin embargo, la proteína portadora usada en la presente invención puede mostrar reactividad frente a células T y/o provocar una respuesta inmunitaria frente a sí misma y la molécula hipoalergénica fusionada o conjugada con la misma cuando se administra a un organismo humano o animal. Por consiguiente, si la proteína portadora se deriva de un patógeno (por ejemplo virus, bacteria etc.), se producen anticuerpos (protectores) dirigidos contra dicho portador y patógenos.

40 Tal como se usa en el presente documento, "proteína hipoalergénica" significa una proteína/polipéptido de fusión de un portador de una fuente no alergénica con una molécula hipoalergénica. Además, también se pretende que una "proteína hipoalergénica" sea un producto de conjugación (por ejemplo acoplamiento químico, adsorción) de un portador con una molécula hipoalergénica.

45 "Hipoalergénico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas con potencial alergénico reducido. Tales moléculas tienen una capacidad reducida para provocar reacciones alérgicas en un individuo en comparación con la proteína de tipo natural de la que se derivan estas moléculas.

50 La al menos una molécula hipoalergénica derivada de un alérgeno y fusionada con una segunda proteína está preferiblemente truncada en el extremo C-terminal y/o N-terminal. "Truncamiento C-terminal y/o N-terminal", tal como se usa en el presente documento, significa que los residuos de aminoácido o bien del extremo N-terminal o bien del extremo C-terminal o bien de los extremos tanto N-terminal como C-terminal del alérgeno de tipo natural se eliminan mediante delección de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30 residuos de aminoácido.

55 Las moléculas hipoalergénicas, es decir péptidos/polipéptidos, comprenden preferiblemente de 10 a 50 aminoácidos, más preferiblemente de 15 a 40 aminoácidos, en particular 20-30 aminoácidos y muestran reactividad frente a IgE reducida. Estas moléculas se diseñan para excluir epítópos de células T que pueden provocar efectos secundarios mediados por células T. Los epítópos de células T y las moléculas que muestran respuesta de células T reducida pueden determinarse e identificarse mediante métodos conocidos por el experto en la técnica (por ejemplo, Bercovici N. *et al.* Clin Diagn Lab Immunol. (2000) 7:859-864).

60 Se encontró que es posible diseñar vacunas de péptidos derivadas de alérgenos como los alérgenos del polen de gramíneas principales, por ejemplo, Phl p 1, y para el alérgeno del polen de abedul principal, Bet v 1, usando péptidos expuestos en la superficie. Los datos obtenidos muestran que tales vacunas de péptidos pueden producirse para cualquier alérgeno cuya estructura primaria se conozca según el mapeo de epítópos de IgE, datos de estructura tridimensional o predicción asistida por ordenador de dominios expuestos en la superficie. Sin embargo, la selección de péptidos adecuados que pueden usarse para la vacunación sigue siendo crucial, porque no todos los

péptidos identificados con estos métodos pueden emplearse en vacunación. Los péptidos usados de manera adecuada para fines de vacunación muestran una capacidad de unión a IgE reducida y, con el fin de reducir o evitar efectos secundarios tardíos, muestran reactividad frente a células T reducida.

- 5 El término "derivado de un alérgeno", tal como se usa en el presente documento, significa que las moléculas hipoalergénicas según la presente invención se obtienen directamente de un alérgeno mediante fragmentación o truncamiento. La secuencia de aminoácidos de las moléculas hipoalergénicas de la presente invención son preferiblemente idénticas en al menos el 80%, más preferiblemente idénticas en al menos el 90%, lo más preferiblemente idénticas en al menos el 95%, en particular idénticas al 100%, al tramo de secuencia de amino del alérgeno de tipo natural del que se deriva la molécula hipoalergénica. Sin embargo, las moléculas que no son idénticas al 100% a los fragmentos de alérgenos de tipo natural deben poder unirse con una fuerza de al menos el 60%, preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, lo más preferiblemente al menos el 90%, a un anticuerpo o a anticuerpos, preferiblemente a anticuerpos IgG, que se dirigen contra dichos fragmentos de alérgenos de tipo natural.
- 10 15 El grado de identidad de una primera secuencia de aminoácidos con respecto a un segundo aminoácido puede determinarse mediante una comparación directa entre ambas secuencias de aminoácidos usando determinados algoritmos. Tales algoritmos se incorporan, por ejemplo, en diversos programas informáticos (por ejemplo "BLAST 2 SEQUENCES (blastp)" (Tatusova *et al.* (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-25; Corpet F, Nucl. Acids Res. (1988) 20 16:10881-10890).
- 20 Las moléculas truncadas según la presente invención pueden definirse como que son partes del alérgeno completo que inducen menos activación de células T específicas de alérgenos que el alérgeno de tipo natural completo (una reducción de al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, lo más preferiblemente al menos el 70%), 25 muestran una actividad alergénica reducida en más del 50% (preferiblemente más del 70%) según se evalúa mediante ensayos de unión a IgE y capacidad para inducir activación celular mediada por IgE y cuando se acoplan a un portador tal como se describe inducen anticuerpos IgG que inhiben la unión de IgE polyclonal de pacientes alérgicos al alérgeno de tipo natural completo.
- 30 35 Los péptidos deben contener secuencias de los alérgenos para evitar solapamientos con los mimótopos. Sin embargo, los mimótopos, que son pequeños agentes miméticos peptídicos (de menos de 15 aminoácidos) de trozos de antígenos y se obtienen a partir de bibliotecas de péptidos al azar, no representan moléculas derivadas de alérgenos originales tal como se define en el presente documento. No pueden usarse según la invención porque son demasiado pequeños como para inducir una respuesta de IgG de bloqueo robusta.
- 40 45 Las moléculas hipoalergénicas según la presente invención pueden obtenerse mediante métodos recombinantes o síntesis química. De manera alternativa, evidentemente también es posible obtener las moléculas mediante escisión enzimática o química del alérgeno de tipo natural o un polipéptido/proteína que alberga la molécula de interés.
- 50 La molécula hipoalergénica puede comprender preferiblemente al menos dos moléculas alergénicas truncadas derivadas de al menos un alérgeno, en la que el orden de los fragmentos de alérgenos truncados difiere del orden de los fragmentos en el alérgeno de tipo natural si las al menos dos moléculas se derivan del mismo alérgeno.
- 55 60 La molécula hipoalergénica según la presente invención puede comprender una o más (preferiblemente al menos 2, más preferiblemente al menos 3) moléculas hipoalergénicas tal como se define en el presente documento, dando por tanto como resultado una proteína de fusión. Las moléculas hipoalergénicas individuales de la proteína de fusión, que, evidentemente, también carece de la capacidad de unión a IgE y carece de epítopos de células T, pueden derivarse de alérgenos del mismo origen y/o de diferentes orígenes. Si las moléculas se derivan del mismo alérgeno, el orden en la proteína de fusión hipoalergénica no debe ser idéntico al orden en el alérgeno de tipo natural (esto impide la reconstitución y formación de sitios de unión a IgE) (véase, por ejemplo, el documento WO2004/065414, Linhart B y Valenta R (Int Arch Allergy Immunol. (2004) 134:324-31)).
- 65 Según una realización preferida de la presente invención la al menos una molécula hipoalergénica se fusiona con el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal de dicha al menos una segunda proteína o fragmento de la misma.
- 55 60 El alérgeno o los fragmentos del mismo pueden conjugarse químicamente, por ejemplo, o mediante métodos recombinantes entre sí. Si el alérgeno o fragmento del mismo se conjuga químicamente con un portador, dicho alérgeno o fragmento debe dotarse de un residuo de cisteína terminal (dando como resultado un grupo sulfhidrilo libre). A dicho residuo de cisteína terminal (N o C-terminal) se le puede conjugar cualquier proteína portadora activada por maleimida, creando así un complejo inmunógeno/portador. Si el alérgeno o fragmento del mismo no tiene un grupo sulfhidrilo en un extremo terminal, puede emplearse química de EDC (clorhidrato de 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) con el fin de acoplar aminas (lisina) o ácidos carboxílicos (ácido glutámico, aspártico o 5'-fosfato) a la proteína portadora.
- 65 Si la molécula hipoalergénica se fusiona con el extremo N o C-terminal del portador, se emplean métodos recombinantes.

La al menos una segunda proteína es una proteína viral, en particular ARN o ADN viral.

La al menos una segunda proteína ("portador") puede ser de cualquiera de los orígenes mencionados anteriormente.

5 Sin embargo, en particular se prefiere usar proteínas que provocan una respuesta inmunitaria frente a la propia proteína y la molécula hipoalergénica fusionada o conjugada con la misma. Debido a la inducción de formación de anticuerpos (protectores) también dirigidos contra la al menos una segunda proteína, la proteína hipoalergénica según la presente invención también puede emplearse como vacuna para dicha segunda proteína y su fuente de origen (por ejemplo virus).

10 La proteína viral según la presente invención es preferiblemente una proteína de cápside.

Las proteínas de cápside virales son especialmente adecuadas porque inducen actividad antiviral, provocan la formación de anticuerpos que bloquean la adhesión de virus, por ejemplo rinovirus, a células epiteliales, muestran 15 una actividad inmunomoduladora hacia a una respuesta de Th1, aumentan la inmunogenicidad del péptido (es decir, más anticuerpos anti-péptido y por tanto niveles más altos de anticuerpos IgG protectores), son adecuadas y están demostradas para la vacunación profiláctica (vacunación de virus) y son seguras, cuando se usan proteínas de cápside frente a las cuales están continuamente expuestos los seres humanos (por ejemplo rinovirus).

20 Según otra realización preferida de la presente invención la al menos una proteína de cápside viral se deriva de un virus patógeno humano, preferiblemente un virus de la familia de picornavirus.

El virus de la familia de picornavirus es preferiblemente del género de rinovirus, preferiblemente de la especie de 25 rinovirus humanos, en particular rinovirus humano 89 y 14. La proteína de cápside puede ser VP1, VP2, VP3 y/o VP4.

El alérgeno que va a fusionarse con una proteína de cápside viral se selecciona preferiblemente del grupo que 30 consiste en alérgenos del polen de abedul principales, en particular Bet v 1 y Bet v 4, alérgenos del polen de hierba timotea principales, en particular Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 y Phl p 7, alérgenos de ácaro del polvo doméstico principales, en particular Der p 1 y Der p 2, alérgeno de gato principal Fel d 1, alérgenos de abeja principales, alérgenos de avispa principales, profilinas, especialmente Phl p 12, y alérgenos de ácaro de almacenamiento, especialmente Lep d 2.

Otros alérgenos adecuados que van a usarse según la presente invención pueden derivarse de la siguiente tabla.

35 ALÉRGENOS

Nombre de especie	Nombre de alérgeno	ID bioquím. o obsoleto	o nombre	PM	ADNc (C) o proteína (P)	Referencia, n.º de reg.
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> , ambrosía corta						
	Amb a 1	antígeno E		8	C	8, 20
	Amb a 2	antígeno K		38	C	8, 21
	Amb a 3	Ra3		11	C	22
	Amb a 5	Ra5		5	C	11, 23
	Amb a 6	Ra6		10	C	24, 25
	Amb a 7	Ra7		12	P	26
<i>Ambrosia trifida</i> , ambrosía grande						
	Amb t 5	Ra5G		4,4	C	9, 10, 27
<i>Artemisia vulgaris</i> , artemisa						
	Art v 1			27-29	C	28
	Art v 2			35	P	28A
	Art v 3	proteína de transferencia de lípidos		12	P	53
	Art v 4	profilina		14	C	29
<i>Helianthus annuus</i> , girasol						
	Hel a 1			34		29A
	Hel a 2	profilina		15,7	C	Y15210
<i>Mercurialis annua</i>						
	Mer a 1	profilina		14-15	C	Y13271
<i>Caryophyllales Chenopodium album</i> , cenizo, bledo						
ceniglo blanco	Che a 1			17	C	AY049012, 29B
	Che a 2	profilina		14	C	AY082337
	Che a 3		polcalcina	10	C	AY082338

<i>Salsola kali</i> , caramillo	Sal k 1		43	P	29C
<i>Rosales Humulus japonicus</i> , lúpulo japonés	Hum j 4w		C		AY335187
<i>Parietaria judaica</i>					véase la lista de isoalérgenos
	Par j 1	proteína de transferencia de lípidos 1	15	C	véase la lista de isoalérgenos
	Par j 2	proteína de transferencia de lípidos 2		C	véase la lista de isoalérgenos
	Par j 3	profilina		C	véase la lista de isoalérgenos
<i>Parietaria officinalis</i>	Par o 1	proteína de transferencia de lípidos	15		29D
B. Gramíneas					
<i>Poales</i>					
<i>Cynodon dactylon</i> , césped Bermuda	Cyn d 1		32	C	30, S83343
	Cyn d 7			C	31, X91256
	Cyn d 12	profilina	14	C	31a, Y08390
	Cyn d 15		9	C	AF517686
	Cyn d 22w	enolasa			datos pendientes
	Cyn d 23	Cyn d 14	9	C	AF517685
	Cyn d 24	p. relacionada con la patogénesis	21	P	pendiente
<i>Dactylis glomerata</i> , hierba mazorquera	Dac g 1	AgDg1	32	P	32
	Dac g 2		11	C	33, S45354
	Dac g 3			C	33A, U25343
	Dac g 5		31	P	34
<i>Festuca pratensis</i> , festuca de los prados	Fes p 4w		60	-	
<i>Holcus lanatus</i> , heno blanco	Hol l 1			C	Z27084
<i>Lolium perenne</i> , ballico	Lol p 1	grupo I	27	C	35, 36
	Lol p 2	grupo II	11	P	37, X73363
	Lol p 3	grupo III	11	P	38
	Lol p 5	Lol p IX, Lol p Ib	31/35	C	34, 39
	Lol p 11	hom: inhibidor de tripsina	16		39A
<i>Phalaris aquatica</i> , alpiste	Pha a 1			C	40, S80654
<i>Phleum pratense</i> , timotea	Phl p 1		27	C	X78813
	Phl p 2			C	X75925, 41
	Phl p 4			P	41A
	Phl p 5	Ag25	32	C	42
	Phl p 6			C	Z27082, 43
	Phl p 11	hom. de inhibidor de tripsina	20	C	AF521563, 43A
	Phl p 12	profilina		C	X77583, 44
	Phl p 13	poligalacturonasa	55-60	C	AJ238848
<i>Poa pratensis</i> , pasto azul de Kentucky	Poa p 1	grupo I	33	P	46
	Poa p 5		31/34	C	34, 47
<i>Sorghum halepense</i> , pasto de Johnson	Sor h 1			C	48
C. Árboles					
<i>Arecales</i>					
<i>Phoenix dactylifera</i> , palmera datilera	Pho d 2	profilina	14,3	C	Asturias p.c.
<i>Fagales</i>					

<i>Alnus glutinosa</i> , aliso					
	Aln g 1		17	C	S50892
<i>Betula verrucosa</i> , abedul					véase la lista de isoalérgenos
	Bet v 1		17	C	M65179
	Bet v 2	profilina	15	C	X79267
	Bet v 3			C	X87153,
	Bet v 4		8	C	S54819
	Bet v 6	h: isoflavona reductasa	33,5	C	véase la lista de isoalérgenos
	Bet v 7	ciclofilina	18	P	P81531
<i>Carpinus betulus</i> , carpe					véase la lista de isoalérgenos
	Car b 1		17	C	
<i>Castanea sativa</i> , castaño					
	Cas s 1		22	P	52
	Cas s 5	quitinasa			
	Cas s 8	proteína de transferencia de lípidos	9,7	P	53
<i>Corylus avellana</i> , avellano					véase la lista de isoalérgenos
	Cor a 1		17	C	
	Cor a 2	profilina	14	C	
	Cor a 8	proteína de transferencia de lípidos	9	C	
	Cor a 9	proteína de tipo globulina 11S	40/?	C	Beyer p.c.
	Cor a 10	prot. de unión luminal	70	C	AJ295617
	Cor a 11	prot. de tipo vicilina 7S	48	C	AF441864
<i>Quercus alba</i> , roble blanco					
	Que a 1		17	P	54
<i>Lamiales</i>					
<i>Oleaceae</i>					
<i>Fraxinus excelsior</i> , fresno					
	Fra e 1		20	P	58A, AF526295
<i>Ligustrum vulgare</i> , aligustre					
	Lig v 1		20	P	58A
<i>Olea europaea</i> , olivo					
	Ole e 1		16	C	59, 60
	Ole e 2	profilina	15-18	C	60A
	Ole e 3		9,2		60B
	Ole e 4		32	P	P80741
	Ole e 5	superóxido dismutasa	16	P	P80740
	Ole e 6		10	C	60C, U86342
	Ole e 7		?	P	60D, P81430
	Ole e 8	proteína de unión a Ca ²⁺	21	C	60E, AF078679
	Ole e 9	beta-1,3-glucanasa	46	C	AF249675
	Ole e 10	hom. de glicosil hidrolasa	11	C	60F, AY082335
<i>Syringa vulgaris</i> , lila					
	Syr v 1		20	P	58A
<i>Plantaginaceae</i>					
<i>Plantago lanceolata</i> , plátano inglés					
	Pla l 1		18	P	P842242
<i>Pinaceae</i>					
<i>Cryptomeria sugi japonica</i>					
	Cry j 1		41-45	C	55, 56
	Cry j 2			C	D29772
<i>Cupressus</i> cypress arisonica					

<i>Cupressus sempervirens</i> , ciprés común	Cup a 1	43	C	A1243570
				véase la lista de isoalérgenos ref. pendiente
<i>Juniperus ashei</i> , cedro de montaña	Cup s 1	43	C	
	Cup s 3w	34	C	
<i>Juniperus ashei</i> , cedro de montaña	Jun a 1	43	P	P81294
	Jun a 2		C	57A, AJ404653
	Jun a 3	30	P	57B, P81295
<i>Juniperus oxycedrus</i> , enebro rojo				57C, AF031471
	Jun o 4 hom: calmodulina	29	C	
<i>Juniperus sabinaoides</i> , cedro de montaña	Jun s 1	50	P	58
<i>Juniperus virginiana</i> , cedro rojo oriental	Jun v 1	43	P	P81825, 58B
<i>Platanaceae</i> , <i>Platanus acerifolia</i> , plátano de Londres	Pla a 1	18	P	P82817
	Pla a 2	43	P	P82967
	Pla a 3 proteína de transferencia de lípidos	10	P	Iris p.c.
D. Ácaros				
<i>Acarus siro</i> , ácaro				
<i>Blomia tropicalis</i> , ácaro	Aca s 13 prot. de unión a ácidos grasos de artrópodos	14*	C	AJ006774
	Blo t 1 cisteína proteasa	39	C	AF277840
	Blo t 3 tripsina	24*	C	Cheong p.c.
	Blo t 4 alfa-amilasa	56	C	Cheong p.c.
	Blo t 5		C	U59102
	Blo t 6 quimotripsina	25	C	Cheong p.c.
	Blo t 10 tropomiosina	33	C	61 AF525465,
	Blo t 11 paramiosina	110	C	61A
	Blo t 12 Bt11a		C	U27479
	Bt6, prot. de unión a ácidos grasos			
	Blo t 13		C	U58106
	Blo t 19 hom. de pep. antimicrobiano	7,2	C	Cheong p.c.
<i>Dermatophagoides farinae</i> , ácaro del polvo doméstico americano	Der f 1 cisteína proteasa	25	C	69
				70, 70A, véase la lista de isoalérgenos
	Der f 2	14	C	63
	Der f 3 tripsina	30	C	SW:Q26456,
				71
	Der f 7			72
	Der f 10 tropomiosina		C	72A
	Der f 11 paramiosina	98	C	D17686
	Der f 14 mag3, apolipoforina		C	AF178772
	Der f 15 98k, quitinasa	98	C	
	Der f 16 gelsolina/villina	53	C	71A
	Der f 17 proteína EF de unión a Ca	53	C	71A
	Der f 18w 60k, quitinasa	60	C	Weber p.c.
<i>Dermatophagoides microceras</i> , ácaro del polvo doméstico				
	Der m 1 cisteína proteasa	25	P	68
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> , ácaro del polvo doméstico europeo				62, véase la lista de isoalérgenos
	Der p 1 antígeno proteasa P1, cisteína	25	C	62A-C, véase la lista de isoalérgenos
				63
	Der p 2	14	C	
	Der p 3 tripsina	2&/30	C	
	Der p 4 amilasa	60	P	64
	Der p 5	14	C	65

Der p 6	quimotripsina	25	P	66
Der p 7		22/28	C	67
Der p 8	glutatión transferasa		C	67A
Der p 9	pro. de serina colagenolítica		P	67B
Der p 10	tropomiosina	36	C	Y14906
Der p 14	prot. de tipo apolipoforina		C	Epton p.c.
<i>Euroglyphus maynei</i> , ácaro				véase la lista de isoalérgenos
Eur m 2			C	
Eur m 14	apolipoforina	177	C	AF149827
<i>Glycyphagus domesticus</i> , ácaro de almacenamiento				72B, véase la lista de isoalérgenos
Gly d 2			C	
<i>Lepidoglyphus destructor</i> , ácaro de almacenamiento				73, 74, 74A, véase la lista de isoalérgenos
Lep d 2	Lep d 1	15	C	
Lep-d 5			C	75, AJ250278
Lep d 7			C	75, AJ271058
Lep d 10	tropomiosina		C	75A, AJ250096
Lep d 13			C	75, AJ250279
<i>Tyrophagus putrescentiae</i> , ácaro de almacenamiento				
Tyr p 2			C	75B, Y12690
E. Animales				
<i>Bos domesticus</i> , ganado doméstico				76, véase la lista de isoalérgenos
Bos d 2	Ag3, lipocalina	20	C	
(véanse también los alimentos)				
Bos d 3	hom. de S100 de unión a Ca	11	C	L39834
Bos d 4	alfa-lactoalbúmina	14,2	C	M18780
Bos d 5	beta-lactoglobulina	18,3	C	X14712
Bos d 6	albúmina sérica	67	C	M73993
Bos d 7	inmunoglobulina	160		77
Bos d 8	caseínas	20-30		77
<i>Canis familiaris</i> (<i>Canis domesticus</i>), perro				
Can f 1		25	C	78, 79
Can f 2		27	C	78, 79
Can f 3	albúmina		C	S72946
Can f 4		18	P	A59491
<i>Equus caballus</i> , caballo doméstico				
Equ c 1	lipocalina	25	C	U70823
Equ c 2	lipocalina	18,5	P	79A, 79B
Equ c 3	Ag3 – albúmina	67	C	79C, X74045
Equ c 4		17	P	79D
Equ c 5	AgX	17	P	Goubran
<i>Felis domesticus</i> , gato (saliva)				Botros p.c.
Fel d 1	cat-1	38	C	15
Fel d 2	albúmina		C	79E, X84842
Fel d 3	cistatina	11	C	79F, AF238996
Fel d 4	lipocalina	22	C	AY497902
Fel d 5w	inmunoglobulina A	400		Adedoyin p.c.
		800-		
Fel d 6w	inmunoglobulina M	1000		Adedoyin p.c.
Fel d 7w	inmunoglobulina G	150		Adedoyin p.c.
<i>Cavia porcellus</i> , cobaya				
Cav p 1	homólogo de lipocalina	20	P	SW:P83507,
Cav p 2		17	P	80
<i>Mus musculus</i> , ratón (orina)				SW:P83508
Mus m 1	MUP	19	C	81, 81A
<i>Rattus norvegicus</i> , rata (orina)				

	Rat n 1		17	C	82, 83
<i>F. Hongos (mohos)</i>					
1. <i>Ascomycota</i>					
1.1 <i>Dothideales</i>					
<i>Alternaria alternata</i>					
Alt a 1		28	C	U82633	
Alt a 2		25	C	83A, U62442	
				U87807,	
Alt a 3	prot. de choque térmico	70	C	U87808	
Alt a 4	prot. disulfidoisomerasa	57	C	X84217	
				X78222,	
Alt a 6	prot. de ácido ribosómico P2	11	C	U87806	
Alt a 7	proteína YCP4	22	C	X78225	
				X78227,	
Alt a 10	aldehído deshidrogenasa	53	C	P42041	
Alt a 11	enolasa	45	C	U82437	
Alt a 12	prot. de ácido ribosómico P1	11	C	X84216	
<i>Cladosporium herbarum</i>					
Cla h 1		13		838, 83C	
Cla h 2		23		83B, 83C	
Cla h 3	aldehído deshidrogenasa	53	C	X78228	
Cla h 4	prot. de ácido ribosómico P2	11	C	X78223	
Cla h 5	proteína YCP4	22	C	X78224	
Cla h 6	enolasa	46	C	X78226	
Cla h 12	prot. de ácido ribosómico P1	11	C	X85180	
1.2 <i>Eurotiales</i>					
<i>Aspergillus flavus</i>					
Asp f1 13	serina proteasa alcalina	34		84	
<i>Aspergillus fumigatus</i>					
Asp f 1		18	C	M83781,	
Asp f 2		37	C	S39330	
Asp f 3	proteína peroxisomal	19	C	U56938	
Asp f 4		30	C	U20722	
Asp f 5	metaloproteasa	40	C	AJ001732	
Asp f 6 Mn	superóxido dismut. 26.5		C	Z30424	
Asp f 7		12	C	U53561	
Asp f 8	prot. ribosómica P2	11	C	AJ223315	
Asp f 9		34	C	AJ224333	
Asp f 10	proteasa aspártica	34	C	AJ223327	
Asp f 11	peptidil-prolil isomerasa	24		X85092	
Asp f 12	prot. de choque térmico P90	90	C	84A	
Asp f 13	serina proteasa alcalina	34		85	
Asp f 15		16	C	84B	
Asp f 16		43	C	AJ002026	
Asp f 17			C	g3643813	
Asp f 18	serina proteasa vacuolar	34		AJ224865	
Asp f 22w	enolasa	46	C	84C	
				AF284645	
				85A,	
Asp f 23	proteína ribosómica L3	44	C	AF464911	
<i>Aspergillus niger</i>					
Asp n 14	beta-xilosidasa	105	C	AF108944	
Asp n 18	serina proteasa vacuolar	34	C	84B	
		66-			
Asp n 25	3-fitasa B	100	C	85B, P34754	
Asp n ?		85	C	Z84377	
<i>Aspergillus oryzae</i>					
Asp o 13	serina proteasa alcalina	34	C	X17561	
				D00434,	
Asp o 21	TAKA-amilasa A	53	C	M33218	
<i>Penicillium brevicompactum</i>					
Pen b 13	serina proteasa alcalina	33		86A	
<i>Penicillium chrysogenum</i> (antiguamente <i>P. notatum</i>)					
Pen ch 13	serina proteasa alcalina	34		87	
Pen ch 18	serina proteasa vacuolar	32		87	
Pen ch 20	N-acetilglucosaminidasa	68		87A	

<i>Penicillium citrinum</i>					
	Pen c 3	prot. de mem. peroxisómica	18		86B
	Pen c 13	serina proteasa alcalina	33		86A
	Pen c 19	prot. de choque térmico P70	70	C	U64207
	Pen c 22w	enolasa	46	C	AF254643
	Pen c 24	factor de elongación 1 beta		C	AY363911
<i>Penicillium oxalicum</i>	Pen o 18	serina proteasa vacuolar	34		87B
1.3 <i>Hypocreales</i>					
<i>Fusarium culmorum</i>	Fus c 1	prot. ribosómica P2	11*	C	AY077706
	Fus c 2	prot. de tipo tioredoxina.	13*	C	AY077707
1.4 <i>Oryzales</i>					
<i>Trichophyton rubrum</i>	Tri r 2			C	88
	Tri r 4	serina proteasa		C	88
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tri t 1		30	P	88A
	Tri t 4	serina proteasa	83	C	88
1.5 <i>Saccharomycetales</i>					
<i>Candida albicans</i>	Cand a 1		40	C	89
	Cand a 3	proteína peroxisómica	29	C	AY136739
<i>Candida boidinii</i>	Cand b	2	20	C	J04984, J04985
2. <i>Basidiomycotina</i>					
2.1 <i>Hymenomycetes</i>					
<i>Psilocybe cubensis</i>	Psi c 1				
	Psi c 2	ciclofilina	16		89A
<i>Coprinus comatus</i> , matacandil	Cop c 1	proteína de cremallera de			
	Cop c 2	leucina	11	C	AJ132235
	Cop c 3				AJ242791
	Cop c 5				AJ242792
	Cop c 7				AJ242793
					AJ242794
2.2 <i>Urediniomycetes</i>					
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Rho m 1	enolasa	47	C	89B
	Rho m 2	serina proteasa vacuolar	31	C	AY547285
2.3 <i>Ustilaginomycetes</i>					
<i>Malassezia furfur</i>	Mala f 2	MF1, proteína de membrana			
		peroxisómica	21	C	AB011804, 90
	Mala f 3	MF2, proteína de membrana			
		peroxisómica	20	C	AB011805, 90
		malato deshidrogenasa			AF084828,
	Mala f 4	mitocondrial	35	C	90A
<i>Malassezia sympodialis</i>	Mala s 1				
	Mala s 5		18*	C	X96486, 91
	Mala s 6		17*	C	AJ011955
	Mala s 7			C	AJ011956
	Mala s 8		19*	C	AJ011957, 91A
	Mala s 9		37*	C	AJ011958, 91A
	Mala s 10	prot. de choque térmico 70	86	C	AJ011959, 91A
	Mala s 11	Mn superóxido dismut.	23	C	AJ428052
					AJ548421
3. <i>Deuteromycotina</i>					
3.1 <i>Tuberculariales</i>					
<i>Epicoccum purpurascens</i> (antiguamente <i>E. nigrum</i>)	Epi p 1	serina proteasa	30	P	SW:P83340, 91B
G. Insectos					
<i>Aedes aegyptii</i> , mosquito					

Aed a 1	apirasa	68	C	L12389
Aed a 2		37	C	M33157
<i>Apis mellifera</i> , abeja de miel				
Api m 1	fosfolipasa A2	16	C	92
Api m 2	hialuronidasa	44	C	93
Api m 4	melitina	3	C	94
Api m 6		7-8	P	Kettner p.c.
Api m 7	CUB serina proteasa	39	C	AY127579
<i>Bombus pennsilvanicus</i> , abejarrón				
Bom p 1	fosfolipasa	16	P	95
Bom p 4	proteasa		P	95
<i>Blattella germanica</i> , cucaracha alemana				
Bla g 1	Bd90k		C	
Bla g 2	proteasa aspártica	36	C	96
Bla g 4	calcina	21	C	97
Bla g 5	glutatión transferasa	22	C	98
Bla g 6	trponina C	27	C	98
<i>Periplaneta americana</i> , cucaracha americana				
Per a 1	Cr-PII		C	
Per a 3	Cr-PI	72-78	C	98A
Per a 7	tropomiosina	37	C	Y14854
<i>Chironomus kiiensis</i>				
mosquilla				
Chi k 10	tropomiosina	32,5*	C	AJ012184
<i>Chironomus thummi thummi</i> , mosquilla				
Chi t 1-9	hemoglobina	16	C	99
Chi t 1,01	componente III	16	C	P02229
Chi t 1,02	componente IV	16	C	P02230
Chi t 2,0101	componente I	16	C	P02221
Chi t 2,0102	componente IA	16	C	P02221
Chi t 3	componente II-beta	16	C	P02222
Chi t 4	componente IIIA	16	C	P02231
Chi t 5	componente VI	16	C	P02224
Chi t 6,01	componente VIIA	16	C	P02226
Chi t 6,02	componente IX	16	C	P02223
Chi t 7	componente VIIB	16	C	P02225
Chi t 8	componente VIII	16	C	P02227
Chi t 9	componente X	16	C	P02228
<i>Ctenocephalides felis felis</i> , piojo del gato				
Cte f 1				
Cte f 2	M1b	27	C	AF231352
Cte f 3		25	C	
<i>Thaumetopoea pityocampa</i> , procesionaria de los pinos				
Tha p 1		15	P	PIR:A59396, 99A
<i>Lepisma saccharina</i> , lepisma				
Lep s 1	tropomiosina	36	C	AJ309202
<i>Dolichovespula maculata</i> , avispa de cara blanca				
Dol m 1	fosfolipasa A1	35	C	100
Dol m 2	hialuronidasa	44	C	101
Dol m 5	antígeno 5	23	C	102, 103
<i>Dolichovespula arenaria</i> , avispa amarillo				
Dol a 5	antígeno 5	23	C	104
<i>Polistes annularies</i>				
avispa				
Pol a 1	fosfolipasa A1	35	P	105
Pol a 2	hialuronidasa	44	P	105
Pol a 5	antígeno 5	23	C	104
<i>Polistes dominulus</i> , avispa cartonera del Mediterráneo				
Pol d 1				Hoffman p.c.
Pol d 4	serina proteasa	32-34	C	Hoffman p.c.
Pol d 5				P81656
<i>Polistes exclamans</i> , avispa				
Pol e 1	fosfolipasa A1	34	P	107
Pol e 5	antígeno 5	23	C	104
<i>Polistes fuscatus</i> , avispa				

<i>Polistes gallicus</i> , avispa	Pol f 5	antígeno 5	23	C	106
	Pol g 5	antígeno 5	24	C	P83377
<i>Polistes metricus</i> , avispa	Pol m 5	antígeno 5	23	C	106
<i>Vespa crabo</i> , avispón europeo	Vesp c 1	fosfolipasa	34	P	107
	Vesp c 5	antígeno 5	23	C	106
<i>Vespa mandarina</i> , avispón asiático gigante	Vesp m 1				Hoffman p.c.
	Vesp m 5				P81657
<i>Vespula flavopilosa</i> , chaqueta amarilla	Ves f 5	antígeno 5 23	C		106
<i>Vespula germanica</i> , chaqueta amarilla	Ves g 5	antígeno 5 23	C		106
<i>Vespula maculifrons</i> , chaqueta amarilla	Ves m 1	fosfolipasa A1	33,5	C	108
	Ves m 2	hialuronidasa	44	P	109
	Ves m 5	antígeno 5	23	C	104
<i>Vespula penssilvanica</i> , chaqueta amarilla	Ves p 5	antígeno 5	23	C	106
<i>Vespula squamosa</i> , chaqueta amarilla	Ves s 5	antígeno 5	23	C	106
<i>Vespula vidua</i> , avispa	Ves vi 5	antígeno 5	23	C	106
<i>Vespula vulgaris</i> , chaqueta amarilla	Ves v 1	fosfolipasa A1	35	C	105A
	Ves v 2	hialuronidasa	44	P	105A
	Ves v 5	antígeno 5	23	C	104
<i>Myrmecia pilosula</i> , hormiga saltadora australiana	Myr p 1		C		X70256
	Myr p 2		C		S81785
<i>Solenopsis geminata</i> , hormiga roja tropical	Sol g 2				Hoffman p.c.
	Sol g 4				Hoffman p.c.
<i>Solenopsis invicta</i> , hormiga roja	Sol i 2	13	C		110, 111
	Sol i 3		24	C	110
	Sol i 4		13	C	110
<i>Solenopsis saevissima</i> , hormiga roja brasileña	Sol s 2				Hoffman p.c.
<i>Triatoma protracta</i> , vinchuca de California	Tria p 1	Procalina	20	C	AF179004, 111A.
H. Alimentos					
<i>Gadus callarias</i> , bacalao	Gad c 1	alérgeno M	12	C	112, 113
<i>Salmo salar</i> , salmón del Atlántico	Sal s 1	parvalbúmina	12	C	X97824
<i>Bos domesticus</i> , ganado doméstico (leche)	Bos d 4	alfa-lactalbúmina	14,2	C	M18780
véanse también los animales	Bos d 5	beta-lactoglobulina	18,3	C	X14712
	Bos d 6	albúmina sérica	67	C	M73993
	Bos d 7	inmunoglobulina	160		77
	Bos d 8	caseínas	20-30		77
<i>Cyprinus carpio</i> (carpa común)	Cyp c 1	parvalbúmina	12	C	129
<i>Gallus domesticus</i> , pollo	Gal d 1	ovomucoide	28	C	114, 115
	Gal d 2	ovalbúmina	44	C	114, 115
	Gal d 3	Ag22, conalbúmina	78	C	114, 115
	Gal d 4	lisozima	14	C	114, 115
	Gal d 5	albúmina sérica	69	C	X60688
<i>Metapenaeus ensis</i> , gamba					

<i>Met e 1</i>	tropomiosina		C	U08008
<i>Penaeus aztecus</i> , gamba				
Pen a 1	tropomiosina	36	P	116
<i>Penaeus indicus</i> , gamba				
Pen i 1	tropomiosina	34	C	116A
<i>Penaeus monodon</i> , gamba tigre negra				
Pen m 1	tropomiosina	38	C	
Pen m 2	arginina cinasa	40	C	AF479772, 117
<i>Todarodes pacificus</i> , calamar				
Tod p 1	tropomiosina	38	P	117A
<i>Helix aspersa</i> , caracol de las viñas				
Hel as 1	tropomiosina	36	C	Y14855, 117B
<i>Haliotis midae</i> , oreja de mar				
Hal m 1		49		117C
<i>Rana esculenta</i> , rana comestible				
Ran e 1	parvalbúmina alfa	11,9*	C	AJ315959
Ran e 2	parvalbúmina beta	11,7*	C	AJ414730
<i>Brassica juncea</i> , mostaza oriental				
Bra j 1	2S albúmina	14	C	118
<i>Brassica napus</i> , semilla de colza				
Bra n 1	2S albúmina	15	P	118A, P80208
<i>Brassica rapa</i> , nabo				
Bra r 2	hom: proheveína	25		P81729
<i>Hordeum vulgare</i> , cebada				
Hor v 15	BMAI-1	15	C	119
Hor v 16	alfa-amilasa			
Hor v 17	beta-amilasa			
Hor v 21	gamma-3 hordeína	34	C	119A, SW:P80198
<i>Secale cereale</i> , centeno				véase la lista de isoal.
Sec c 20	secalina			
<i>Triticum aestivum</i> , trigo				
Tri a 18	aglutinina			
Tri a 19	omega-5 gliadina	65	P	PTR:A59156
<i>Zea mays</i> , maíz				
Zea m 14	prot. de transferencia de lípidos	9	P	P19656
<i>Oryza sativa</i> , arroz				
Ory s 1			C	119B, U31771
<i>Apium graveolens</i> , apio				
Api g 1	hom: Bet v 1	16*	C	Z48967
Api g 4	profilina			AF129423
Api g 5		55/58	P	P81943
<i>Daucus carota</i> , zanahoria				
Dau c 1	hom: Bet v 1	16	C	117D, véase la lista de isoalérgenos
Dau c 4	profilina		C	AF456482
<i>Corilus avellana</i> , avellana				véase la lista de
Cor a 1,04	hom: Bet v 1	17	C	isoalérgenos
Cor a 2	profilina	14	C	AF327622
Cor a 8	proteína de transferencia de lípidos	9	C	AF329829
<i>Malus domestica</i> , manzana				véase la lista de
Mal d 1	hom: Bet v 1		C	isoalérgenos
Mal d 2	hom: taumatina		C	AJ243427
Mal d 3	proteína de transferencia de lípidos	9	C	Pastorello p.c. véase la lista de
Mal d 4	profilina	14,4*	C	isoalérgenos

<i>Pyrus communis</i> , pera					
	Pyr c 1	hom: Bet v 1	18	C	AF05730
	Pyr c 4	profilina	14	C	AF129424
	Pyr c 5	hom: isoflavona reductasa	33,5	C	AF071477
<i>Persea americana</i> , aguacate					
	Pers a 1	endoquitinasa 32	C		Z78202
<i>Prunus armeniaca</i> , albaricoque					
	Pru ar 1	hom: Bet v 1		C	U93165
	Pru ar 3	proteína de transferencia de lípidos	9	P	
<i>Prunus avium</i> , cereza dulce					
	Pru av 1	hom: Bet v 1		C	U66076
	Pru av 2	hom: taumatina		C	U32440
	Pru av 3	proteína de transferencia de lípidos	10	C	AF221501
	Pru av 4	profilina	15	C	AF129425
<i>Prunus domestica</i> , ciruela europea		proteína de transferencia de lípidos			
	Pru d 3		9	P	119C
<i>Prunus persica</i> , melocotón		proteína de transferencia de lípidos			
	Pru p 3		10	P	P81402 véase la lista de isoalérgenos
	Pru p 4	profilina	14	C	
<i>Asparagus officinalis</i> , espárrago		proteína de transferencia de lípidos			
	Aspa o 1		9	P	119D
<i>Crocus sativus</i> , azafrán					
		Cro s 1	21		Varasteh A-R p.c.
<i>Lactuca sativa</i> , lechuga		proteína de transferencia de lípidos			
	Lac s 1		9		Viets p.c.
<i>Vitis vinifera</i> , uva		proteína de transferencia de lípidos			
	vit v 1		9	P	P80274
<i>Musa x paradisiaca</i> , banana					
	Mus xp 1	profilina	15	C	AF377948
<i>Ananas comosus</i> , piña					
	Ana c 1	profilina	15	C	AF377949 119E-G, D14059
	Ana c 2	bromelaína	22,8*	C	
<i>Citrus limon</i> , limón		proteína de transferencia de lípidos			
	Cit 1 3		9	P	Torrejon p.c.
<i>Citrus sinensis</i> , naranja dulce					
	Cit s 1	proteína de tipo germina	23	P	Torrejon p.c.
	Cit s 2	profilina	14	P	Torrejon p.c.
	Cit s 3	proteína de transferencia de lípidos	9	P	Torrejon p.c.
<i>Litchi chinensis</i> , lichi					
	Lit c 1	profilina	15	C	AY049013
<i>Sinapis alba</i> , mostaza amarilla					
	Sin a 1	2S albúmina	14	C	120
<i>Glycine max</i> , semilla de soja					
	Gly m 1	HPS 7	P		120A A57106
	Gly m 2		8	P	véase la lista de isoalérgenos
	Gly m 3	profilina	14	C	X60043, 120B
	Gly m 4	(SAM22) prot. PR-10	17	C	
<i>Vigna radiata</i> , judía mungo		PR-10 proteína	15	C	AY792956
	Vig r 1				
<i>Arachis hypogaea</i> , cacahuete					
	Ara h 1	vicilina	63,5	C	L34402

	Ara h 2	conglutina	17	C	L77197
	Ara h 3	glicinina	60	C	AF093541
	Ara h 4	glicinina	37	C	AF086821
	Ara h 5	profilina	15	C	AF059616
	Ara h 6	hom: conglutina	15	C	AF092846
	Ara h 7	hom: conglutina	15	C	AF091737
	Ara h 8	proteína PR-10	17	C	AY328088
<i>Lens culinaris</i> , lenteja					véase la lista de isoalérgenos 120C
	Len c 1	vicilina	47	C	
	Len c 2	prot. biotinilada de semilla	66	P	
<i>Pisum sativum</i> , guisante					véase la lista de isoalérgenos pendiente
	Pis s 1	vicilina	44	C	
	Pis s 2	convicilina	63	C	
<i>Actinidia chinensis</i> , kiwi	Act c 1	cisteína proteasa	30	P	P00785 SW:P81370, 121
	Act c 2	proteína de tipo taumatina	24	P	
<i>Capsicum annuum</i> , pimiento morrón	Cap a 1w	proteína de tipo osmotina	23	C	AJ297410
	Cap a 2	profilina	14	C	AJ417552
<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomate	Lyc e 1	profilina	14	C	AJ417553 véase la lista de isoalérgenos
	Lyc e 2	b-fructofuranosidasa prot. de transferencia de lípidos	50	C	
	Lyc e 3		6	C	U81996
<i>Solanum tuberosum</i> , patata	Sola t 1	patatina	43	P	P15476
	Sola t 2	inhibidor de catepsina D	21	P	P16348
	Sola t 3	inhibidor de cisteína proteasa	21	P	P20347
	Sola t 4	inhibidor de proteasa aspártica	16+4	P	P30941
<i>Bertholletia excelsa</i> nuez de Brasil	Ber e 1	2S albúmina	9	C	P04403, M17146
	Ber e 2	11S proteína de semilla de almacenamiento de globulina	29	C	AY221641
<i>Juglans nigra</i> , nuez negra	Jug n 1	2S albúmina	19*	C	AY102930
	Jug n 2	prot. de tipo vicilina	56*	C	AY102931
<i>Juglans regia</i> , nuez inglesa	Jug r 1	2S albúmina		C	U66866
	Jug r 2	vicilina	44	C	AF066055
	Jug r 3	proteína de transferencia de lípidos	9	P	Pastorello
<i>Anacardium occidentale</i> anacardo					véase la lista de isoalérgenos
	Ana o 1	proteína de tipo vicilina	50	C	AF453947
	Ana o 2	proteína de tipo legumina	55	C	AY081853
	Ana o 3	2S albúmina	14	C	
<i>Ricinus communis</i> , semilla de ricino	Ric c 1	2S albúmina		C	P01089
<i>Sesamum indicum</i> sésamo	Ses i 1	2S albúmina	9	C	121A, AF240005
	Ses i 2	2S albúmina	7	C	AF091841

Ses i 3	7S globulina de tipo vicilina	45	C	AF240006
Ses i 4	oleosina	17	C	AAG23840
Ses i 5	oleosina	15	C	AAD42942
<i>Cucumis melo</i> , melón bordado				
Cuc m 1	serina proteasa	66	C	D32206
Cuc m 2	profilina	14	C	AY271295
	p. relacionada con la patogénesis PR-1	16*	P	P83834
I. Otros				
<i>Anisakis simplex</i> , nematodo				
Ani s 1		24	P	121B, A59069
Ani s 2	paramiosina	97	C	AF173004
Ani s 3	tropomiosina	41	C	121C, Y19221
Ani s 4		9	P	P83885
<i>Argas reflexus</i>				
garraapata de la paloma				
Arg r 1		17	C	AJ697694
<i>Ascaris suum</i> , gusano				
Asc s 1		10	P	122
<i>Carica papaya</i> , papaya				
Car p 3w	papaína	23,4*	C	122A, M15203
<i>Dendronephthya nipponica</i> , coral blando				
Den n 1		53	P	122B
<i>Hevea brasiliensis</i> , caucho (látex)				
Hev b 1	factor de elongación	58	P	123, 124
Hev b 2	1,3-glucanasa	34/36	C	125
Hev b 3		24	P	126, 127
Hev b 4	componente de microhélice, complejo	100-115	P	128
Hev b 5		16	C	U42640
Hev b 6,01	precursor de heveína	20	C	M36986, p02877
Hev b 6,02	heveína	5	C	M36986, p02877
Hev b 6,03	fragmento C-terminal	14	C	M36986, p02877
Hev b 7,01	hom: patatina de suero B	42	C	U80598
Hev b 7,02	hom: patatina de suero C	44	C	AJ223038
Hev b 8	profilina	14	C	véase la lista de isoalérgenos
Hev b 9	enolasa	51	C	AJ132580
Hev b 10	Mn superóxido dismut.	26	C	véase la lista de isoalérgenos
Hev b 11	quitinasa de clase 1 proteína de transferencia de lípidos		C	véase la lista de isoalérgenos
Hev b 12		9,3	C	AY057860
Hev b 13	esterasa	42	P	P83269
<i>Homo sapiens</i> , autoalérgenos humanos				
Hom s 1		73*	C	Y14314
Hom s 2		10,3*	C	X80909
Hom s 3		20,1*	C	X89985
Hom s 4		36*	C	Y17711
Hom s 5		42,6*	C	P02538
<i>Triplochiton scleroxylon</i>				
Obeche				
Trip s 1	quitinasa de clase 1	38,5	P	Kespohl p.c.

Bibliografía

1 Marsh, D.G., y L.R. Freidhoff. 1992. ALBE, an allergen database. IUIS, Baltimore, MD, Edición 1.0.

2 Marsh, D. G. et al. 1986. Allergen nomenclature. Bull WHO 64:767-770.

- 3 King, T.P. *et al.* 1964. Biochemistry 3:458-468.
- 4 Lowenstein, H. 1980. Allergy 35:188-191.
- 5 5 Aukrust, L. 1980. Allergy 35:206-207.
- 6 Demerec, M. *et al.* 1966. Genetics 54:61-75.
- 10 7 Bodmer, J. G. *et al.* 1991. Immunogenetics 33:301-309.
- 8 Griffith, I.J. *et al.* 1991. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 96:296-304.
- 9 Roebber, M. *et al.* 1985. J. Immunol. 134:3062-3069.
- 15 10 Metzler, W. J. *et al.* 1992. Biochemistry 31:5117-5127.
- 11 Metzler, W. J. *et al.* 1992. Biochemistry 31:8697-8705.
- 20 12 Goodfriend, L. *et al.* 1979. Fed. Proc. 38:1415.
- 13 Ekramoddoullah, A. K. M. *et al.* 1982. Mol. Immunol. 19:1527-1534.
- 25 14 Ansari, A. A. *et al.* 1987. J. Allergy Clin. Immunol. 80:229-235.
- 15 Morgenstern, J.P. *et al.* 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9690-9694.
- 16 Griffith, I.J. *et al.* 1992. Gene 113:263-268.
- 30 17 Weber, A. *et al.* 1986. Biochem. Physiol. 83B:321-324.
- 18 Weber, A. *et al.* 1987. Allergy 42:464-470.
- 19 Stanworth, D. R. *et al.* 1990. Bulletin WHO 68:109-111.
- 35 20 Rafnar, T. *et al.* 1991. J. Biol. Chem. 266: 1229-1236.
- 21 Rogers, B.L. *et al.* 1991. J. Immunol. 147:2547-2552.
- 40 22 Klapper, D.G. *et al.* 1980. Biochemistry 19:5729-5734.
- 23 Ghosh, B. *et al.* 1993. J. Immunol. 150:5391-5399.
- 24 Roebber, M. *et al.* 1983. J. Immunol. 131:706-711.
- 45 25 Lubahn, B., y D.G. Klapper. 1993. J. Allergy Clin. Immunol. 91:338.
- 26 Roebber, M., y D.G. Marsh. 1991. J. Allergy Clin. Immunol. 87:324.
- 50 27 Goodfriend L. *et al.* Mol Immunol 22: 899-906, 1985.
- 28 Himly M. *et al.* FASEB J 17: 106-108, 2003.
- 28A Nilsen, B. M. *et al.* 1991. J. Biol. Chem. 266:2660-2668.
- 55 29 Wopfner N. *et al.* Biol Chem 383: 1779-1789, 2002.
- 29A Jimenez A. *et al.* 1994. Int Arch Allergy Immunol 105:297-307.
- 60 29B Barderas R. *et al.* Int Arch Allergy Immunol 127: 47-54, 2002.
- 29C Carnés J. *et al.* Allergy 56, Suplemento 68: 274, 2001.
- 29D Giuliani A. *et al.* Allergy 42: 434-440, 1987.
- 65 30 Smith, P.M. *et al.* 1996. J. Allergy Clin. Immunol. 98:331-343.

- 31 Suphioglu, C. *et al.* 1997. FEBS Lett. 402:167-172.
- 31a Asturias J.A. *et al.* 1997. Clin Exp Allergy 27:1307-1313.
- 5 32 Mecheri, S. *et al.* 1985. Allergy Appl. Immunol. 78:283-289.
- 33 Roberts, A.M. *et al.* 1993. Allergy 48:615-623.
- 10 33a Guerin-Marchand, C. *et al.* 1996. Mol. Immunol. 33:797-806.
- 34 Klysner, S. *et al.* 1992. Clin. Exp. Allergy 22: 491-497.
- 35 Perez, M. *et al.* 1990. J. Biol. Chem. 265:16210-16215.
- 15 36 Griffith, I. J. *et al.* 1991. FEBS Letters 279:210-215.
- 37 Ansari, A. A. *et al.* 1989. J. Biol. Chem. 264:11181-11185.
- 20 37a Sidoli, A. *et al.* 1993. J. Biol. Chem. 268:21819-21825.
- 38 Ansari, A. A. *et al.* 1989. Biochemistry 28:8665-8670.
- 39 Singh, M. B. *et al.* 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:1384-1388.
- 25 39a van Ree R. *et al.* 1995. J Allergy Clin Immunol 95:970-978.
- 40 Suphioglu, C. y Singh, M.B. 1995. Clin. Exp. Allergy 25:853-865.
- 30 41 Dolecek,C. *et al.* 1993. FEBS Lett. 335:299-304.
- 41A Fischer S. *et al.* 1996. J Allergy Clin Immunol 98:189-198.
- 42 Matthiesen, F., y H. Lowenstein. 1991. Clin. Exp. Allergy 21:297-307.
- 35 43 Petersen,A. *et al.* 1995. Int. Arch. Allergy Immunol. 108:55-59.
- 43A Marknell DeWitt A. *et al.* Clin Exp Allergy 32: 1329-1340, 2002.
- 40 44 Valenta,R. *et al.* 1994. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199:106-118.
- 46 Esch, R. E., y D. G. Klapper. 1989. Mol. Immunol. 26:557-561.
- 47 Olsen, E. *et al.* 1991. J. Immunol. 147:205-211.
- 45 48 Avjioglu, A. *et al.* 1993. J. Allergy Clin. Immunol. 91:340.
- 52 Kos T. *et al.* 1993. Biochem Biophys Res Commun 196:1086-92.
- 50 53 Diaz-Perales A. *et al.* 2000. Clin Exp Allergy 30:1403-1410.
- 54 Ipsen, H., y O.C. Hansen. 1991. Mol. Immunol. 28: 1279-1288.
- 55 55 Taniai, M. *et al.* 1988. FEBS Lett. 239:329-332.
- 56 Griffith, I.J. *et al.* 1993. J. Allergy Clin. Immunol. 91:339.
- 55 57 Sakaguchi, M. *et al.* Allergy 45: 309-312, 1990.
- 60 57A Yokoyama M. *et al.* Biochem Biophys Res Commun 275: 195-202, 2000.
- 57B Midoro-Horiuti T. *et al.* J Immunol 164: 2188-2192, 2000.
- 57C Tinghino R. *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 101: 772-777, 1998.
- 65 58 Gross GN *et al.* Scand J Immunol 8: 437-441, 1978.

- 58A Obispo TM *et al.* Clin Exp Allergy 23: 311-316, 1993.
- 5 58B Midoro-Horiuti T. *et al.* Clin Exp Allergy 31: 771-778, 2001.
- 59 Lombardero M. *et al.* Clin. Exp. Allergy 24: 765-770, 1994.
- 60 Villalba, M. *et al.* Eur. J. Biochem. 216: 863-869, 1993.
- 10 60A Asturias JA *et al.* J Allergy Clin Immunol 100: 365-372, 1997.
- 60B Batanero E. *et al.* Eur J Biochem 241: 772-778, 1996.
- 15 60C Batanero E. *et al.* FEBS Lett. 410: 293-296, 1997.
- 60D Tejera ML *et al.* J Allergy Clin Immunol 104: 797-802, 1999.
- 60E Ledesma A. *et al.* FEBS Lett 466: 192-196, 2000.
- 20 60F Barral P. *et al.* J Immunol 172: 3644-3651, 2004.
- 61 Yi FC *et al.* Clin Exp Allergy 32: 1203-1210, 2002.
- 61A Ramos JD *et al.* Int Arch Allergy Immunol 126: 286-293, 2001.
- 25 62 Chua, K. Y. *et al.* J. Exp. Med. 167: 175-182, 1988.
- 62A Chua, K. Y. *et al.* Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91: 118-123, 1990.
- 30 62B Smith AM *et al.* Int Arch Allergy Immunol 124: 61-63, 2001.
- 62C Smith AM *et al.* J Allergy Clin Immunol 107: 977-984, 2001.
- 63 Smith WA, Thomas WR. Int Arch Allergy Immunol 109: 133-140, 1996.
- 35 64 Lake, F.R. *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 87: 1035-1042, 1991.
- 65 Tovey, E. R. *et al.* J. Exp. Med. 170: 1457-1462, 1989.
- 40 66 Yasueda, H., T. Shida, T. Ando, S. Sugiyama, y H. Yamakawa. 1991. Allergenic and proteolytic properties of fourth allergens from Dermatophagoides mites. En: "Dust Mite Allergens and Asthma. Report of the 2nd international workshop" A. Todt, Ed., UCB Institute of Allergy, Bruselas, Bélgica, págs. 63-64.
- 67 Shen, H.-D. *et al.* Clin. Exp. Allergy 23: 934-940, 1993.
- 45 67A O'Neil GM *et al.* Biochim Biophys Acta, 1219: 521-528, 1994.
- 67B King C. *et al.* J Allergy Clin Immunol 98: 739-747, 1996.
- 50 68 Lind P. *et al.* J. Immunol. 140: 4256-4262, 1988.
- 69 Dilworth, R. J. *et al.* Clin. Exp. Allergy 21: 25-32, 1991.
- 70 Nishiyama, C. *et al.* Int. Arch. Allergy Immunol. 101: 159-166, 1993.
- 55 70A Trudinger, M. *et al.* Clin. Exp. Allergy 21: 33-38, 1991.
- 71 Shen HD *et al.* Clin Exp Allergy 25: 1000-1006, 1995.
- 60 71A Tategaki A. *et al.* ACI International sup. 1: 74-76, 2000.
- 72 Aki T. *et al.* J Allergy Clin Immunol 96: 74-83, 1995.
- 65 72A Tsai L. *et al.* Clin Exp Allergy 29: 1606-1613, 1999.
- 72B Gafvelin G. *et al.* J Allergy Clin Immunol 107: 511-518, 2001.

- 73 van Hage-Hamsten. *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 91:353, 1993.
- 74 Varela J. *et al.* Eur J Biochem 225: 93-98, 1994.
- 5 74A Schmidt M. *et al.* FEBS Lett 370: 11-14, 1995.
- 75 Eriksson TLJ *et al.* Eur. J. Biochem. 268: 287-294, 2001.
- 10 75A Saarne T. *et al.* Int Arch Allergy Immunol 130: 258-265, 2003.
- 75B Eriksson TL *et al.* Eur. J. Biochem. 251 (1-2), 443-447, 1998.
- 15 76 Rautiainen J, Rytkonen M, Pelkonen J, Pentikainen J, Perola O, Virtanen T, Zeiler T, Mantyjarvi R. BDA20, a major bovine dander allergen characterised at the sequence level is Bos d 2. Presentado.
- 77 Gjesing B, Lowenstein H. Ann Allergy 53:602, 1984.
- 20 78 de Groot, H. *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 87:1056-1065, 1991.
- 79 Konieczny, A. Comunicación personal; Immunologic Pharmaceutical Corp.
- 79A Bulone, V. Eur J Biochem 253: 202-211, 1998.
- 25 79B Swiss-Prot reg. P81216, P81217.
- 79C Dandeu J. P. *et al.* (1993). J. Chromatogr. 621:23-31.
- 79D Goubran Botros H. *et al.* 1998. J. Chromatogr. B 710:57-65.
- 30 79E Hilger C. *et al.* Allergy 52: 179-187; y Hilger C. *et al.* Gene 169:295-296, 1996.
- 79F Ichikawa K. *et al.* Clin Exp Allergy, en prensa 2001.
- 35 80 Fahlbusch B. *et al.* Allergy 57: 417-422, 2002.
- 81 McDonald, B. *et al.* 1988. J. Allergy Clin. Immunol. 83:251.
- 81A Clarke, A. J. *et al.* 1984. EMBO J 3:1045-1052.
- 40 82 Longbottom, J. L. 1983. Characterisation of allergens from the urines of experimental animals. McMillan Press, Londres, págs. 525-529.
- 83 Laperche, Y. *et al.* 1983. Cell 32:453-460.
- 45 83A Bush RK *et al.* 1999. J Allergy Clin Immunol 104:665-671.
- 83B Aukrust L, Borch SM. 1979. Int Arch Allergy Appl Immunol 60:68-79.
- 50 83C Sward-Nordmo M. *et al.* 1988. Int Arch Allergy Appl Immunol 85:288-294.
- 84 Shen, *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 103:S157, 1999.
- 55 84A Crameri R. Epidemiology and molecular basis of the involvement of *Aspergillus fumigatus* in allergic diseases. Contrib. Microbiol. vol. 2, Karger, Basilea (en prensa).
- 84B Shen, *et al.* (manuscrito presentado), 1999
- 60 84C Shen HD *et al.* Vacuolar serine proteinase: A major allergen of *Aspergillus fumigatus*. 10th International Congress of Immunology, Resumen, 1998.
- 85 Kumar A. *et al.* 1993. J. Allergy Clin. Immunol. 91:1024-1030.
- 65 85A Saxena S. *et al.* 2003. Clin Exp Immunol 134:86-91.
- 85B Baur X. *et al.* Allergy 57: 943-945, 2002.

- 86A Shen HD *et al.* 1996. Clin Exp Allergy 26:444-451.
- 5 86B Shen, *et al.* Resumen; The XVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Bruselas, Bélgica, 3-7 de julio de 1999.
- 87 Shen HD *et al.* Clin Exp Allergy 29: 642-651, 1999.
- 10 87A Shen HD *et al.* Clin Exp Allergy 25: 350-356, 1995.
- 87B Shen HD *et al.* J Lab Clin Med 137: 115-124, 2001.
- 88 Woodfolk JA *et al.* 1998. J Biol Chem 273:29489-96.
- 15 88A Deuell, B. *et al.* 1991. J. Immunol. 147:96-101.
- 89 Shen, H.D. *et al.* 1991. Clin. Exp. Allergy 21:675-681.
- 20 89A Horner WE *et al.* 1995. Int Arch Allergy Immunol 107:298-300.
- 89B Chang CY *et al.* J Biomed Sci 9: 645-655, 2002.
- 25 90 Yasueda H. *et al.* Biochem Biophys Res Commun 248: 240-244, 1998. Nota: cepa TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) igual a la cepa CBS1878 (Central Bureau von Schimmelkulturen).
- 90A Onishi Y. *et al.* Eur J Biochem 261: 148-154, 1999. Nota: cepa TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) igual a la cepa CBS1878 (Central Bureau von Schimmelkulturen).
- 30 91 Schmidt M. *et al.* Eur J Biochem 246:181-185, 1997. Nota: cepa ATCC n.º 42132 (Colección americana de cultivos tipo).
- 91A Rasool O. *et al.* Eur J Biochem 267: 4355-4361, 2000. Nota: cepa ATCC n.º 42132 (Colección americana de cultivos tipo).
- 35 91B Nota: cepa 4625 (Indian Agricultural Research Institute, PUSA; Nueva Delhi, India).
- 92 Kuchler, K. *et al.* 1989. Eur. J. Biochem. 184:249-254.
- 40 93 Gmachl, M., y G. Kreil. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3569-3573.
- 93A Hoffman DR. 1977. J Allergy Clin. Immunol. 59:364-366.
- 94 Habermann, E. 1972. Science 177:314-322.
- 45 95 Hoffman DR, Jacobson RS. 1996. J. Allergy Clin. Immunol. 97:812-821.
- 95A Hoffman DR, El-Choufani AE, Smith MM, de Groot H. 2001. Occupational allergy, to bumblebee venom: Allergens of Bombus terrestris. J Allergy Clin Immunol, en prensa.
- 50 95B Helm R. *et al.* 1996. J Allerg Clin Immunol 98:172-180.
- 95C Pomes A. *et al.* 1998. J Biol Chem 273:30801-30807.
- 55 96 Arruda LK *et al.* J Biol Chem 270:19563-19568, 1995.
- 97 Arruda LK *et al.* J Biol Chem 270:31196-31201, 1995.
- 98 Arruda LK *et al.* Int Arch Allergy Immunol 107:295-297, 1995.
- 60 98A Wu CH *et al.* 1998. J Allergy Clin Immunol 101:832-840.
- 98B Melen E. *et al.* 1999. J Allergy Clin Immunol 103:859-64.
- 98C Wu CH *et al.* J Biol Chem 271:17937-17943, 1996.
- 65 98D Wu CH *et al.* Molecular Immunol 34:1-8, 1997.

- 98E Santos ABR *et al.* 1999. *J Allergy Clin Immunol* 104:329-337.
- 98F Asturias JA *et al.* 1999. *J Immunol* 162:4342-4348.
- 5 99 Mazur, G. *et al.* 1990. *Monog. Allergy* 28:121-137.
- 99A Moneo I. *et al.* *Allergy* 58: 34-37, 2003.
- 10 100 Soldatova, L. *et al.* 1993. *FEBS Letters* 320:145-149.
- 101 Lu, G. *et al.* 1994. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:224.
- 102 Fang, K. S. F. *et al.* 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:895-899.
- 15 103 King, T. P. *et al.* 1990. *Prot. Seq. Data Anal.* 3:263-266.
- 104 Lu, G. *et al.* 1993. *J. Immunol.* 150: 2823-2830.
- 20 105 King, T. P. y Lu, G. 1997. Datos sin publicar.
- 105A King TP *et al.* 1996. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:588-600.
- 106 Hoffman, D.R. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:707-716.
- 25 107 Hoffman DR. 1992. Datos sin publicar.
- 108 Hoffman DR. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:187, 1993.
- 30 109 Jacobson RS *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 89:292, 1992.
- 110 Hoffman DR. *J. Allergy Clin. Immunol* 91: 71-78, 1993.
- 111 Schmidt M. *et al.* *FEBS Letters* 319: 138-140, 1993.
- 35 111A Paddock CD *et al.* *J Immunol* 167: 2694-2699, 2001.
- 112 Elsayed S, Bennich H. *Scand J Immunol* 3: 683-686, 1974.
- 40 113 Elsayed S. *et al.* *Immunochemistry* 9: 647-661, 1972.
- 114 Hoffman, D. R. 1983. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71: 481-486.
- 115 Langeland, T. 1983. *Allergy* 38:493-500.
- 45 116 Daul CB, Slattery M, Morgan JE, Lehrer SB. 1993. Common crustacea allergens: identification of B cell epitopes with the shrimp specific monoclonal antibodies. En: "Molecular Biology and Immunology of Allergens" (D. Kraft and A. Sehon, eds.). CRC Press, Boca Raton. págs. 291-293.
- 50 116A Shanti KN *et al.* *J. Immunol.* 151: 5354-5363, 1993.
- 117 Yu CJ *et al.* *J Immunol* 170: 445-453, 2003.
- 117A Miyazawa M *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 948-953, 1996.
- 55 117B Asturias JA *et al.* *Int Arch Allergy Immunol* 128: 90-96, 2002.
- 117C Lopata AL *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 642-648, 1997.
- 60 117D Hoffmann-Sommergruber K. *et al.* *Clin. Exp. Allergy* 29: 840-847, 1999.
- 118 Monsalve RI *et al.* *Biochem. J.* 293: 625-632 1993.
- 118A. Monsalve RI *et al.* 1997. *Clin Exp Allergy* 27:833-841.
- 65 119 Mena, M. *et al.* *Plant Molec. Biol.* 20: 451-458, 1992.

- 119A Palosuo K. *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 108: 634-638, 2001.
- 119B Xu H. *et al.* Gene 164: 255-259, 1995.
- 5 119C Pastorello EA *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 94: 699-707, 1994.
- 119D Diaz-Perales A. *et al.* J Allergy Clin Immunol 110: 790-796, 2002.
- 10 119E Galleguillos F, Rodriguez JC. Clin Allergy 8: 21-24, 1978.
- 119F Baur X. Clin Allergy 9: 451-457, 1979.
- 15 119G Gailhofer G. *et al.* Clin Allergy 18: 445-450, 1988.
- 120 Menendez-Arias, L. *et al.* 1988. Eur. J. Biochem. 177:159-166.
- 120A Gonzalez R. *et al.* Lancet 346:48-49, 1995.
- 20 120B Kleine-Tebbe J. *et al.* J Allergy Clin Immunol 110: 797-804, 2002.
- 120C Sanchez-Monge R. *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 106: 955-961, 2000.
- 25 121 Gavrovic-Jankulovic M. *et al.* J Allergy Clin Immunol 110: 805-810, 2002.
- 121A Pastorello EA *et al.* J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 756: 85-93, 2001.
- 121B Moneo I. *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 106: 177-182, 2000.
- 30 121C Asturias JA *et al.* 2000. Allergy 55:898-890.
- 122 Christie, J. F. *et al.* 1990. Immunology 69:596-602.
- 122A Baur X. *et al.* Clin Allergy 12: 9-17, 1982.
- 35 122B Onisuka R. *et al.* Int Arch Allergy Immunol 125: 135-143, 2001.
- 123 Czuppon AB *et al.* J Allergy Clin Immunol 92:690-697, 1993.
- 40 124 Attanayaka DPSTG *et al.* 1991. Plant Mol Biol 16:1079-1081.
- 125 Chye ML, Cheung KY. 1995. Plant Mol Biol 26:397-402.
- 126 Alenius H. *et al.* 1993. Int Arch Allergy Immunol 102:61-66.
- 45 127 Yeang HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton RG, Cardosa MJ. 1996. The 14.6 kD (REF, Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognised by IgE from Spina Bifida patients with Latex allergy. J Allerg Clin Immunol, en prensa.
- 50 128 Sunderasan E. *et al.* 1995. J nat Rubb Res 10:82-99.
- 129 Swoboda I. *et al.* 2002. J Immunol. 168:4576-84.
- La molécula hipoalergénica de la presente invención muestra una capacidad de unión a IgE reducida.
- 55 55 La molécula hipoalergénica de la presente invención muestra una reactividad frente a células T reducida.
- Sin embargo, también pueden usarse fragmentos de alérgenos que comprenden al menos un epítopo de células T en la proteína hipoalergénica según la presente invención.
- 60 60 "Mostrar capacidad de unión a IgE reducida", tal como se usa en el presente documento, significa que las moléculas según la presente invención muestran una actividad o capacidad de unión a IgE significativamente reducida (al menos el 50% menos, preferiblemente al menos el 70% menos, más preferiblemente al menos el 80% menos, incluso más preferiblemente al menos el 90% menos, lo más preferiblemente al menos el 95% menos, de capacidad de unión en comparación con el alérgeno de tipo natural) o incluso carecen de ellas en absoluto.

- La actividad/capacidad de unión a IgE de moléculas tales como péptidos y proteínas puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando, por ejemplo, sueros obtenidos de un sujeto, (es decir, un sujeto alérgico) que se ha expuesto anteriormente al alérgeno de tipo natural. En resumen, se recubre un péptido que va a someterse a prueba sobre pocillos de una placa de microtitulación. Tras 5 lavar y bloquear los pocillos, se incuba en los pocillos una disolución de anticuerpo que consiste en el plasma de un sujeto alérgico, que se ha expuesto al péptido que está sometiéndose a prueba o a la proteína de la que se derivó. Se añade un anticuerpo secundario marcado a los pocillos y se incuba. Entonces se cuantifica la cantidad de unión a IgE y se compara con la cantidad de IgE a la que se une un alérgeno de tipo natural purificado.
- 10 Alternativamente, la actividad de unión de un péptido puede determinarse mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western. Por ejemplo, se hace correr un péptido que va a someterse a prueba sobre un gel de poliacrilamida usando SDS-PAGE. Entonces se transfiere el péptido a nitrocelulosa y posteriormente se incuba con suero de un sujeto alérgico. Tras la incubación con el anticuerpo secundario marcado, se determina la cantidad de IgE unida y se cuantifica.
- 15 Otro ensayo que puede usarse para determinar la actividad de unión a IgE de un péptido es un ensayo ELISA de competencia. En resumen, se genera una combinación de anticuerpo-IgE combinando plasma de sujetos alérgicos que se ha mostrado mediante ELISA directo que son reactivos frente a IgE con alérgeno de tipo natural. Se usa esta combinación en ensayos ELISA de competencia para comparar la unión de IgE a alérgeno de tipo natural con el péptido sometido a prueba. Se determina la unión a IgE para el alérgeno de tipo natural y el péptido que está sometiéndose a prueba y se cuantifica.
- 20 Un "epítopo de células T" significa una proteína (por ejemplo, alérgeno) o fragmento de la misma, para la que una célula T tiene un sitio de unión específico de antígeno, el resultado de unirse a dicho sitio de unión activa la célula T.
- 25 El término "mostrar reactividad frente a células T reducida", tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas que muestran una reactividad frente a células T que está significativamente reducida en comparación con la estimulación inducida por el alérgeno de tipo natural del que se deriva la molécula hipoalergénica usando cantidades equimolares en ensayos convencionales conocidos en la técnica (la reactividad frente a células T reducida significa al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 70%, lo más 30 preferiblemente al menos el 90%, menos de estimulación de moléculas hipoalergénicas en comparación con el alérgeno de tipo natural a cantidades equimolares). En una realización particular preferida de esta invención, las moléculas pueden "carecer" de epítopenos de células T y por tanto la molécula muestra reactividad frente a células T reducida en el/los individual(s) que van(n) a tratarse (es decir, que va(n) a recibir una molécula de plataforma de valencia que presenta epítopo). Es probable que, por ejemplo, una molécula derivada de alérgeno pueda carecer de 35 un(os) epítopo(s) de células T con respecto a un individuo, o un grupo de individuos, al tiempo que presente un(os) epítopo(s) de células T con respecto a otro(s) individuo(s). En la técnica se conocen métodos para detectar la presencia de un epítopo de células T e incluyen ensayos que detectan la proliferación de células T (tales como incorporación de timidina). Los inmunógenos que no logran inducir incorporación estadísticamente significativa de timidina por encima del fondo (es decir, generalmente p inferior a 0,05 usando métodos estadísticos convencionales) 40 se considera generalmente que carecen de epítopenos de células T, aunque se apreciará que la cantidad cuantitativa de incorporación de timidina puede variar, dependiendo del inmunógeno que está sometiéndose a prueba (véase, por ejemplo, Zhen L. *et al.* (*Infect Immun.* (2003) 71:3920-3926)). Generalmente, un índice de estimulación por debajo de aproximadamente 2-3, más preferiblemente menos de aproximadamente 1, indica falta de reactividad frente a células T y epítopos. La presencia de epítopenos de células T también puede determinarse midiendo la 45 secreción de linfocinas derivadas de células T según métodos convencionales. El índice de estimulación (IE) puede calcularse dividiendo la tasa de proliferación (captación de timidina) de células estimuladas entre la tasa de proliferación de células no estimuladas en medio solo. IE=1 significa ausencia de estimulación, IE<1 indica efectos tóxicos e IE>1 indica estimulación de células. La ubicación y el contenido de epítopenos de células T, si están presentes, pueden determinarse empíricamente.
- 50 Además de la estimulación de células T, puede determinarse la secreción de citocina. Por ejemplo, se ha reconocido IFN-gamma como citocina dañina. Otros ejemplos pueden ser TNF-alfa, IL-5, IL-4, IL-8 etc.
- 55 El fragmento de alérgeno está compuesto preferiblemente por los aminoácidos 151 a 177, 87 a 117, 1 a 30, 43 a 70 ó 212 a 241 de Phl p 1, los aminoácidos 93 a 128, 98 a 128, 26 a 53, 26 a 58, 132 a 162, 217 a 246, 252 a 283 ó 176 a 212 de Phl p 5, los aminoácidos 1 a 34 ó 35 a 70 de la cadena 1 de Fel d 1, los aminoácidos 1 a 34, 35 a 63 ó 64 a 92 de la cadena 2 de Fel d 1, los aminoácidos 30 a 59, 50 a 79 ó 75 a 104 de Bet v 1, los aminoácidos 1 a 33, 21 a 51, 42 a 73, 62 a 103 ó 98 a 129 de Der p 2, los aminoácidos 1 a 30, 20 a 50, 50 a 80, 90 a 125, 125 a 155 ó 165 a 198 de Der p 7, los aminoácidos 1-35, 36-70, 71-110, 111-145, 140-170, 175-205, 210-250 ó 250-284 de Der 60 p 10, los aminoácidos 1 a 35, 35 a 72, 70 a 100 ó 90 a 122 de Der p 21, los aminoácidos 1 a 32, 15 a 48 ó 32 a 70 del clon 30, los aminoácidos 19 a 58, 59 a 95, 91 a 120 ó 121 a 157 de Alt a 1, los aminoácidos 31 a 60, 45 a 80, 60 a 96 ó 97 a 133 de Par j 2, los aminoácidos 1 a 40, 36 a 66, 63 a 99, 86 a 120 ó 107 a 145 de Ole e 1, los aminoácidos 25 a 58, 99 a 133, 154 a 183, 277 a 307, 334 a 363, 373 a 402, 544 a 573, 579 a 608, 58 a 99, 125 a 165, 183 a 224, 224 a 261, 252 a 289, 303 a 340, 416 a 457, 460 a 500 ó 501 a 542 de Fel d 2, los aminoácidos 19 a 65 58, 52 a 91, 82 a 119, 106 a 144 ó 139 a 180 de Can f 2, los aminoácidos 19 a 56, 51 a 90, 78 a 118, 106 a 145 ó 135-174 de Can f 1, los aminoácidos 27 a 70, 70 a 100 ó 92 a 132 de Art v 1, los aminoácidos 31 a 70, 80 a 120, 125

a 155, 160 a 200, 225 a 263, 264 a 300, 305 a 350 ó 356 a 396 de Amb a 1, los aminoácidos 1 a 34, 35 a 74, 74 a 115, 125 a 165, 174 a 213, 241 a 280, 294 a 333, 361 a 400 ó 401 a 438 de Alt a 6, los aminoácidos 1 a 40, 41 a 80, 81 a 120, 121 a 160 de Alt a 2 o fragmentos o variaciones de secuencia de los mismos.

- 5 Las secuencias específicas de aminoácidos de las moléculas derivadas de alérgenos identificadas anteriormente son:

Péptido	Posición	Secuencia	SEQ ID NO.
Pep Alt a 1.1	19-58	APLESRQDTASCPVTTEGDYVWKISEFYGRKPEG- TYYNSL	23
Pep Alt a 1.2	59-95	GPNIKATNGGTLDFTCSAQADKLEDHKWYSCGENSFM	24
Pep Alt a 1.3	91-120	ENSFMDFSFDSDRSGLLQKVSDDITYVA	25
Pep Alt a 1.4	121-157	TATLPNYCRAGGGNGPKDFVCQGVADAYITLVTLPKSS	26
Pep Alt a 2.1	1-40	MHSSNNFFKDNIFRSLSKEDPDYSRNIEGQVIRLH- WDWAQ	27
Pep Alt a 2.2	41-80	LLMLSAKRMKVAFKLDIEKDQRVWDRCTADDLK- GRNGFKR	28
Pep Alt a 2.3	81-120	CLQFTLYRPRDLLSLLNEAFFSAFRENRETTINTD- LEYAA	29
Pep Alt a 2.4	121-160	KSISMARLEDLWKEYQKIFPSIQVITSAFRSIE- PELTVYR	30
Pep Alt a 2.5	161-190	CLKKIEASFELIEENGDPKITSEIQLLKAS	31
Pep Alt a 6.1	1-34	MTITKIHARSVYDSRGNPTVEVDIVTETGLHRAI	32
Pep Alt a 6.2	35-74	VTETGLHRAIVPSGASTGSHEACELRGDKSKWG- GKGVTK	33
Pep Alt a 6.3	74-115	APALIKEKLDVKDQSAVDAFLNKLDGTTNKTNL- GANAILGVS	34
Pep Alt a 6.4	125-165	EKGVPLYAHISDLAGT KKPYVLPVPF QNVLNG- GSHAGGRILA	35
Pep Alt a 6.5	174-213	CEAPTFSEAMRQGAEVYQKLKALAKTYGQSAGN- VGDEGG	36
Pep Alt a 6.6	241-280	IKIAMDVASSEFYKADEKKYDLDFKNPDSDKSKWL- TYEQL	37
Pep Alt a 6.7	294-333	VSIEDPFAEDDWEAWSYFFKTYDGQIVGDDLTVT- NPEFIK	38
Pep Alt a 6.8	361-400	AKDAFGAGWGVMVSHRSGETEDVTIADIVVGLRS- GQIKTG	39
Pep Alt a 6.9	401-438	APARSERLAKLNQILRIEEELGDNavyAGNNFR- TAVNL	40
Pep Amb a 1.1	31-70	EILPVNETRRLLTSGAYNIIDGCWRGKADWAEN- RKALADC	41
Pep Amb a 1.2	80-120	GGKDGDIYTVTSELDDD VANPKEGTLRGAAQNR- PLWIIFE	42
Pep Amb a 1.3	125-155	IRLDKEMVVNSDKTIDGRGAKVEIIINAGFTL	43
Pep Amb a 1.4	160-200	NVIIHNINMHDVKVNPAGGLIKSNDGPAAPRAGSDG- DAISIS	44
Pep Amb a 1.5	225-263	GTTRLTVNSLFTQHQFVLLFGAGDENIEDRGMLAT- VAF	45
Pep Amb a 1.6	264-300	NTFTDNVDQRMPRCRHGFFQVVNNNYDKWGSYAIIGGS	46
Pep Amb a 1.7	305-350	ILSQGNRFCAPDERSKKNVLGRHGEAAAESMKWN- WRTNKNVLENGA	47
Pep Amb a 1.8	356-396	GVDPVLTPEQSAGMIPAEPGESALS LTSSAGVLSC- OPGAPC	48
Pep Art v 1.1	27-70	SKLCEKTSKTYSGKCDNKKCDKKCIEWEKAQHGACH- KREAGKES	49
Pep Art v 1.2	70-100	SCFCYFDCSKSPPGATPAPPGAAAPPAAGGS	50

Pep Art v 1.3	92-132	APPPAAGGSPSPPADGGSPPPPAGGSPPVADGGSPVADGG- SPPPSSTH	51
Can f 1 Pep 1	19-56	QDTPALGKDTVAVSGKWLKAMTADQEVPEKPDSVT- PM	52
Can f 1 Pep 2	51-90	DSVTPMILKAQKGGNLEAKITMLTNGQCQNTVVVL- HKTSE	53
Can f 1 Pep 3	78-118	CQNITVVLHKTSEPGKYTAYEGQRVVFQPSPVRD- HYILYC	54
Can f 1 Pep 4	106-145	QPSPVRDHYILYCEGELHGRQIRMAKLLGRD- PEQSQEALE	55
Can f 1 Pep 5	135-174	RDPEQSQEALDFREFSRAKGLNQEILELAQSETC- SPGGO	56
Can f 2 Pep 1	19-58	QEGNHEEPQGGLEELSGRWHVALASNKSDLIKP- WGHRV	57
Can f 2 Pep 2	52-91	PWGHFRVFIHMSAKDGNLHGDLIPIPQDGQCEK- VSLTAFK	58
Can f 2 Pep 3	82-119	CEKVSLTAFKTATSNKFDLEY- WGHNLDLYLAEVDPKSYL	59
Can f 2 Pep 4	106-144	NDLYLAEVDPKSYLILYMINQYN- DDTLSVAHLMVRDLSR	60
Can f 2 Pep 5	139-180	VRDLSRQDFLPFESVCEDIGLHKDQIVVLS- DDDRQCQGSRD	61
Fel d 2 Pep 1	25-58	EAHQSEIAHRFNDLGEHHFRGLVLVAFSQILQQC	62
Fel d 2 Pep 2	99-133	CTVASLRDKYGEMADCCEKKEPERNECFLQHKDDN	63
Fel d 2 Pep 3	154-183	NEQRFLGKILYEIARRHPFYAPELLYYAE	64
Fel d 2 Pep 4	277-307	CADDRADLAKYICENQDSISTKLKECCGKPV	65
Fel d 2 Pep 5	334-363	VEDKEVCKNYQEAKDVFLGTFYEYSRRHP	66
Fel d 2 Pep 6	373-402	LAKEYEATLEKCCATDDPPACYAHVFDLK	67
Fel d 2 Pep 7	544-573	EKQIKKQSALELLKHKPKATEEQLKTVMG	68
Fel d 2 Pep 8	579-608	VDKCCAEDKEACFAEEGPKLAAAQALA	69
Fel d 2 Pep 9	58-99	CPFEDHVKLVNEVTEFAKGCVADQSAANCEK- SLHELLGDKLC	70
Fel d 2 Pep 10	125-165	CFLQHKDDNPGFGQLVTPEADAMCTAFHENEQRFLG- KYLYE	71
Fel d 2 Pep 11	183-224	EEYKGVFTECCEAADKAACLTPKVDALREKVLAS- SAKERLKC	72
Fel d 2 Pep 12	224-261	CASLQKFGERAFAKAWSVARLSQKFPKAE- FAEISKLVTD	73
Fel d 2 Pep 13	252-289	FAEISKLVTDLAKIHKECCHGDLLECADDRADLAKY- IC	74
Fel d 2 Pep 14	303-340	CGKPVLEKSHCISEVERDELPAIDLPLAVD- FVEDKEVC	75
Fel d 2 Pep 15	416-457	CELFKELGEGYGFQNALLVRYTKKVPQVST- PTLVEVSRSLGKV	76
Fel d 2 Pep 16	460-500	CTHPEAERLSCAEDYLSVVLNRLCVLHEKTPVSE- VTKC	77
Fel d 2 Pep 17	501-542	CTESLVNRRPCFSALQVDETYVPKEFSAETFTF- HADLCTLPE	78
Pep Ole e 1.1	1-40	EDIPQPVPVSQFHIQGQVYCDTCRAGFITELSEFIP- GASLR	79
Pep Ole e 1.2	36-66	GASRLQCKDKENGDVTFTEVGYTRAEGLYS	80
Pep Ole e 1.3	63-99	GLYSMLVERDHKNEFCEITLISSGRKDCNEIPTEGWA	81
Pep Ole e 1.4	86-120	GRKDCNEIPTEGWAQPSLKFKLNTVNGTTRTVNPL	82
Pep Ole e 1.5	107-145	LNTVNGTTRTVNPLGFFKKEALPKCAQVYNKL- GMYPPNM	83
Pep Par j 2.1	31-60	GEEACGKVVQDIMPCLHFVKGEEKEPSKEC	84
Pep Par j 2.2	45-80	CLHFVKGEEKEPSKECCSGTKLSEEVKTTEQKREA	85
Pep Par j 2.3	60-96	CCSGTKLSEEVKTTEQKREACKCIVRATKGISGIKN	86

Pep Par j 2.4	97-133	ELVAEVPKKCDIKTTLPPITADFDCKIQCSTIFRGYY	87
Der p 1 Pep 1	1-30	TNACISINGNAPAEIDLRRQMRTVTPIRMQGG	88
Der p 1 Pep 2	52-84	NQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQ	89
Der p 1 Pep 3	85-115	HNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQRFGISN	90
Der p 1 Pep 4	99-135	REQSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTH	91
Der p 1 Pep 5	145-175	KDLDAFRHYDGRTIIQRDNGYQPNYHAVNIV	92
Der p 1 Pep 6	155-187	GRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVWDI	93
Der p 1 Pep 7	175-208	VGYSNAQGVWDYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAANI	94
Der p 1 Pep 8	188-222	VRNSWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVIL	95
Der p 2 Pep 1	1-33	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIRGK	96
Der p 2 Pep 2	21-51	CHGSEPCIIRGKPFQLEAVFEANQNSKAK	97
Der p 2 Pep 3	42-73	EANQNSKAKIEIKASIEGLEVDVPGIDPNAC	98
Der p 2 Pep 4	62-103	EVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGGQYDIKYTWIVP-KIAPKSEN	99
Der p 2 Pep 5	98-129	APKSENVVVTVKVMGDNGVLACAIATHAKIRD	100
Der p 5 Pep 1	1-35	MEDKKHDYQNEFDPLLTERIHEQIKKGELALFILQ	101
Der p 5 Pep 2	25-60	KKGELALFILQEIQINHFEEKPTKEMKDKVIAEMDTI	102
Der p 5 Pep 3	65-95	DGVRGVLDRLMQRKDLDIFEQYNLEMAKKSG	103
Der p 5 Pep 4	78-114	DLDIFEQYNLEMAKKSGDILERDLKKEEARVKKIEV	104
Der p 7 Pep 1	1-30	DPIHYDKITEEINKAVDEAVAAIEKSETFD	105
Der p 7 Pep 2	20-50	VAAIEKSETFDPMKVPDHSDFKFERHIGIIDL	106
Der p 7 Pep 3	50-80	LKGELDMRNIQVRGLKQMCRVGDANVKSEDG	107
Der p 7 Pep 4	90-125	VHDDVVSMYEIDLAYKLGDLHPNTHVISDIQDFVVEL	108
Der p 7 Pep 5	125-155	LSLEVSEEGNMTLTSFEVRQFANVVNHIGGL	109
Der p 7 Pep 6	165-198	LSDVLTAIFQDTVRAEMTKVLAPAFKKELERNNQ	110
Der p 10 Pep 1	1-35	MEAIKKMAMQAMKLEKDNADRAEIAEQKARDANLR	111
Der p 10 Pep 2	36-70	AEKSEEEVRALQKKIQQIENELDQVQEQLSAANTK	112
Der p 10 Pep 3	71-110	LEEKEKALQTAEGDVAALNRRIQLIEEDLERSEER- LKTAT	113
Der p 10 Pep 4	111-145	AKLEEASQSADESERMRKMLEHRSITDEERMGGLE	114
Der p 10 Pep 5	140-170	RMEGLENLKEARMMAEDADRKYDEVARKLA	115
Der p 10 Pep 6	175-205	DLERAERAEATGESKIVELEEELRVVGNNLK	116
Der p 10 Pep 7	210-250	SEEKAQQREEAHEQQIRIMTTKLKEAEARAEFAERS- VOKLO	117
Der p 10 Pep 8	250-284	QKEVDRLEDELVHEKEKYKSIISDELDQTFALGTG	118
Der p 21 Pep 1	1-35	MFIVGDKKEDEWRMAFDRLLMEELETKIDQVEKGL	119
Der p 21 Pep 2	35-72	LHLSEQYKELEKTKSKELKEQILRELTIGENFMKGAL	120
Der p 21 Pep 3	70-100	GALKFFEMEAKRTDLNMFERYNYEFALESIK	121
Der p 21 Pep 4	90-122	YNYEFALESIKLLIKLDELAKKVKAVNPDEYY	122
Clon 30 Pep 1	1-32	MANDNDDDPPTTVHPTTTEQPDDKFECPNSRFG	123
Clon 30 Pep 2	15-48	PTTTEQPDDKFECPNSRFGYFADPKDPHKFYICSN	124
Clon 30 Pep 3	32-70	GYFADPKDPHKFYICSNWEAVHKDCPGNTRNEDEE TCT	125
Bet v 1 Pep 1	30-59	LFPKVAPQAISVENIEGGPGTIKKISF	126
Bet v 1 Pep 2	50-79	GPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDTHTN	127
Bet v 1 Pep 3	75-104	VDHTNFKNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK	128
Fel d 1 cadena 1 Pep 1	1-34	EICPAVKRDVDLFLTGTGTPDEYVEQVAQYKALPVVC	129
Fel d 1 cadena 1 Pep 2	35-70	LENARILKNCVDAKMTEDKENALSLLDKIYTSPLC	130
Fel d 1 cadena 2 Pep 1	1-34	VKMAITCPIFYDVFFAVANGNELLDSLTKVNAC	131
Fel d 1 cadena 2 Pep 2	35-63	TEPERTAMKKIQDCYVENGLISRVLGLVC	132
Fel d 1 cadena 2 Pep 3	64-92	CMTTISSSKDCMGEAVQNTVEDLKLNTLGR	133
Phl p 5 Pep 1	98-128	CGAASNKAFAEGLSGEPKGAAESSSKAALTSK	134
Phl p 5 Pep 2	26-58	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAAPAGKC	135
Phl p 5 Pep 3	132-162	AYKLAYKTAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIC	136
Phl p 5 Pep 4	217-246	CEAAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEAAVK	137
Phl p 5 Pep 5	252-283	TVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAACK	138
Phl p 5 Pep 6	176-212	CAEEVKVIPAGELOQVIEKVDAAFK- VAATAANAAPANDK	139

Phl p 5 Pep 1a	93-128	CFVATFGAASNKAFAEGLSGEPKGAAESSSKAALTSK	141
Phl p 5 Pep 2b	26-53	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAC	142

Los términos "fragmentos de los mismos" y "variaciones de secuencia de los mismos" se refieren a péptidos que se deducen de las moléculas derivadas de alérgenos dadas a conocer en el presente documento y muestran propiedades bioquímicas (por ejemplo la capacidad para impedir la unión de IgE al alérgeno del que se derivan esas moléculas) que son comparables o idénticas a dichas moléculas derivadas de alérgenos. Los fragmentos de la

5 presente invención comprenden al menos el 5, preferiblemente al menos el 7, más preferiblemente al menos el 10, sucesivos y/o un máximo del 95%, preferiblemente un máximo del 90%, más preferiblemente un máximo del 80% de residuos de aminoácido de la molécula derivada de alérgeno. El término "variación de secuencia" incluye modificaciones de los péptidos tales como fragmentación (véase anteriormente), sustituciones de aminoácido (por ejemplo por otros aminoácidos naturales o no naturales o derivados de aminoácido), delecciones o adiciones. "Variación de secuencia" también se refiere a dichas moléculas derivadas de alérgenos de la tabla anterior, en las que se añaden al menos 1, preferiblemente al menos 2, más preferiblemente al menos 3, incluso más preferiblemente al menos 4 (5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20) residuos de aminoácido al extremo C y/o N-terminal.

10 15 Se indica que el alérgeno del clon 30 es un alérgeno derivado del ácaro del polvo doméstico, *Dermatophagoides pteronyssinus*, y consiste en la siguiente secuencia: MANDNDPPPTTVHPTTTEQP-DDKFECPSRFGYFADPKDPHKFYICSNWEAVHKDCPGNTRWNEETCT (SEQ ID NO. 140; véase también AT A 733/2006).

20 Según la presente invención también quedan abarcados péptidos que son idénticos en al menos el 80%, preferiblemente idénticos en el 90%, a las secuencias de amino dadas a conocer anteriormente.

La proteína hipoalergénica fusionada según la presente invención puede codificarse por una molécula de ácido nucleico.

25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 La molécula de ácido nucleico puede estar comprendida en un vector. Dicho vector es preferiblemente un vector de expresión. El vector que alberga la molécula de ácido nucleico puede usarse con fines de clonación o para la producción de vectores de expresión. Dicho vector puede ser un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago o cualquier otro vector usado comúnmente en ingeniería genética, y puede incluir, además de la molécula de ácido nucleico de la invención, elementos eucariotas o procariotas para el control de la expresión, tales como secuencias reguladoras para el inicio y la terminación de la transcripción y/o traducción, potenciadores, promotores, secuencias señal y similares.

El vector puede ser un vector bacteriano, fúngico, de insecto, viral o de mamífero.

40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 El vector puede emplearse preferiblemente con fines de clonación y expresión en diversos huéspedes. Por tanto, dicho vector comprende, además de un ácido nucleico que codifica para una molécula hipoalergénica o proteína de fusión según la presente invención, secuencias reguladoras específicas del huésped.

La molécula de ácido nucleico o el vector pueden estar comprendidos en un huésped.

45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 La molécula de ácido nucleico y el vector pueden introducirse en un huésped adecuado. Dicha molécula puede incorporarse en el genoma del huésped. El vector puede existir de manera extracromosómica en el citoplasma o incorporarse en el cromosoma del huésped.

La proteína hipoalergénica según la presente invención puede estar comprendida en una formulación de vacuna.

50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 La formulación de vacuna puede formularse tal como se conoce en la técnica y adaptarse necesariamente al modo de administración de dicha formulación de vacuna. Los modos de administración preferidos de la formulación de vacuna incluyen todos los regímenes de administración convencionales descritos y sugeridos para la vacunación en general e inmunoterapia para la alergia específicamente (por vía oral, transdérmica, intravenosa, intranasal, a través de la mucosa, por vía rectal, etc.). Sin embargo, se prefiere particularmente administrar las moléculas y proteínas según la presente invención por vía subcutánea o intramuscular.

60 La formulación de vacuna puede comprender sólo una proteína de cápside viral o fragmentos de la misma de un miembro del género de rinovirus

Preferiblemente, dicha formulación comprende además al menos un adyuvante, excipiente y/o conservante farmacéutico aceptable.

- Con el fin de aumentar la inmunogenicidad de las moléculas hipoalergénicas según la presente invención, pueden usarse adyuvantes, por ejemplo, en un medicamento. Un adyuvante es un agente auxiliar que, cuando se administra junto, o en paralelo, con un antígeno, aumenta su inmunogenicidad y/o influye sobre la calidad de la respuesta inmunitaria. Por tanto, el adyuvante puede influir considerablemente, por ejemplo, sobre el grado de respuesta inmunitaria humoral o celular. Adyuvantes habituales son, por ejemplo, compuestos de aluminio, compuestos que contienen lípidos o micobacterias inactivadas.
- Generalmente, los adyuvantes pueden ser de diferentes formas, siempre que sean adecuados para su administración a seres humanos. Ejemplos adicionales de tales adyuvantes son emulsiones en aceite de origen mineral o vegetal, compuestos minerales tales como hidróxido o fosfato de aluminio, o fosfato de calcio, productos bacterianos y derivados, tales como P40 (derivado de la pared celular de *Corynebacterium granulosum*), monofosforil lípido A (MPL, derivado de LPS) y derivados de péptido de muramilo y conjugados de los mismos (derivados de componentes de micobacteria), alumbre, adyuvante incompleto de Freund, Liposyn, saponina, escualeno, etc. (véase, por ejemplo, Gupta R. K. et al. (Vaccine 11:293-306 (1993)) y Johnson A. G. (Clin. Microbiol. Rev. 7:277-289).
- La formulación puede comprender de 10 ng a 1 g, preferiblemente de 100 ng a 10 mg, especialmente de 0,5 µg a 200 µg de dicha molécula hipoalergénica.
- Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una proteína hipoalergénica según la presente invención para fabricar un medicamento para el tratamiento o la prevención de una alergia en un ser humano o animal.
- Preferiblemente, dicho medicamento comprende además al menos un adyuvante, excipiente y/o conservante aceptable farmacéutico.
- El medicamento puede usarse para inmunización activa (administración de la proteína hipoalergénica y/o moléculas de la invención) así como pasiva (anticuerpos dirigidos contra la proteína hipoalergénica y/o moléculas de la invención).
- Dicho medicamento puede comprender de 10 ng a 1 g, preferiblemente de 100 ng a 10 mg, especialmente de 0,5 µg a 200 µg de dicha molécula hipoalergénica, molécula de ácido nucleico, vector, huésped o anticuerpo.
- El medicamento se administra preferiblemente a un individuo en cantidad de 0,01 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal.
- La pauta posológica particular, es decir, la dosis, el momento y la repetición, dependerá del individuo particular y de la historia clínica de ese individuo. Consideraciones empíricas, tales como la semivida, contribuirán generalmente a la determinación de la dosificación. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse a lo largo del transcurso de la terapia.
- El individuo al que se le administra el medicamento según la presente invención es preferiblemente un individuo o animal que corre el riesgo de convertirse en alérgico.
- Los sujetos que tienen o que corren el riesgo de tener un estado, trastorno o enfermedad alérgico incluyen sujetos con un estado alérgico existente o una predisposición conocida o sospecha de predisposición a desarrollar un síntoma asociado con, o provocado por, un estado alérgico. Por tanto, el sujeto puede tener un estado, trastorno o enfermedad alérgico crónico activo, un episodio alérgico agudo o un estado, trastorno o enfermedad alérgico latente. Determinados estados alérgicos están asociados con factores medioambientales estacionales o geográficos. Por tanto, los sujetos en riesgo incluyen aquellos en riesgo de padecer un estado basándose en una historia familiar o personal previa, y la estación o la ubicación física, pero en los que el estado o un síntoma asociado con el estado pueden no manifestarse por sí mismos en ese momento en el sujeto.
- La administración del medicamento según la presente invención, que comprende al menos una molécula hipoalergénica tal como se describe en el presente documento, a un individuo puede impedir la sensibilización de dicho individuo o puede inducir una respuesta inmunitaria apropiada frente a alérgenos. Si el medicamento de la presente invención se usa para impedir la sensibilización, debe administrarse a un individuo antes del primer contacto con dicho alérgeno. Por tanto, se prefiere administrar el medicamento según la presente invención a neonatos y niños. Resultó que la administración del medicamento según la presente invención a individuos embarazados inducirá la formación de anticuerpos dirigidos contra alérgenos en el niño no nacido. Es especialmente beneficioso usar moléculas hipoalergénicas según la presente invención para tales terapias, dado que debido a la falta de epítopos de células T pueden reducirse significativamente o incluso evitarse completamente los efectos secundarios que se producen en el transcurso de la inmunoterapia con alérgenos.
- La proteína hipoalergénica según la presente invención puede usarse para el diagnóstico de una alergia y/o una infección viral en un individuo.

Puede usarse una proteína de cápside viral de un virus de la familia de picornavirus como portador en medicamentos o vacunas o para el diagnóstico de una infección viral, en particular el resfriado común.

5 Como alternativa valiosa a la proteína portadora KLH ampliamente extendida, pueden usarse proteínas de cápside viral de virus de la familia de picornavirus. El portador puede conjugarse químicamente o fusionarse con técnicas recombinantes con péptidos, proteínas y polipéptidos u otros antígenos. Además, la proteína de cápside viral puede usarse para detectar, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra dicha proteína de cápside en el suero de un individuo.

10 Una de las ventajas de un portador de este tipo es que no sólo puede exponerse el antígeno fusionado o conjugado con el mismo al sistema inmunitario, sino que además se induce una respuesta inmunitaria frente a la proteína de cápside de un rinovirus. Por consiguiente, tal vacunación conduce a la prevención y/o al tratamiento de enfermedades provocadas rinovirus. El virus es preferiblemente de la especie de rinovirus humanos, en particular rinovirus humano 89 y 14.

15 Una molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5 (Genbank n.º X7435) puede tener un truncamiento C-terminal y/o N-terminal y carecer sustancialmente de capacidad de unión a IgE.

20 El polen de gramíneas es una de las fuentes estacionales de exterior más potentes de alérgenos aéreos responsables de fiebre del heno y asma alérgica.

25 Más del 40% de los individuos alérgicos presentan reactividad de IgE con alérgenos del polen de gramíneas, que se dividen en más de 11 grupos. Más del 80% de los pacientes alérgicos al polen de gramíneas reaccionan con alérgenos del grupo 5.

30 Los alérgenos del grupo 5 son proteínas altamente homólogas, no glicosiladas, con un intervalo de peso molecular de desde 25-33 kD. Varios alérgenos del grupo 5 se han clonado y/o caracterizado inmunológicamente.

35 Resultó que en particular los péptidos de Phl p 5 según la presente invención, que están truncados en el extremo C-terminal y/o N-terminal y carecen capacidad de unión a IgE, pueden emplearse para la vacunación activa de individuos.

40 Según una realización preferida de la presente invención la molécula truncada carece de epítopos de células T.

45 Tal como ya se explicó de manera resumida anteriormente, pueden reducirse significativamente o incluso evitarse los efectos secundarios tardíos de la inmunoterapia con alérgenos si las moléculas hipoalergénicas carecen sustancialmente de epítopos de células T.

50 Moléculas de Phl p 5 truncadas que carecen de epítopos de células T están compuestas por los aminoácidos 93 a 128, 98 a 128, 26 a 53, 26 a 58 ó 252 a 283 de Phl p 5 o fragmentos o variaciones de secuencia de los mismos.

55 En particular estas moléculas truncadas no muestran sustancialmente ningún epítopo de células T y, no obstante, pueden provocar una respuesta inmunitaria apropiada dirigida contra el alérgeno de tipo natural.

55 Phl p 5 truncado hipoalergénico puede estar compuesto por los aminoácidos 132 a 162, 217 a 246 ó 176 a 212 de Phl p 5 o variaciones de secuencia de los mismos.

55 Estas moléculas hipoalergénicas comprenden uno o más epítopos de células T pero carecen de capacidad de unión a IgE.

60 Una molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1 (Genbank n.º X62477 y X62478) puede tener un truncamiento C-terminal y/o N-terminal y carecer de capacidad de unión a IgE.

65 Las alergias a animales afectan a hasta el 40% de los pacientes alérgicos. En el entorno doméstico, las alergias a las mascotas más populares, gatos y perros, son particularmente prevalentes y están relacionadas con síntomas permanentes. Los alérgenos de animales están presentes en caspa, epitelio, saliva, suero u orina. La exposición a los alérgenos puede producirse o bien mediante contacto directo con la piel o bien mediante inhalación de partículas que portan los alérgenos. Se mostró que los alérgenos de gato y perro principales estaban ampliamente presentes y podían incluso detectarse en hogares que no tenían mascotas y en lugares públicos, por ejemplo, escuelas. Esto puede atribuirse al alto y creciente número de hogares que tienen mascotas en los países industrializados

(aproximadamente el 50%) y a la alta estabilidad de los alérgenos, que se transportan y se distribuyen.

Se identificó Fel d 1 como el alérgeno de gato principal, que se reconoce por más del 90% de los pacientes alérgicos a los gatos. Fel d 1 representa una glicoproteína ácida de 38 kDa de función biológica desconocida. Consiste en dos heterodímeros idénticos unidos de manera no covalente, que, de nuevo, están compuestos por dos cadenas polipeptídicas unidas de manera antiparalela mediante tres enlaces disulfuro. La cadena 1 y la cadena 2 se codifican en diferentes genes, consistiendo cada uno en 3 exones. Se ha generado en *E. coli* Fel d 1 recombinante (rFel d 1), expresado como una proteína de fusión de cadena 2 con cadena 1. Este Fel d 1 recombinante puede imitar completamente las propiedades inmunológicas del alérgeno de tipo natural.

5 Péptidos derivados del alérgeno de gato principal Fel d 1 y que carecen de capacidad de unión a IgE son adecuados, por ejemplo, para la inmunoterapia y la vacunación profiláctica contra alergias. Estos péptidos pueden estar comprendidos en un polipéptido más grande o acoplados a una proteína portadora adecuada tal como hemocianina de lapa californiana (KLH). Los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 (como los péptidos derivados

10 de alérgenos y Phl p 5 dados a conocer en el presente documento) pueden inducir una respuesta de IgG, es decir, la producción de los denominados "anticuerpos bloqueantes" o "anticuerpos protectores". Estos anticuerpos impiden la unión de IgE al alérgeno Fel d 1. Por tanto, puede lograrse una reducción significativa de los síntomas alérgicos.

15 20 Según una realización preferida de la presente invención la molécula truncada muestra reactividad frente a células T reducida.

Con el fin de evitar o reducir significativamente los efectos secundarios tardíos, la molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1 muestra reactividad frente a células T reducida tal como se define en la presente invención.

25 Fel d 1 truncado está compuesto preferiblemente por los aminoácidos 1 a 34 ó 35 a 70 de la cadena 1 de Fel d 1, los aminoácidos 1 a 34, 35 a 63 ó 64 a 92 de la cadena 2 de Fel d 1 o variaciones de secuencia de los mismos.

30 35 Las moléculas hipoalergénicas pueden estar compuestas por, o comprender, los aminoácidos 1 a 33, 21 a 51, 42 a 73, 62 a 103 ó 98 a 129 de Der p 2, los aminoácidos 1 a 30, 20 a 50, 50 a 80, 90 a 125, 125 a 155 ó 165 a 198 de Der p 7, los aminoácidos 1 a 35, 35 a 72, 70 a 100 ó 90 a 122 de Der p 21, los aminoácidos 1 a 32, 15 a 48 ó 32 a 70 del clon 30, los aminoácidos 19 a 58, 59 a 95, 91 a 120 ó 121 a 157 de Alt a 1, los aminoácidos 31 a 60, 45 a 80, 60 a 96 ó 97 a 133 de Par j 2, los aminoácidos 1 a 40, 36 a 66, 63 a 99, 86 a 120 ó 107 a 145 de Ole e 1, los aminoácidos 25 a 58, 99 a 133, 154 a 183, 277 a 307, 334 a 363, 373 a 402, 544 a 573, 579 a 608, 58 a 99, 125 a 165, 183 a 224, 224 a 261, 252 a 289, 303 a 340, 416 a 457, 460 a 500 ó 501 a 542 de Fel d 2, los aminoácidos 19 a 58, 52 a 91, 82 a 119, 106 a 144 ó 139 a 180 de Can f 2, los aminoácidos 19 a 56, 51 a 90, 78 a 118, 106 a 145 ó 135-174 de Can f 1, los aminoácidos 27 a 70, 70 a 100 ó 92 a 132 de Art v 1, los aminoácidos 31 a 70, 80 a 120, 125 a 155, 160 a 200, 225 a 263, 264 a 300, 305 a 350 ó 356 a 396 de Amb a 1, los aminoácidos 1 a 34, 35 a 74, 74 a 115, 125 a 165, 174 a 213, 241 a 280, 294 a 333, 361 a 400 ó 401 a 438 de Alt a 6, los aminoácidos 1 a 40, 41 a 80, 81 a 120, 121 a 160 de Alt a 2 o fragmentos o variaciones de secuencia de los mismos.

40 45 La proteína de fusión hipoalergénica puede comprender al menos dos moléculas hipoalergénicas según la presente invención que muestran capacidad de unión a IgE reducida y que muestran opcionalmente reactividad frente a células T reducida.

50 55 Las moléculas hipoalergénicas de la presente invención que se derivan de un alérgeno y carecen de capacidad de unión a IgE pueden fusionarse de manera recombinante o conjugarse químicamente entre sí. Como componentes individuales (fragmentos de alérgenos) de la proteína/polipéptido de fusión, dicha proteína/polipéptido de fusión también carece de capacidad de unión a IgE.

60 65 La proteína de fusión según la presente invención puede comprender al menos dos, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos cuatro, incluso más preferiblemente al menos cinco, moléculas hipoalergénicas según la presente invención. Evidentemente, también es posible fusionar las moléculas hipoalergénicas con otros péptidos, polipéptidos y proteínas no derivados de alérgenos. Estos péptidos, polipéptidos y proteínas, cuando se administran a un individuo, también pueden inducir una reacción inmunológica o pueden actuar como portador o mostrar actividades enzimáticas. Las moléculas hipoalergénicas en la proteína de fusión según la presente invención pueden acoplarse directamente entre sí o a través de un grupo de unión que está compuesto preferiblemente por residuos de aminoácido.

70 75 En la técnica se conocen bien métodos para la producción de proteínas de fusión y pueden encontrarse en referencias de biología molecular convencionales tales como Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) y Ausubel *et al.* (Short Protocols in Molecular Biology, 3^a ed; Wiley and Sons, 1995). En general, una proteína de fusión se produce construyendo en primer lugar un gen de fusión que se inserta en un vector de expresión adecuado que se usa, a su vez, para transfectar una célula huésped adecuada. En general, se producen constructos de fusión recombinantes mediante una serie de digestiones con enzimas de restricción y reacciones de ligamiento que dan como resultado que se incorporen las secuencias deseadas en un plásmido. Si no hay sitios de restricción adecuados disponibles, pueden usarse grupos de unión o adaptadores oligonucleotídicos

- sintéticos tal como conocen los expertos en la técnica y tal como se describe en las referencias citadas anteriormente. Las secuencias de polinucleótido que codifican para alérgenos y proteínas nativas pueden ensamblarse antes de la inserción en un vector adecuado o la secuencia que codifica para el alérgeno puede insertarse adyacente a una secuencia que codifica para una secuencia nativa ya presente en un vector. La inserción de la secuencia dentro del vector debe ser en marco de modo que la secuencia pueda transcribirse para dar una proteína. Resultará evidente para los expertos habituales en la técnica que las enzimas de restricción, los grupos de unión y/o los adaptadores precisos requeridos así como las condiciones de reacción precisas variarán con las secuencias y los vectores de clonación usados. Sin embargo, el ensamblaje de constructos de ADN es rutinario en la técnica y puede lograrlo fácilmente un experto en la técnica.
- Las moléculas pueden fusionarse entre sí en un orden diferente del orden de los fragmentos en el alérgeno de tipo natural si las al menos dos moléculas se derivan del mismo alérgeno.
- La proteína de fusión según la presente invención puede comprender al menos dos moléculas hipoalergénicas que se derivan del mismo alérgeno de tipo natural. En tal caso, las moléculas individuales (fragmentos de alérgenos) se fusionan entre sí en un orden que difiere del orden en el alérgeno de tipo natural. Tal enfoque impide la reformación de posibles sitios de unión a IgE/epítopos en la proteína de fusión hipoalergénica.
- La molécula hipoalergénica y proteína de fusión según la presente invención pueden usarse para la vacunación de un individuo. Esta vacunación puede reducir o impedir la respuesta alérgica provocada por un alérgeno de tipo natural.
- Según una realización preferida de la presente invención, dicho medicamento comprende además al menos un adyuvante, excipiente y/o conservante aceptable farmacéutico.
- El medicamento según la presente invención comprende preferiblemente de 10 ng a 1 g, preferiblemente de 100 ng a 10 mg, especialmente de 0,5 µg a 200 µg de dicha molécula inmunogénica, molécula de ácido nucleico, vector, huésped o anticuerpo.
- Según otra realización preferida de la presente invención, el medicamento se administra a un individuo en la cantidad de 0,01 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal.
- Según una realización preferida de la presente invención dicho individuo corre riesgo de padecer una alergia.
- La molécula hipoalergénica o proteína de fusión según la presente invención puede usarse para el diagnóstico de una alergia o la monitorización del progreso de una terapia para alergia en un individuo.
- La molécula hipoalergénica o proteína de fusión según la presente invención puede usarse no sólo en medicamentos sino que también puede emplearse de manera adecuada con diversos fines de diagnóstico. Por ejemplo, estas moléculas y proteínas de fusión pueden usarse para diagnosticar una alergia exponiendo, por ejemplo, una muestra de un individuo que comprende células que liberan histamina a dicho polipéptido (véase, por ejemplo, Purohit *et al.*, Clin. Exp. Allergy 35 (2005): 186-192). Además, estas moléculas, proteínas de fusión y anticuerpos pueden inmovilizarse sobre una superficie con el fin de formar una matriz de polipéptido/chip. Tales matrices pueden usarse, por ejemplo, en la selección de alto rendimiento con el fin de diagnosticar una alergia en varias muestras tomadas de varios individuos.
- La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin embargo, sin limitarse a los mismos.
- La figura 1A muestra una vista general esquemática del vector p89VP1.
- La figura 1B muestra la secuencia de ADN del sitio de clonación múltiple del vector pET-17b y el gen que codifica para 89VP1.
- La figura 1C muestra la representación esquemática de tres posibilidades para crear fusiones de ácido nucleico.
- La figura 2 muestra un gel del 12% de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que contiene proteína 89VP1 marcada con cola de his purificada (carril 1: 5 µg de marcador molecular; carril 2-5: 10 µl de muestras de elución de 89VP1).
- La figura 3 muestra el reconocimiento por IgG de 14VP1: inmunotransferencia de 14VP1 y controles. Los puntos se visualizan mediante autorradiografía (carril 1-6: incubación con antisero de conejo anti-14VP1 diluido a 1:500-1:16000; carril 7-12: incubación con suero preinmunitario diluido a 1:500-1:16000).
- La figura 4 muestra la respuesta de IgG1 específica de 89VP1 en ratones. Se inmunizaron grupos de ratones con

diferentes antígenos tal como se indica encima de cada recuadro. Se midieron los títulos de IgG1 específica de 89VP1 mediante ELISA y se expresan como valores de DO en el eje Y. Los resultados se muestran como gráficos de recuadros, en los que el 50% de los valores están dentro de los recuadros y los valores que no son aberrantes entre las barras. La línea dentro de los recuadros indica la mediana de los valores.

- 5 La figura 5 muestra la respuesta de IgG1 específica de Phl p 1 en ratones. Se inmunizaron grupos de ratones con diferentes antígenos tal como se indica encima de cada recuadro. Se midieron los títulos de IgG1 específica de rPhl p 1 mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje Y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo IgG1 en los sueros de ratón. Los resultados se muestran como gráficos de recuadros en los que el 50% de los valores están dentro de los recuadros y los valores que no son aberrantes entre las barras. La línea dentro de los recuadros indica la mediana de los valores.
- 10 La figura 6 muestra la respuesta de IgG1 específica de extracto de polen de hierba timotea en ratones inmunizados. Se inmunizaron grupos de ratones con diferentes antígenos tal como se indica encima de cada recuadro. Se midieron los títulos de IgG1 específica de extracto de polen de hierba timotea mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje Y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo IgG1 en los sueros de ratón. Los resultados se muestran como gráficos de recuadros, en los que el 50% de los valores están dentro de los recuadros y los valores que no son aberrantes entre las barras. La línea dentro de los recuadros indica la mediana de los valores.
- 15 La figura 7 muestra la media del % de inhibición de la unión de IgG del paciente a rPhl p 1 mediante preincubación con antisueros contra rPhl p 1, r89P5 y KLHP5 de los 19 pacientes. El % de inhibición se muestra en el eje Y. Los resultados se muestran como barras.
- 20 La figura 8 muestra la proliferación de células del bazo de ratones inmunizados. Se estimularon células T de ratones inmunizados con diferentes antígenos tal como se indica encima de cada recuadro con péptido 5, 89VP1(89) y KLH. Se usó el medio como referencia. En el eje Y se muestra el índice de estimulación. Los resultados se presentan en barras.
- 25 La figura 9 muestra la respuesta de IgG1, IgG2, IgG4 e IgA frente a 14VP1, 89VP1 y rPhl p 1 detectada en sueros humanos mediante medición por ELISA. Se sometieron a prueba los sueros de 10 pacientes para detectar cuatro anticuerpos específicos para 89VP1, 14VP1 y rPhl p 1 tal como se indica encima de cada recuadro. Los sueros tomados en otoño e invierno se muestran en la parte izquierda y derecha de cada "par de barras", respectivamente. Se midieron los títulos mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje Y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo en los sueros humanos. Los resultados se muestran como gráficos de recuadros, en los que el 50% de los valores están dentro de los recuadros y los valores que no son aberrantes entre las barras. La línea dentro de los recuadros indica la mediana de los valores.
- 30 La figura 10 muestra la detección de anticuerpos anti-89VP1 y anti-rPhl p 1 en sueros de pacientes alérgicos. Se sometieron a prueba sueros de 5 pacientes alérgicos a Phl p 1 para detectar siete anticuerpos específicos para 89VP1 (barra izquierda de cada par) y rPhl p 1 (barra derecha de cada par). Se midieron los títulos mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje Y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo en los sueros humanos. Los resultados se muestran como gráficos de recuadros, en los que el 50% de los valores están dentro de los recuadros y los valores que no son aberrantes entre las barras. La línea dentro de los recuadros indica la mediana de los valores.
- 35 La figura 11 muestra IgG anti-14VP1 que se une a extracto de proteína HRV14 y 14VP1 purificado (carril 1 y 4: 5 µg de marcador; carril 2 y 4: extracto de virus; carril 2 y 5: 5 µg de 14VP1). Se incubaron las transferencias A y B con suero inmunitario anti-14VP1 y suero preinmunitario, respectivamente. Se detectó IgG unida mediante inmunotransferencia de tipo Western y se visualizó mediante autorradiografía.
- 40 La figura 12 muestra la neutralización de HRV14 (carril A (control celular): células tras la preincubación de HRV14 con una dilución de suero inmunitario anti-14VP1 de 1:10²-1:10⁸ (filas A1-A6); carril B: células tras la preincubación de HRV14 con una dilución de suero inmunitario de 1:10²-1:10⁸ (filas B1-B6); carril C: células tras la incubación con HR-V14 a 10 TCD50-10⁶ TCD50 (filas C1- C6); D5: células tras la incubación con suero preinmunitario; D6: células tras la incubación con suero inmunitario). Se sembraron las células en todos los pocillos y se colorearon con cristal violeta tras tres días.
- 45 La figura 13 muestra la reactividad de IgG de antisueros anti-péptido con el alérgeno Phl p 5 completo. Se muestran las reactividades de IgG (valores de DO) a Phl p 5 para 3 muestras de suero (muestra de sangre 1: suero preinmunitario; muestras de sangre 2-3: muestras de suero recogidas a intervalos mensuales) obtenidas de 6 conejos, cada uno de los cuales se inmunizó con uno de los péptidos conjugados con KLH.
- 50 La figura 14 muestra la actividad alergénica de rPhl p 5, y la mezcla de péptidos tal como se detecta mediante expresión de CD203c. Se incubaron muestras de sangre heparinizadas de tres pacientes alérgicos a Phl p 5 con diluciones en serie de desde 10⁻⁴ hasta 10 µg/ml de alérgeno recombinante, una mezcla equimolar de péptidos

derivados de Phl p 5, anticuerpo anti-IgE o tampón de control (co, eje x). Entonces se tiñeron las células con AcM CD203c y se analizaron para detectar la expresión de CD203c en un instrumento FACScan. El índice de estimulación (IE) se presenta en el eje y.

- 5 La figura 15 muestra la identificación de péptidos derivados de Phl p 5 que inducen bajas respuestas linfoproliferativas. Se estimularon CMSP de pacientes alérgicos al polen de hierba timotea con diferentes concentraciones de péptidos y, con fines de control, con interleucina 2 (eje x). Los índices de estimulación (IE) se indican en el eje y.
- 10 La figura 16 muestra péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 que inducen respuestas inmunitarias de IgG específica de Fel d 1 en conejos. Se inmunizaron seis conejos con los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 conjugados con KLH o rFel d 1 no conjugado y se extrajeron 3-4 muestras de sangre a intervalos mensuales. Las reactividades de IgG de los sueros preinmunitarios y los antisueros frente a rFel d 1 unido a placas de ELISA se muestran como densidades ópticas (valores de D.O., eje y).
- 15 La figura 17 muestra la baja actividad alergénica de péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 tal como se determina mediante expresión de CD63 y CD203c en basófilos de pacientes alérgicos. Se incubaron CMSP de 5 pacientes alérgicos a gatos con diluciones en serie de Fel d 1 (recuadros negros) o una mezcla de péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 (recuadros blancos) (eje x). Para el paciente RR también se analizaron con sonda las CMSP con diluciones en serie de péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 como componentes individuales. Se midió la inducción de la expresión de marcadores de superficie CD203c y CD63 como intensidades de fluorescencia media, y los índices de estimulación calculados se muestran en el eje y.
- 20 La figura 18 muestra que un tratamiento con péptidos derivados de Bet v 1 acoplados a KLH reduce las respuestas linfoproliferativas frente a rBet v 1 en ratones sensibilizados. Se midió la proliferación de células T en cultivos de célula del bazo tras la estimulación *in vitro* con el alérgeno de polen de abedul recombinante Bet v 1 (barras blancas), KLH (barras negras) o la mezcla de péptidos (barras grises). Las barras representan los índices de estimulación medios (IE \pm DE) para los diferentes grupos de ratones.
- 25 La figura 19 muestra la vacunación profiláctica con péptidos derivados de Bet v 1 acoplados a KLH de ratones sin tratamiento previo, lo que reduce las respuestas linfoproliferativas frente a rBet v 1 tras la sensibilización.
- 30 La figura 20 muestra que la vacunación profiláctica con péptidos derivados de Bet v 1 acoplados a KLH de ratones sin tratamiento previo induce una respuesta de IgG específica de Bet v 1 y sensibiliza para la inducción de respuestas de IgG específica de alérgeno mediante el alérgeno completo. Se midieron las respuestas de IgG (valores de DO: eje y) frente a Bet v 1 en los cuatro grupos de tratamiento en diferentes puntos de tiempo (eje x).
- 35 La figura 21 muestra una comparación de la reactividad frente a IgE: Se determinó la capacidad de unión a IgE de péptidos derivados de Phl p 5 (1, 2) y variantes (1a, 2b) en ensayos de transferencia puntual aplicando 0,2 μ g/punto usando sueros de 7 pacientes alérgicos al polen de gramíneas (p1-p7) y el suero de un individuo no atópico (NHS). Se usó rPhl p 5 como control positivo y HSA como control negativo. Se detectó IgE unida con anticuerpo anti-IgE humana marcado con 125 I.
- 40 La figura 22 muestra las respuestas linfoproliferativas de péptidos derivados de Phl p 5 (1, 2) y variantes (1a, 2b). Se estimularon CMSP de pacientes alérgicos al polen de gramíneas con diferentes concentraciones de péptidos y, con fines de control, con concentraciones equimolares de rPhl p 5. Los índices de estimulación (IE) se indican en el eje y.
- 45 La figura 23 muestra la protección cruzada de anticuerpos anti-VP1.
- 50 **Ejemplos:**

Ejemplo 1: Construcción de vector p89VP1

- 55 Se prepararon muestras de disolución madre de virus para RT-PCR mediante adición de 1 μ l de inhibidor de ARNasa (Boehringer GmbH, Alemania) hasta una concentración final de 0,01 U/ μ l tras la extracción de ARN de sobrenadantes de cultivo celular mediante el kit de ARN viral QIAamp (Qiagen, Alemania).
- 60 Se construyó plásmido p89VP1 (figura 1A) sustituyendo el fragmento de NdeI/EcoRI del sitio de clonación múltiple de pET-17b por la secuencia de ADNc que codifica para la proteína VP1 de la cepa de rinovirus humano 89 (89VP1). Se usaron los sitios de restricción NdeI y EcoRI (en pET-17b) para la inserción de 89VP1 unido a Asel/EcoRI con ATG en el extremo 5', seis histidinas seguidas por el codón de terminación TGA en el extremo 3' (figura 1B).
- 65 Se confirmó la inserción de 89VP1 en pET-17b mediante secuenciación de nucleótidos.

Tras la fusión de NdeI/Asel, en lugar del sitio NdeI se creó CATAAT y no pudo cortarse con ninguna enzima disponible. Por tanto, se mutó el sitio para dar CTTAAG, el sitio de restricción de Afl II. Para insertar un fragmento de alérgeno adicional, se mutó la secuencia ACCGTT en el extremo 3' para dar ACCGGT, el sitio de restricción de AgeI. Las secuencias de aminoácidos se presentan debajo de las secuencias de nucleótidos de 89VP1. Los sitios de restricción se muestran subrayados en la figura 1B.

5 Dichos sitios de restricción Afl II y AgeI se crearon con el kit de mutagénesis de sitio Quickchange (Stratagene).

10 Por tanto, pueden insertarse ADNc para fragmentos génicos para una fácil purificación en los sitios de restricción restantes o bien en el extremo 5' (usando Afl II) o bien en el extremo 3' (usando AgeI) de 89VP1 o bien en ambos sitios tal como se indica en la figura 1C. Por tanto, se expresarán fragmentos de alérgenos recombinantes en el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal de 89VP1.

15 Tabla I: Cebadores de clonación y mutagénesis (de 5' a 3')

		SEQ ID NO.
Clonación de 89VP1		
89VP1 directo	CGGAATTCA T TAATATGAACCCAGTTGAAAAT-	1
	TATATAGATAGTGTATTA	
89VP1 inverso	CGATTAATTCA G GTGGTGGTGGTGGTGGT-	2
	GACGTTGTAACGGTAA	
Mutagénesis		
Afl II directo	CTTTAAGAAGGAGATATA C TTAAGATGAAC-	3
	CCAGTTG	
Afl II inverso	CAACTGGGTT C ATCTTAAGTATATCTCCTTCT-	4
	TAAAG	
AgeI directo	CCTGAT T TTTACCGGTACAAACGTCCACCAC	5
AgeI inverso	GTGGTGGACGTTGTACCGTAAACATCAGG	6

Ejemplo 2: Clonación de un constructo que expresa una proteína de fusión de 89VP1-fragmento de alérgeno

20 Se mostró a modo de ejemplo el enfoque descrito anteriormente para un fragmento de alérgeno Phl p 1 C-terminal, concretamente el péptido 5 (CVRYTTEGGTK-TEAEDVIPEGWKADTAYESK; M. Focke *et al.* FASEB J (2001) 15:2042-4). Se amplificó la secuencia de ADN del péptido 5 mediante PCR usando el ADNc de Phl p 1 (GenBank: X78813) como molde (cebadores: Phl p 1 directo 5'-CGCGCTTAAGATGGTCCGCTACACCACCGAGGGC-3' (SEQ ID NO. 7); Phl p 1 inverso 5'-CGCGCTTAAGCTGGACTCGTAGGCAGGTGTCGGC-3' (SEQ ID NO. 8)). Se insertó el producto de PCR en el sitio de restricción Afl II del vector p89VP1, y el constructo resultante se denomina vector p89P5 y producto genético r89P5.

Ejemplo 3: Expresión y purificación de proteína de fusión 89VP1-péptido 5 y 89VP1

30 Con el fin de lograr la expresión de 89VP1 o r89P5 (proteína de fusión 89VP1-péptido 5 recombinante), se transformaron los plásmidos en BL21 (DE3) de *E. coli*. Se hicieron crecer las células de *E. coli* transformadas en 250 ml de medio LB que contenía ampicilina 100 mg/l a 37°C hasta una densidad óptica (600 nm) de 0,4, y se indujo expresión de proteína mediante adición de isopropil-beta-D-tiogalactosidasa (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM. Se recogieron las células de *E. coli* tras 4 horas mediante centrifugación a 3500 rpm a 4°C durante 10 min. Se realizó la purificación con el protocolo de Qiagen usando columnas y Ni-NTA de Qiagen. Se resuspendió el sedimento celular en condiciones desnaturalizantes en 5 ml de clorhidrato de guanidino 6 M durante 1 hora. Tras la centrifugación (20 min, 10000 x g) se incubó el sobrenadante con 1 ml de Ni-NTA durante una hora adicional. Entonces se cargó la suspensión en una columna, se lavó dos veces con 5 ml de tampón de lavado (urea 8 M pH 6,3) y después se eluyó con 4 ml de tampón de elución (urea 8 M pH 3,5). Se logró la renaturalización tras la diáfragma con molaridad decreciente de urea.

40 Se analizaron la pureza y el tamaño de la proteína purificada mediante SDS-PAGE tal como se muestra en la figura 2. Las bandas de proteína se correlacionaron con el tamaño de proteína calculado de 33,6 kD. También se confirmó la integridad de las proteínas mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western, usando anticuerpo anti-cola de histidina.

45 Ejemplo 4: Detección de anticuerpos de conejo específicos de 14VP1 mediante inmunotransferencia

Se transfirieron en puntos 5 µg de 14VP1 (proteína VP1 de la cepa de rinovirus humano 14) y controles (Bet v 1, Phl p 5, BSA) sobre tiras de membrana de nitrocelulosa. Se expusieron estas tiras a una dilución de antisero de conejo anti-14VP1 (carril 1-6) y suero preinmunitario (carril 8-12). Se detectaron anticuerpos IgG de conejo unidos con anticuerpo de asno anti-IgG de conejo marcado con ¹²⁵I 1:1000 y se visualizaron mediante autoradiografía (figura 3).

El análisis mediante transferencia puntual de suero de conejo anti-14 VP1 muestra que 14VP1 es fuertemente inmunogénico. Todavía se detectaron anticuerpos IgG con una dilución de 1:16000 del antisuero en contraste con el suero preinmunitario y los controles de Bet v 1, Phl p 5 y BSA.

5 Ejemplo 5: Respuesta de anticuerpos específicos de 89VP1 en ratones inmunizados determinada mediante ELISA
 Con el fin de determinar la inmunogenicidad de 89VP1 y su capacidad para actuar como portador para péptido 5, se inmunizaron grupos de ratones balb/c hembra de seis semanas de edad (Charles River) con los siguientes 10 antígenos: KLH, péptido 5 acoplado a KLH con maleimida (KLHP5) y péptido 5 acoplado a KLH con EDC (KLHP5edc). El acoplamiento químico se realizó con el kit de mCKLH activada con maleimida de Imject y el de EDC inmunógeno de Imject (Pierce). El grupo maleimida reacciona con grupos SH y el EDC reacciona con grupos carboxilo y amino para formar enlaces estables. Se inmunizaron grupos de 4 ratones con 89VP1, r89P5 y 89P5edc, 15 y se inmunizaron 2 ratones sólo con péptido 5 (5 µg de cada uno y mezclados 1:2 con hidróxido de aluminio). Se inmunizaron los ratones por vía subcutánea a intervalos de aproximadamente tres semanas y se extrajo sangre de las venas de la cola. Se determinó el nivel de anticuerpo IgG1 específico de 89VP1 mediante ELISA.

20 Se recubrieron placas de ELISA (Nunc) con 89VP1 5 µg/ml. Se diluyeron los sueros de ratones anti-89VP1, anti-r89P5 y frente a péptido 5 1:500. Se detectó IgG1 unida con anticuerpo de rata anti-IgG1 de ratón (BD Pharmingen) 1:1000 y después con anticuerpo de cabra anti-IgG de rata acoplado a POX (Amersham Bioscience) 1:2000. El valor óptico (DO 405 nm) se presenta en el eje y y corresponde al nivel de anticuerpo IgG1 en los sueros de ratón (figura 4).

25 Se usaron KLHP5, KLHP5edc, KLH y péptido 5 como controles. Se detectaron anticuerpos IgG1 con un título creciente durante la inmunización en ratones a los que se les inyectó 89VP1 (89VP1, 89P5edc y r89P5). Los conejos inmunizados con 89VP1, r89P5 y KLHP5 muestran el mismo resultado.

30 Ejemplo 6: Respuesta de anticuerpos específicos de rPhl p 1 en ratones inmunizados determinada mediante ELISA
 Para evaluar si la inmunización con r89P5 inducirá anticuerpos IgG que reaccionan con Phl p 1 completo, se usaron el mismo método y los mismos sueros de ratones que los descritos en el ejemplo 5. Se recubrieron placas de ELISA con rPhl p 1 5 µg/ml y se determinó el título de anticuerpo IgG1 (figura 5).
 35 Todos los péptidos derivados de Phl p 1 ya estuvieran acoplados a KLH o 89VP1 indujeron anticuerpos IgG1 específicos de rPhl p 1 con respuestas crecientes durante inmunizaciones. Los conejos inmunizados con r89P5 y KLHP5 muestran el mismo resultado.

40 Ejemplo 7: Detección mediante ELISA de anticuerpos IgG1 específicos de extracto de polen de hierba timotea
 Se realizó la inmunización de ratones y análisis mediante ELISA tal como se describió en la sección 5. Se recubrió extracto de polen de hierba timotea completo (100 µg/ml) sobre placas de ELISA y se determinó el título de anticuerpo IgG1 (figura 6).
 45 Tras tres inmunizaciones podían detectarse anticuerpos IgG1 específicos de extracto en ratones inmunizados con péptido 5.

50 Ejemplo 8: Los anticuerpos de conejo anti-r89P5 bloquean la unión de IgE del paciente a rPhl p 1
 Para determinar la capacidad de Ig de conejo inducida por péptido para inhibir la unión de anticuerpos IgE de pacientes alérgicos a rPhl p 1, se recubrieron placas de ELISA con rPhl p 1 1 µg/ml, se lavaron y se bloquearon. Se preincubaron las placas con anticuerpo de conejo anti-péptido diluido a 1:100 (89P5, KLHP5), un anticuerpo de conejo anti-rPhl p 1 y, con fines de control, con los sueros preinmunitarios correspondientes. Tras el lavado, se incubaron las placas con sueros humanos de pacientes alérgicos a Phl p 1 (diluidos a 1:3) y se detectó IgE unida con anticuerpo de rata anti-IgE humana (Pharmingen, 1:1000) y después con anticuerpo de oveja anti-IgG de rata acoplado a POX (Amersham Bioscience) a 1:2000. Se calculó el porcentaje de inhibición de la unión a IgE logrado mediante preincubación con los antisueros anti-péptido de la siguiente manera: $100 \cdot \frac{DO_i - DO_p}{DO_i} \times 100$.

55 DO_i y DO_p representan las extinciones tras la preincubación con el suero inmunitario y preinmunitario de conejo, respectivamente. La tabla 2 muestra la capacidad de anticuerpos anti-péptido Phl p 1 para inhibir la unión de IgE de 19 pacientes alérgicos a rPhl p 1 completo. La figura 7 presenta la inhibición media (en %) de todos los sueros inmunitarios anti-rPhl p 1, anti-r89P5 y anti-KLHP5. Los sueros anti-péptido bloquearon la unión a IgE mucho mejor que rPhl p 1. La capacidad para la inhibición con 89P5 y KLHP5 es casi igual. La tabla 2 muestra la inhibición (en %) de los 19 pacientes.

65 Tabla 2: % de inhibición de la unión de IgE de 19 pacientes a rPhl p 1 tras la incubación con antisueros de conejo

anti-rPhl p 1, r89P5 y anti-KLHP5

paciente	% de inhibición		
	rPhl p 1	r89P5	KLHP5
1	32,343	68,291	68,213
2	29,373	64,915	61,509
3	10,367	59,469	66,270
4	28,087	73,906	71,330
5	13,808	49,358	45,372
6	22,597	66,259	67,331
7	5,375	26,667	18,902
8	22,478	42,612	47,979
9	5,019	39,822	56,837
10	13,756	53,878	63,047
11	26,444	58,430	57,944
12	25,795	67,243	62,458
13	41,330	75,694	79,517
14	35,543	85,714	87,012
15	45,796	84,255	75,185
16	32,641	76,508	77,412
17	26,483	63,171	47,735
18	19,229	85,750	86,642
19	31,142	62,428	71,086

Ejemplo 9: Proliferación de células T de células del bazo de ratón tras la estimulación con antígeno

5 Se inmunizaron grupos de tres ratones con KLH, KLHP5 y KLH-P5edc. Se inmunizaron grupos de 4 ratones cuatro veces con 89VP1, r89P5 y 89P5edc, y se inmunizaron 2 ratones sólo con péptido 5 (5 µg cada uno). Se tomaron células del bazo 10 días tras la última inmunización y se estimularon cultivos de células individuales por triplicado en placas de 96 pocillos con péptido 5 (P5), 89VP1, KLH, Con A y un medio como control positivo y negativo, respectivamente. Tras cuatro días se añadieron 0,5 µCi de [³H]timidina radiactiva a cada pocillo. Entonces se recogieron células con un colector celular de Packard sobre placas Unifilter tras 15 horas. Se midió la radiactividad asociada a células con un contador beta. Se calcularon los índices de estimulación y se muestran en el eje y. El antígeno que se usó para la estimulación se muestra en el eje x. Cada cuadro representa los datos del antígeno que se usó para la inmunización de los ratones (figura 8). Todos los valores por encima de dos cuentas son positivos. Los ratones inmunizados con KLH y KLHP5 sólo son positivos cuando se estimulan con KLH y los ratones con péptido 5 son completamente negativos. El grupo de KLHP5edc también es negativo, lo que se corresponde con los resultados de ELISA. Las células de ratones inmunizados con r89P5, 89P5edc y 89VP1 sólo proliferaron tras la estimulación con 89VP1. El ratón de control sin tratamiento previo no muestra ninguna proliferación en ninguno de los casos. Estos resultados muestran que se proporcionan epítopos de células T mediante el portador 89VP1 y no mediante el péptido 5.

Ejemplo 10: Detección de anticuerpos específicos de 14VP1, 89VP1 y rPhl p 1 en sueros humanos obtenidos en otoño e invierno mediante ELISA

25 Se tomaron cinco sueros humanos de personas elegidas al azar en otoño y cinco en invierno. Se determinó el nivel de anticuerpos IgG1, IgG2, IgG4 e IgA frente a 14VP1, 89VP1 y rPhl p 1 mediante ELISA tal como se describió en el ejemplo 5. Se detectaron IgG1, IgG2, IgG4 e IgA humanas (BD Pharmingen) a 1:1000 con anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón acoplado a POX (Amersham Bioscience) a 1:2000. Pudo detectarse un alto título de IgG1 anti-14VP1 y 89VP1 de sueros tomados en otoño e invierno (figura 9). El título de anticuerpo IgG1 anti-rPhl p 1 fue mucho menor.

30 Pudieron detectarse anticuerpos IgG2, IgG4 e IgA en todos los casos a un nivel muy bajo. Las proteínas VP1 de las diferentes cepas de HRV están estrechamente relacionadas y en otros estudios se ha mostrado reactividad cruzada.

Ejemplo 11: Anticuerpos anti-89VP1 y anti-rPhl p 1 de pacientes alérgicos a Phl p 1

35 Se tomaron sueros de cinco pacientes alérgicos a Phl p 1 y se realizó un experimento de ELISA tal como se describió en el ejemplo 5. Se recubrieron placas de ELISA con rPhl p 1 y 89VP1 y se determinó el título de anticuerpos IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgE específicos (figura 10). Pudieron detectarse más anticuerpos IgG1 anti-89VP1 que anticuerpos IgG1 anti-rPhl p 1.

Ejemplo 12: Detección de la unión de anticuerpo anti-14VP1 al virus completo mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western

Se confirmó la unión de anticuerpo IgG de sueros del conejo al que se le inyectó 14VP1 al virus completo usando el virus HRV14 completo (carril 2 y 5) y 5 µg de 14VP1 purificado (carril 3 y 6) como control. Se separó el extracto de

virus mediante el 12% de SDS-Page y se transfirió sobre membrana de nitrocelulosa. Se sometieron a prueba antisuero de conejo anti-14VP1 (carril 1-3) a 1:500 y suero preinmunitario (carril 4-6) a 1:500 para determinar la unión a HRV14 y 14VP1. Se detectó IgG unida con anticuerpo de asno anti-conejo marcado con ^{125}I y se visualizó mediante autorradiografía (figura 11).

- 5 La unión de antisuero frente a 14VP1 pudo detectarse al mismo tamaño (33, 6 kD) que 14VP1.

Ejemplo 13: Neutralización de anticuerpos anti-14VP1 de rinovirus humano 14 intacto

- 10 Se determinó la dosis de cultivo tisular 50 (DCT50) de HRV14. Por tanto, se realizó una dilución de virus de desde 1:10²-1:10⁸ en MEM-Eagle con FCS al 1% y MgCl₂ 40 mM y se incubó en placas de 24 pocillos a 34°C en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada junto con células HeLa Ohio durante tres días. También se extendió un control sin el virus.
- 15 Se visualizó el efecto citotóxico del virus con cristal violeta tras tres días y se calculó la DCT50 (la dilución en la que el 50% de las células están muertas).

Se incubaron diluciones de suero y virus (100DCT50) en las filas A y B a 34°C. Tras 2 horas se extendieron las células en todos los pocillos. D5 y D6 son controles de suero. En la figura 12 se muestra el esquema experimental.

20 El efecto de neutralización de los anticuerpos se detectó tras tres días con cristal violeta (figura 12).

Ejemplo 14: Características de péptidos sintéticos derivados de Phl p 5

- 25 Se sintetizaron péptidos usando una estrategia de Fmoc con activación de HBTU (ciclos a escala pequeña de 0,1 mmol) en el sintetizador de péptidos de Applied Biosystems modelo 433A tal como se describe. (Focke *et al.* Faseb J (2001) 15:2042). Tras un análisis detallado del alérgeno Phl p 5 se prepararon seis péptidos derivados de Phl p 5 que oscilaban entre 31 (P1: 3026 Dalton) y 38 (P6: 3853 Dalton) aminoácidos de longitud que eran ricos en aminoácidos expuestos a disolvente (tabla 3).
- 30 Estos péptidos tienen puntos isoeléctricos de entre 4,32 y 8,98 y tres de ellos (péptido 3, 4 y 6) pueden contener epítopos de células T humanas.
- 35 Tabla 3. Características de péptidos sintéticos derivados de Phl p 5 no alergénicos. Se presentan la posición (con relación a la molécula de Phl p 5), la secuencia, la longitud, el peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI) y la presencia de epítopos de células T de los péptidos derivados de Phl p 5. El residuo de cisteína añadido para facilitar el acoplamiento se marca en negrita y subrayado.

	Posición de aa	Secuencia	Longitud de aa	PM	pI	Epítopo de células T
Pépt. 1 (SEQ ID NO. 9)	98-128	<u>CGAASNKAFAEGLSGEP-KGAAESSSSKAALTSK</u>	32	3026	8,16	-
Pépt. 2 (SEQ ID NO. 10)	26-58	ADLGYGPATPAAPAAGYT-PATPAAPAEAAPAG <u>KC</u>	34	3068	4,37	-
Pépt. 3 (SEQ ID NO. 11)	132-162	AYKLAYKTAEGATPEAKY-DAYVATLSEAL <u>RIC</u>	32	3482	6,29	+
Pépt. 4 (SEQ ID NO. 12)	217-246	<u>CEAAFNDAIKASTG-GAYESYKFIPALEAAVK</u>	31	3236	4,87	+
Pépt. 5 (SEQ ID NO. 13)	252-283	TVATA-PEVKYTVFETALKAITAM-SEA <u>QKAAK</u> C	33	3501	8,98	-
Pépt. 6 (SEQ ID NO. 14)	176-212	<u>CAEEVKVIPAGELQVIEK-VDAAFKVAATAANAAPANDK</u>	38	3853	4,66	+

Ejemplo 15: Los péptidos derivados de Phl p 5 carecen de reactividad frente a IgE y actividad alergénica

- 40 15.1. Carencia de reactividad frente a IgE

Para analizar la reactividad frente a IgE de los seis péptidos derivados de Phl p 5, se compararon los péptidos derivados de Phl p 5 aislados así como acoplados a KLH con rPhl p 5 completo con respecto a su capacidad de unión a IgE mediante ELISA usando sueros de 29 pacientes alérgicos al polen de gramíneas (tabla 4).

- 45 Tabla 4: Caracterización serológica de 29 pacientes alérgicos al polen de gramíneas y un control no alergénico. Se midieron el sexo, la edad, los niveles de IgE sérica total (kU/l), IgE específica de extracto de hierba timotea (kUAl), anticuerpos IgE específicos para rPhl p 5 y los 6 péptidos aislados (P1-P6) y acoplados a KLH (KLH-P1-KLH-P6) mediante ELISA y se muestran las DO (densidades ópticas). Los guiones indican la carencia de reactividad de IgE

frente a los péptidos aislados así como los acoplados a KLH.

Paciente	sexo	edad	IgE total (kU/l)	IgE de hierba timotea (kUA/l)	rPhl p 5	IgE (DO)					
						P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	h	29	140,0	25,90	1,437	-	-	-	-	-	-
2	h	39	76,2	10,50	0,456	-	-	-	-	-	-
3	m	29	100,0	33,50	0,699	-	-	-	-	-	-
4	m	31	261,0	28,10	0,930	-	-	-	-	-	-
5	h	33	380,0	32,00	0,545	-	-	-	-	-	-
6	m	31	278,0	37,00	1,720	-	-	-	-	-	-
7	h	43	128,0	20,70	1,118	-	-	-	-	-	-
8	m	29	200,0	18,40	0,489	-	-	-	-	-	-
9	m	34	76,6	18,70	0,571	-	-	-	-	-	-
10	h	35	144,0	39,30	0,157	-	-	-	-	-	-
11	m	33	79,2	29,60	0,574	-	-	-	-	-	-
12	m	30	30,3	10,70	0,350	-	-	-	-	-	-
13	m	34	106,0	20,80	0,395	-	-	-	-	-	-
14	m	52	448,0	43,00	1,320	-	-	-	-	-	-
15	m	25	294,0	95,50	1,638	-	-	-	-	-	-
16	h	30	471,0	82,60	0,752	-	-	-	-	-	-
17	h	44	2000,0	100,00	2,500	-	-	-	-	-	-
18	m	30	168,0	66,60	0,806	-	-	-	-	-	-
19	h	42	512,0	50,30	1,175	-	-	-	-	-	-
20	m	28	253,0	54,00	1,954	-	-	-	-	-	-
21	h	30	315,0	100,00	1,054	-	-	-	-	-	-
22	m	42	401,0	89,50	2,297	-	-	-	-	-	-
23	m	28	100,0	82,10	1,802	-	-	-	-	-	-
24	h	42	52,5	3,52	0,885	-	-	-	-	-	-
25	h	34	136,0	6,11	2,036	-	-	-	-	-	-
26	h	30	31,2	9,17	1,909	-	-	-	-	-	-
27	h	36	24,9	4,34	0,233	-	-	-	-	-	-
28	m	41	41,5	2,19	0,281	-	-	-	-	-	-
29	m	51	370,0	90,10	1,296	-	-	-	-	-	-
NHS	h	39	0,0	0,00	0,065	-	-	-	-	-	-

- 5 Se recubrieron placas de ELISA (Nunc Maxisorp, Dinamarca) con péptidos derivados de Phl p 5 (5 µg/ml) o rPhl p 5 como control (5 µg/ml), se lavaron y se bloquearon. Posteriormente, se incubaron las placas con sueros diluidos a 1:3 de 29 pacientes alérgicos al polen de gramíneas y de un individuo no atópico durante la noche a 4°C. Se seleccionaron pacientes alérgicos al polen de gramíneas que padecían rinoconjuntivitis alérgica y/o asma según historia de caso indicativa de polinosis por gramíneas estacional y se caracterizaron mediante prueba de punción cutánea con extracto de polen de hierba timotea y prueba de CAP-FEIA serológica (Pharmacia Diagnostics, 10 Uppsala, Suecia). Se determinaron los niveles de IgE total en los sueros mediante mediciones de CAP (Pharmacia). Se determinaron anticuerpos IgE específicos para rPhl p 5 mediante ELISA. Se usaron sueros de 29 pacientes alérgicos al polen de gramíneas y un individuo no atópico para estudios de competencia de IgE. El grupo de pacientes alérgicos al polen de gramíneas consistió de 13 hombres y 16 mujeres con una edad media de 35 años (que oscilaba entre 25-51 años) (tabla 4).
- 15 5 Se detectaron anticuerpos IgE unidos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana acoplado a fosfatasa alcalina diluido a 1:1000 (Pharmingen, CA).
- 20 5 Los niveles de IgE total e IgE específica de extracto de polen de gramíneas oscilaron entre 24,9-2000 kU/l (media: 262,7) y 2,2-100 kUA/l (media: 41,5), respectivamente. Todos los pacientes contenían anticuerpos IgE específicos de rPhl p 5 que oscilaban entre 0,157-2,530 unidades de DO (media: 1,082 unidades de DO), pero ninguno de los 29 pacientes mostró reactividad de IgE frente a ninguno de los péptidos (P1-P6) ni frente a una mezcla equimolar de los péptidos (DO ≤ 0,08). Este resultado demuestra que ningún suero contenía anticuerpos IgE detectables con especificidad por ninguno de los seis péptidos derivados de Phl p 5.
- 25 5 15.2. Actividad alergénica reducida de los péptidos tal como se detecta mediante expresión de CD 203 c en basófilos: Activación de basófilos y citometría de flujo:
- 30 5 La regulación por incremento de CD 203 c se ha descrito como marcador sustituto para la activación de basófilos inducida por alérgeno y la desgranulación (Hauswirth *et al.*, J Allergy Clin Immunol 2002; 110:102). Por tanto, se comparó la actividad alergénica de alérgeno rPhl p 5 completo y una mezcla equimolar de péptidos midiendo la regulación por incremento de CD 203 c en basófilos de pacientes alérgicos al polen de gramíneas.
- Se obtuvieron células de sangre periférica de 3 donantes alérgicos tras obtenerse el consentimiento informado. Se

5 incubaron alícuotas de sangre heparinizada (100 µl) con diluciones en serie de alérgenos recombinantes (de 10^{-4} a 10 pg/ml), anticuerpo anti-IgE (1 µg/ml) o tampón de control (solución salina tamponada con fosfato = PBS) durante 15 minutos a 37°C. Tras la incubación, se lavaron las células en PBS que contenía EDTA 20 mM. Entonces se incubaron las células con 10 µl de AcM 97A6 frente a CD203c conjugado con PE durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se lisaron eritrocitos con 2 ml de disolución de lisis FACS™. Entonces se lavaron las células, se resuspendieron en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo de dos colores en un dispositivo FACScan (Becton Dickinson), usando el Software Paint-a-Gate. Se calculó la regulación por incremento inducida por alérgeno de CD203c a partir de las intensidades de fluorescencia media (IFM) obtenidas con células estimuladas (IFMestim) y no estimuladas (IFMcontrol), y se expresó como índice de estimulación (IFMestim: IFMcontrol). Un IE de $\geq 2,0$ (regulación por incremento de ≥ 2 veces) se consideró indicativo de una respuesta específica.

10 Tal como se muestra en la figura 14 se encontró que rPhl p 5 completo muestra un aumento dependiente de la dosis (de 10^{-4} a 10 µg/ml) de la expresión de CD203c en basófilos de sangre periférica en un individuo sensibilizado, mientras que una mezcla equimolar de los péptidos no muestra ningún efecto.

15 16.1. Alérgenos recombinantes y extractos de alérgenos

20 La determinación de expresión de CD 203c en basófilos de pacientes alérgicos al polen de gramíneas indica que no puede observarse ninguna actividad alergénica con los péptidos derivados de Phl p 5.

Ejemplo 16: La inmunización con péptidos derivados de Phl p 5 induce anticuerpos IgG reactivos con rPhl p.5 y alérgenos naturales de diferentes especies de gramíneas

25 16.2. Inmunización de conejos

30 Se expresó Phl p 5 recombinante purificado en *E. coli* tal como se describe (Vrtala *et al.* J of Immunol (1993) 151:4773-4781).

35 Se obtuvo polen de gramíneas de *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Anthoxanthum odoratum* de Allergon Pharmacia (Suecia) y se preparó un extracto de polen acuoso tal como se describe (Vrtala *et al.*, Int Arch Allergy Immunol (1993) 102:160-9).

40 16.3. Reactividad de anticuerpos de conejo con rPhl p 5 completo y alérgenos naturales de diferentes especies de gramíneas

45 Se acoplaron péptidos purificados mediante HPLC a KLH (hemocianina de lapa californiana, PM de $4,5 \times 10^3$ - $1,3 \times 10^7$, Pierce, EE.UU.) según los consejos del fabricante y se purificaron usando un kit de conjugación (Sigma, EE.UU.).

50 Se inmunizaron conejos con cada uno de los péptidos conjugados con KLH (200 µg/inyección) y, con fines de control, con rPhl p 5 completo usando adyuvantes completo e incompleto de Freund (Charles River). Se obtuvieron muestras de suero a intervalos de cuatro semanas.

55 16.3. Reactividad de anticuerpos de conejo con rPhl p 5 completo y alérgenos naturales de diferentes especies de gramíneas

60 Con el fin de investigar si los anticuerpos inducidos tras la inmunización con péptidos acoplados a KLH reconocían los alérgenos de polen de gramíneas rPhl p 5, Phl p 5 natural y relacionados con Phl p 5 de otras especies de polen de gramíneas, se realizaron experimentos ELISA. Para la detección mediante ELISA, se recubrieron placas (Nunc Maxisorp, Dinamarca) con extractos de alérgenos de polen (100 µg/ml: *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Anthoxanthum odoratum*) o alérgeno recombinante purificado (5 µg/ml: rPhl p 5). Se lavaron las placas de ELISA y se bloquearon y posteriormente se incubaron con antisueros de conejo anti-péptido y sueros preinmunitarios correspondientes diluidos a 1:2500. Se detectó IgG de conejo unida con un antisuero de cabra anti-Ig de conejo acoplado a HRP (Jackson Immunresearch, Pensilvania). Los resultados representan medias de determinación por duplicado con un error de <5% (figura 13, tabla 5).

55 Tabla 5: Reactividad cruzada de antisueros anti-péptido Phl p 5 con rPhl p 5 y alérgenos naturales del grupo 5 de *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Anthoxanthum odoratum*. Se presentan las reactividades de IgG (valores de DO) de antisueros frente a péptido (de anti-P1 a anti -P6) frente a Phl p 5 y extractos de polen de polen de gramíneas para 6 conejos que se inmunizaron con péptidos derivados de Phl p 5 conjugados con KLH (P1-P6).

Reactividad cruzada de antisueros anti-péptido con rPhl p 5 y extractos de polen de gramíneas

	anti-P1	anti-P2	anti-P3	anti-P4	anti-P5	anti-P6
rPhl p5a	1,115	2,418	1,336	1,600	1,540	2,142

<i>Phleum pratense</i>	0,227	1,155	0,955	0,703	1,138	1,000
<i>Lolium perenne</i>	0,056	1,320	0,834	0,238	0,163	2,500
<i>Poa pratensis</i>	0,070	1,491	1,045	1,880	2,200	2,500
<i>Dactylis glomerata</i>	0,060	0,390	0,728	0,689	0,154	0,657
<i>Secale cereale</i>	0,090	0,292	0,777	0,676	0,162	0,843
<i>Triticum aestivum</i>	0,116	1,076	0,734	0,404	0,570	0,703
<i>Avena sativa</i>	0,150	0,790	1,029	0,551	0,224	1,494
<i>Anthoxanthum</i>	0,114	1,209	1,531	0,827	1,114	1,115
<i>Hordeum vulgare</i>	0,080	1,972	1,150	1,184	0,602	1,513

16.4. La inmunización con péptidos derivados de Phl p 5 induce anticuerpos IgG con reactividad cruzada

La inmunización con cada uno de los péptidos indujo una robusta respuesta de IgG específica de Phl p 5 que se volvió detectable cuatro semanas tras la primera inmunización y aumentó tras la segunda inmunización (figura 13). La inmunización con péptido 2 indujo la mayor respuesta de IgG específica de Phl p 5 seguido por los péptidos 6, 4, 5 y 1 que indujo la menor respuesta. Con la excepción de anticuerpos anti-péptido 1 que carecían de reactividad con alérgenos del grupo 5 en *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale* y *Hordeum vulgare*, los demás antisueros frente a péptido presentaron reactividad cruzada con cada uno de los extractos de polen de gramíneas sometidos a prueba (tabla 5).

Ejemplo 17: La inmunización con péptidos derivados de Phl p 5 induce anticuerpos IgG que inhiben la unión de IgE de pacientes alérgicos al polen de gramíneas a Phl p 5

15 17.1. Inhibición de la unión de IgE de pacientes alérgicos a rPhl p 5a mediante IgG específica de péptido

La información referente a la capacidad de los péptidos para inducir anticuerpos bloqueantes es importante ya que se mostró que los anticuerpos bloqueantes desempeñan un papel principal en la inmunoterapia.

20 20 Con el fin de examinar la capacidad de Ig de conejo inducida por péptido para inhibir la unión de IgE de pacientes alérgicos a rPhl p 5 completo, se realizaron experimentos de competencia de ELISA usando sueros de 29 pacientes alérgicos a las gramíneas.

25 Se recubrieron placas de ELISA con rPhl p 5 (1 µg/ml) y se preincubaron con una dilución de 1:250 de cada uno de los antisueros anti-péptido (anti-P1-anti-P6), una mezcla de los antisueros anti-péptido, un antisuero anti-rPhl p 5 o, con fines de control, con los sueros preinmunitarios correspondientes o una mezcla de los sueros preinmunitarios. Tras el lavado, se incubaron las placas con sueros diluidos a 1:3 de 29 pacientes alérgicos al polen de gramíneas y se detectaron anticuerpos IgE unidos con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana acoplado a fosfatasa alcalina (Pharmingen). Se calculó el porcentaje de inhibición de la unión a IgE logrado mediante preincubación con los antisueros anti-péptido de la siguiente manera: % de inhibición de la unión a IgE = $100 - \frac{DO_I}{DO_P} \times 100$. DO_I y DO_P representan las extinciones tras la preincubación con el suero inmunitario y preinmunitario de conejo, respectivamente. La preincubación de Phl p 5 con IgG de conejo inducida por péptido inhibió la reactividad de IgE de pacientes alérgicos en un grado variable. El grado de inhibición promedio de la unión a IgE osciló entre el 19,3% para IgG anti-péptido 6 y el 28,5% con IgG anti-péptido 1. Los anticuerpos de conejo producidos frente a Phl p 5 completo indujeron una inhibición media de la unión a IgE del 43,6%.

30 35 Tabla 6: Los antisueros de conejo anti-péptido Phl p 5 inhiben la unión de IgE de suero de pacientes alérgicos al polen de hierba timotea a Phl p 5. Se presenta el porcentaje inhibición de la unión de IgE a Phl p 5 para cada paciente tras la preincubación de Phl p 5 con antisueros anti-péptido (anti-P1 - anti-P6), con una mezcla de los seis antisueros anti-péptido (anti-P1-P6) o con un antisuero anti-rPhl p 5. El porcentaje de inhibición medio se presenta en la línea inferior. N.r.: no realizado.

Paciente	% de inhibición de la unión de IgE a Phl p 5 con antisueros específicos para							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1-P6	Phl p 5
1	0	5	4	0	0	0	0	nr
2	1	10	4	0	0	0	0	nr
3	28	35	28	39	37	38	46	50
4	33	40	33	42	35	45	54	20
5	0	0	3	8	8	0	9	nr
6	46	34	39	47	47	34	21	56
7	41	48	46	49	50	45	49	60
8	41	8	34	18	39	0	0	8
9	6	0	0	0	0	0	0	nr
10	34	46	30	35	39	42	48	38
11	28	0	32	0	28	9	0	nr
12	33	0	27	4	33	0	0	nr
13	30	31	29	0	29	11	15	0

14	46	14	49	17	47	2	8	15
15	48	44	55	22	46	25	23	72
16	41	0	44	24	41	19	8	28
17	52	71	50	57	49	59	73	82
18	43	17	42	0	32	0	10	0
19	5	17	19	16	7	0	4	nr
20	42	54	43	38	38	41	48	65
21	39	51	46	43	43	43	40	39
22	44	49	44	46	44	40	50	70
23	38	54	40	42	48	40	50	66
24	23	0	15	0	0	0	0	nr
25	0	35	0	8	4	28	43	nr
26	51	26	31	21	24	0	19	nr
27	14	15	3	0	9	11	25	nr
28	9	0	17	0	9	0	0	nr
29	10	44	11	31	21	28	24	73
media	28,5	25,8	28,2	20,9	27,8	19,3	23,0	43,6

Ejemplo 18: Los péptidos derivados de *Phl p 5* inducen bajas respuestas linfoproliferativas específicas.

18.1. Ensayos de linfoproliferación

5 Con el fin de identificar péptidos con la menor reactividad posible frente a células T para minimizar los efectos secundarios relacionados con la terapia, se examinó la reactividad frente a células T mediante ensayos de linfoproliferación. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 2 pacientes alérgicos al polen de gramíneas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech, R.U.). Se 10 cultivaron las CMSP (2×10^5) por triplicado en placas de 96 pocillos (Nunclone; Nalge Nunc International, Dinamarca) en 200 μ l de medio de cultivo Ultra libre de suero (BioWhittaker, Rockland, ME) complementado con L-glutamina 2 mM (SIGMA, EE.UU.), beta-mercaptoetanol 50 μ M (SIGMA) y 0,1 mg de gentamicina por ml (SIGMA) a 37°C y CO₂ al 5% en una atmósfera humidificada. Se estimularon las células con diferentes concentraciones de péptidos 15 sintéticos (1,25, 0,6 y 0,3 μ g por pocillo) y, para comparación, con 4 U de interleucina 2 por pocillo (Boehringer Mannheim, Alemania) y con medio solo. Tras 6 d de cultivo se añadieron 0,5 μ Ci por pocillo de [³H]timidina (Amersham Pharmacia Biotech) y 16 h después se midió la radiactividad incorporada mediante recuento de 20 centelleo de líquidos usando un contador de centelleo Microbeta (Wallac ADL, Alemania). Se calcularon las cpm medias a partir de los triplicados y se calcularon los índices de estimulación (IE) como el cociente de las cpm obtenidas mediante estimulación con antígeno o interleucina 2 y el control no estimulado.

25 Se estimularon CMSP de pacientes alérgicos al polen de hierba timotea con diferentes concentraciones de péptidos sintéticos. Los índices de estimulación con péptidos fueron significativamente menores que con IL2. Los péptidos derivados de *Phl p 5* indujeron bajas respuestas linfoproliferativas específicas. La menor respuesta se observó con péptido 5 seguido por péptido 4.

Ejemplo 19: Características de péptidos sintéticos derivados de *Fel d 1*

Con el fin de obtener péptidos adecuados para la vacunación contra la alergia a gatos, se diseñaron cinco péptidos 30 que tenían de 30 a 36 aminoácidos de longitud y cubrían toda la molécula, según la secuencia de aminoácidos conocida de *Fel d 1*.

35 Se sintetizaron los péptidos usando una estrategia de Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) con activación con HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametiluronio) (ciclos a escala pequeña de 0,1 mmol) en el sintetizador de péptidos de Applied Biosystems modelo 433A (EE.UU.). Se usaron resinas precargadas de PEG-PS (polietilenglicol-poliestireno) (carga de 0,15-0,2 mmol/g) (PerSeptive Biosystems, RU) como fase sólida para construir los péptidos. Los productos químicos se adquirieron de Applied Biosystems. Se confirmó el acoplamiento de aminoácidos monitorizando la conductividad en un sistema de control de realimentación. Se añadió un residuo de cisteína a los péptidos 1, 3, 4 y 5 para facilitar el acoplamiento a portadores (tabla 7). Se escindieron los péptidos de 40 las resinas con una mezcla de 250 μ l de agua destilada, 250 μ l de triisopropilsilano (Fluka, Suiza), 9,5 ml de TFA durante 2 h y se precipitó en terc-butil metil éter (Fluka, Suiza) (Focke 2001). Se comprobó la identidad de los péptidos mediante espectrometría de masas y se purificaron los péptidos hasta una pureza de >90% mediante HPLC preparativa (PiChem, Austria).

45 Tabla 7: Características moleculares de péptidos sintéticos derivados de *Fel d 1*. Se muestran la posición dentro de la molécula de *Fel d 1* nativa, la secuencia de aminoácidos, el número de aminoácidos, el peso molecular (PM) calculado y el punto isoelectrónico (pI) teórico de los péptidos sintéticos derivados de *Fel d 1*. Todos los péptidos son solubles en agua.

	Posición	Secuencia de aminoácidos	Longitud de aa	PM	pl
Pépt. 1 SEQ ID NO. 15	cadena 1, aa 1-34	EICPAVKRDVDLFLTGT-DEYVEQVAQYKALPVVC	35	3911	4,30
Pépt. 2 SEQ ID NO. 16	cadena 1, aa 35-70	LENARILKNCVDAKMTEEDKEN-ALSLLDKIYTSPLC	36	4083	4,72
Pépt. 3 SEQ ID NO. 17	cadena 2, aa 1-34	VKMAITCPIFYDVFFAVANG-NELLLDLSLTKVNAC	35	3835	4,56
Pépt. 4 SEQ ID NO. 18	cadena 2, aa 35-63	TEPERTAMKKIQDCYVENG-LISRVLGLVC	30	3382	4,93
Pépt. 5 SEQ ID NO. 19	cadena 2, aa 64-92	CMTTISSSKD-CMGEAVQNTVEDLKLNTLGR	30	3246	4,78

Los cinco péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 tienen pesos moleculares en el intervalo de 3246 a 4083 Dalton y tienen puntos isoelectrómicos calculados de desde 4,30 hasta 4,93. Los cinco péptidos son solubles en agua y los péptidos 1, 2 y 3 pueden contener epítopenos de células T humanas (tabla 7).

5

Tabla 8. Reactividad frente a IgE reducida de péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 en comparación con rFel d 1

Paciente	sexo	edad	IgE							
			IgE total (kU/l)	específica de caspa de gato (kUA/l)	rFel d 1 (D.O.)	Péptido 1 (D.O.)	Péptido 2 (D.O.)	Péptido 3 (D.O.)	Péptido 4 (D.O.)	Péptido 5 (D.O.)
1	m	36	>2000	48,2	2,314	0,112	-	-	-	0,056
2	h	27	798	62,2	2,255	0,069	0,123	-	-	0,140
3	h	33	153	9,48	1,394	-	-	-	-	-
4	h	25	122	13,2	1,194	1,998	0,113	0,186	-	0,073
5	m	42	267	42,1	1,793	0,074	-	-	-	0,677
6	m	35	494	37,0	2,007	-	-	-	-	0,204
7	h	27	129	31,3	2,259	-	-	-	-	0,149
8	h	36	1150	13,5	1,384	-	-	-	-	0,130
9	m	32	580	17,3	0,569	-	-	-	-	-
10	m	22	189	4,65	0,553	0,051	-	-	-	0,057
11	m	53	>2000	>100	2,838	0,504	-	-	-	0,644
12	m	75	4567	47,3	2,519	-	0,060	-	-	0,161
13	h	34	>2000	40,0	1,244	-	-	-	-	-
14	h	n.d.	n.d.	1,99	0,178	-	-	-	-	-
NHS	m	27	<2	<0,35	-	-	-	-	-	-

Ejemplo 20: Los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 tienen reactividad frente a IgE reducida en comparación con rFel d 1 y los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 carecen de actividad alergénica

10

Se investigó la reactividad de IgE sérica frente a los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 con el fin de identificar péptidos hipoalergénicos adecuados para la vacunación.

15

El diagnóstico de alergia a gatos mediada por IgE se basó en anamnesis, pruebas de punción cutánea (Allergopharma, Reinbek, Alemania) y medición de la IgE sérica total así como de IgE sérica específica de caspa de gato (CAP-FEIA, Pharmacia Diagnostics, Suecia). Se incluyeron personas no alérgicas con fines de control.

20

20.1. Capacidad de unión a IgE medida en ensayos ELISA
Se comparó la capacidad de unión a IgE de los cinco péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 con la del alérgeno rFel d 1 completo usando sueros de 14 pacientes alérgicos a gatos. Se recubrieron placas de ELISA (Nunc Maxisorb, Dinamarca) con péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 o rFel d 1 como control (0,5 µg/pocillo), se lavaron y se bloquearon. Entonces se incubaron las placas durante la noche a 4°C con sueros diluidos a 1:5 de pacientes alérgicos a gatos y de un individuo no atópico. Se detectaron los anticuerpos IgE unidos con un anticuerpo anti-IgE humana marcado con peroxidasa del rábano diluido a 1:2500 (KPL, EE.UU.).

25

Se sometieron sueros de 7 mujeres y 7 hombres alérgicos a gatos con una edad de 22 a 75 años a determinaciones de CAP-FEIA. Los niveles de IgE total medidas oscilaron entre 122 y >4000 kU/l y los niveles de IgE específica de caspa de gato entre 1,99 y >100 kUA/l (tabla 7). En los ensayos ELISA se confirmó la reactividad de IgE de los 14 sueros sometidos a prueba frente al alérgeno de gato principal Fel d 1. Los resultados se obtuvieron como densidades ópticas (DO) y oscilaron entre 0,178 y 2,838 unidades de DO. Se midió la reactividad de IgE de los 14 sueros frente a los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 en el mismo ensayo ELISA. Se encontró que la unión a IgE se mantenía para los péptidos 1, 2, 3 y 5. Se observó unión de IgE para 6/14 sueros frente al péptido 1, para

3/14 sueros frente al péptido 2, para 1/14 sueros frente al péptido 3 y para 10/14 sueros para el péptido 5. Las unidades de DO medidas fueron de entre 0,051 y 1,998 para el péptido 1, de entre 0,060 y 0,123 para el péptido 2, de 0,186 para el péptido 3 y de entre 0,056 y 0,677 para el péptido 5. En resumen, todas la unidades de DO medidas fueron considerablemente inferiores a los valores respectivos medidos para el alérgeno Fel d 1 completo.

5 Esto demuestra que los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 tienen una reactividad frente a IgE reducida en comparación con el alérgeno Fel d 1 completo. Los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 pueden considerarse por tanto hipoalergénicos, proporcionando la ventaja de efectos secundarios mediados por IgE reducidos, cuando se usan en SIT.

10 20.2. Inducción específica de expresión de los marcadores de superficie CD203c y CD63 en basófilos humanos (figura 17)

15 Puesto que la unión a IgE es un requisito previo aunque no abundante para la inducción de reacciones alérgicas de tipo 1 que también requieren reticulación de IgE específico unido a células efectoras, se investigó la actividad alergénica real de péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 en ensayos de activación de basófilos. Estos ensayos detectan una regulación por incremento específica de alérgeno de los marcadores de superficie CD203c y CD63, ambos reconocidos como marcadores para la activación de basófilos (Hauswirth *et al.* J Allergy Clin Immunol. (2002) 110:102-109).

20 Se extrajeron muestras de sangre heparinizada de 5 pacientes alérgicos a gatos tras obtenerse el consentimiento informado. Se incubaron alícuotas de sangre (100 µl) con diluciones en serie de rFel d 1, péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 como componentes individuales o como mezcla equimolar, anticuerpo anti-IgE o tampón (PBS) durante 15 minutos a 37°C. Tras la incubación, se lavaron las células en PBS que contenía EDTA 20 mM. Entonces se incubaron las células con 10 µl de AcM 97A6 frente a CD203c conjugado con PE y 20 µl de AcM CLB-gran12 frente a CD63 conjugado con FITC durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se sometieron las muestras a lisis de eritrocitos con 2 ml de disolución de lisis FACS™. Entonces se lavaron las células, se resuspendieron en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo de dos colores en un dispositivo FACScan (Becton Dickinson, EE.UU.), usando el software Paint-a-Gate. Se calculó la regulación por incremento inducida por alérgeno de CD203c y CD63 a partir de las intensidades de fluorescencia medias (IFM) obtenidas con células estimuladas (IFMestim) y no estimuladas (IFMcontrol), y se expresó como índice de estimulación (IFMestim: IFMcontrol). Un IE de más de 2,0 (es decir, una regulación por incremento de más de 2 veces) se consideró indicativo de una respuesta específica (diagnóstico).

35 En los basófilos de los cinco pacientes alérgicos a gatos estudiados (RR, EB, KC, MG y SM) la estimulación con rFel d 1 indujo una regulación por incremento específica de alérgeno de los marcadores de superficie CD203c y CD63. Se observó que la regulación por incremento de CD203c y CD63 era dependiente de la dosis para 4/5 pacientes (RR, KC, MG y SM). Para estos pacientes, los índices de estimulación de CD203c oscilaron entre 1,1 (SM) y 3,2 (RR) para la concentración sometida a prueba más baja de 0,001 µg de rFel d 1/ml y entre 3,6 (KC) y 6,2 (RR) para la concentración sometida a prueba más alta de 10 µg de rFel d 1/ml. Los índices de estimulación de CD63 determinados en el mismo ensayo oscilaron entre 1,1 (RR) y 2,0 (MG) para la concentración de rFel d 1 sometida a prueba más baja de 0,001 µg/ml y entre 3,9 (RR) y 7,3 (MG) para la concentración de rFel d 1 sometida a prueba más alta de 10 µg/ml. Para el paciente EB, Fel d 1 0,001 µg/ml ya fue suficiente para inducir una regulación por incremento de alto nivel de los marcadores de superficie CD203c y CD63 evitando una observación de la dependencia de la dosis de la regulación por incremento de los marcadores de superficie.

40 Se analizaron con sonda los basófilos de los cinco pacientes alérgicos a gatos con cinco concentraciones crecientes (0,005, 0,05, 0,5, 5 y 50 µg/ml) de una mezcla equimolar de los cinco péptidos sintéticos derivados de Fel d 1. Se analizaron mediante sonda adicionalmente los basófilos del paciente RR con cinco concentraciones crecientes de los cinco péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 individuales (0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 µg/ml). Se encontró que los péptidos eran deficientes en la regulación por incremento de los marcadores de superficie CD203c y CD63 de basófilos. Los péptidos no pudieron inducir ninguna expresión aumentada de CD203c y CD63 en las células de los pacientes RR, KC y SM. Pudo detectarse una ligera regulación por incremento de CD203c (IE=2,3) y de CD63 (IE=2,5) para el paciente MG pero sólo a la concentración sometida a prueba más alta de 50 µg de mezcla de péptidos/ml, mientras que las concentraciones más bajas aplicadas tampoco tuvieron efecto de estimulación. Se observó una regulación por incremento más pronunciada de CD203c (IE=4,2) y CD63 (IE=4,3) para el paciente EB, pero de nuevo sólo para la concentración de mezcla de péptidos sometida a prueba más alta. En ambos casos, en los pacientes MG y EB, la tasa de regulación por incremento tras la estimulación con péptidos fue considerablemente más baja que los valores correspondientes para la estimulación con el alérgeno Fel d 1 completo.

45 Esto demuestra que los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 proporcionan la ventaja de mantener una actividad alergénica más baja que la del alérgeno Fel d 1 completo. Esto es relevante para un riesgo disminuido de efectos secundarios mediados por IgE cuando se usan péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 en SIT.

Ejemplo 21: La inmunización con péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 induce anticuerpos IgG reactivos con el alérgeno rFel d 1 completo

- 5 Se mostró que los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 eran deficientes en la unión a IgE. Como moléculas candidatas para la vacunación, que tienen por objeto la inducción de anticuerpos IgG específicos de alérgeno, los péptidos deben conservar estructuras de alérgeno específicas y todavía deben poder inducir una respuesta inmunitaria de IgG específica para el alérgeno completo. Con el fin de averiguar si los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 cumplen estos requisitos, se realizaron experimentos de inmunización en conejos.
- 10 Se inmunizaron conejos con rFel d 1 no acoplado y péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 acoplados a KLH. Se acoplaron los péptidos purificados mediante HPLC a KLH a través de sus residuos de cisteína, usando un kit de conjugación con inmunógeno activado por maleimida Imject (Pierce, EE.UU.).
- 15 Se inmunizaron conejos (conejos blancos de Nueva Zelanda) con los inmunógenos (200 µg/inyección) usando CFA (primera inmunización) e IFA (primera inyección de refuerzo tras 4 semanas; se administró una segunda inyección de refuerzo con adyuvante incompleto tras 7 semanas) (Charles River Breeding Laboratories, Alemania). Se extrajeron muestras de sangre de los conejos 8 semanas tras la primera inmunización y después a intervalos de cuatro semanas.
- 20 25 Se monitorizó la inducción de anticuerpos específicos de rFel d 1 y péptidos en ensayos ELISA. Se recubrieron placas de ELISA (Nunc Maxisorb, Dinamarca) con rFel d 1 (0,5 µg/pocillo), se lavaron y se bloquearon. Entonces se analizó con sonda rFel d 1 unido a las placas por duplicado con antisueros de conejo diluidos a 1:1000 y los sueros preinmunitarios de conejo correspondientes y se detectó la IgG unida con un antisuero de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa del rábano diluido a 1:2000 (Jackson ImmunoResearch Inc., EE.UU.). Se calcularon las medias de los duplicados y se mostraron errores de menos del 5%.
- 30 35 La inmunización con péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 induce anticuerpos IgG reactivos con Fel d 1. Ocho semanas tras la primera inmunización con cada uno de los cinco péptidos sintéticos derivados de Fel d 1, pudieron detectarse anticuerpos IgG reactivos con el alérgeno Fel d 1 completo en cada uno de los cinco antisueros de conejo. Los niveles de anticuerpo IgG permanecieron a niveles comparables en las tomas de muestra de sangre posteriores (figura 16).
- 40 Esto indica que los 5 péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 son moléculas candidatas para inducir una respuesta de anticuerpos IgG específica de Fel d 1.
- 45 50 55 60 65 Ejemplo 22: Los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 inducen respuestas linfoproliferativas más débiles que Fel d 1
- Las moléculas candidatas deseadas para SIT mejorada no sólo ofrecen la ventaja de efectos secundarios mediados por IgE reducidos, sino también de efectos secundarios mediados por células T reducidos. Con el fin de investigar las propiedades de activación de células T de los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1, se realizaron ensayos linfoproliferativos.
- Se aislaron CMSp de 7 pacientes alérgicos a gatos mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech, RU). Se cultivaron CMSp (2×10^5) por triplicado en placas de 96 pocillos (Nunclon, Nalgene Nunc International, Dinamarca) en 200 µl de medio de cultivo Ultra libre de suero (Cambrex, Bélgica) complementado con L-glutamina 2 mM (Sigma, EE.UU.), β-mercaptopropano 50 µM (Sigma) y 0,1 mg de gentamicina por ml (Sigma) a 37°C usando CO₂ al 5% en una atmósfera humidificada. Se estimularon las células con diferentes concentraciones (5, 2,5, 1,25 y 0,6 µg/pocillo) de rFel d 1 y péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 como componentes individuales o como mezcla equimolar y, con fines de control, con 4 U de interleucina 2 o con medio solo. Tras 6 días de cultivo, se añadieron 0,5 µCi por pocillo de ³H-timidina (Amersham Pharmacia Biotech) y 16 h después se midió la radiactividad incorporada mediante recuento de centelleo de líquidos usando un contador de centelleo Microbeta (Wallac ADL, Alemania), y se calcularon las cpm medias a partir de los triplicados. Se calculó el índice de estimulación (IE) como el cociente de las cpm obtenidas mediante estimulación con antígeno o interleucina 2 y el control de medio no estimulado.
- La IL-2 estimuló la proliferación de CMSp de los 7 pacientes alérgicos a gatos sometidos a prueba, dando como resultado índices de estimulación de 9,8 para RR, de 5,2 para EB, de 3,2 para KC, de 6,7 para MG, de 6,3 para SM, de 15,7 para RA y de 13,9 para AR.
- Los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 indujeron índices de estimulación más bajos (tabla 9).

Tabla 9: Pueden identificarse péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 que en una base equimolar inducen respuestas linfoproliferativas más débiles que Fel d 1. Se estimularon CMSP de 7 pacientes alérgicos a gatos con diluciones en serie de rFel d 1 o péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 como componentes individuales. Las respuestas linfoproliferativas específicas se muestran como índices de estimulación.

		5 µg/p	2,5 µg/p	1,25 µg/p	0,6 µg/p
Paciente RR	rFel d 1	2,6	1,8	1,5	1,9
	Péptido 1	1,9	0,6	1,3	1,5
	Péptido 2	2,1	1,3	2,0	1,6
	Péptido 3	3,5	2,8	2,0	3,0
	Péptido 4	2,5	2,4	1,5	0,8
	Péptido 5	1,7	0,9	2,3	0,7
Paciente EB	rFel d 1	8,2	2,9	1,6	1,5
	Péptido 1	1,3	0,9	1,0	1,2
	Péptido 2	2,4	1,7	1,8	1,6
	Péptido 3	1,1	1,2	1,4	1,7
	Péptido 4	3,6	3,6	3,2	2,3
	Péptido 5	2,2	2,1	1,4	2,1
Paciente KC	rFel d 1	0,8	1,2	1,3	5,2
	Péptido 1	0,7	1,0	1,1	1,1
	Péptido 2	1,2	1,5	1,0	1,1
	Péptido 3	0,6	0,5	0,5	0,6
	Péptido 4	1,6	1,4	1,3	1,1
	Péptido 5	1,3	1,4	0,9	1,4
Paciente MG	rFel d 1	2,9	2,3	2,3	2,2
	Péptido 1	1,8	1,4	1,4	1,1
	Péptido 2	1,2	1,3	1,4	0,9
	Péptido 3	1,1	0,5	0,6	0,7
	Péptido 4	1,1	1,5	1,8	1,0
	Péptido 5	1,5	1,2	1,6	0,8
Paciente SM	rFel d 1	2,3	1,6	1,8	1,1
	Péptido 1	1,1	1,0	0,8	1,0
	Péptido 2	1,8	1,1	1,3	1,2
	Péptido 3	2,6	2,1	2,1	1,5
	Péptido 4	1,9	1,6	1,7	1,1
	Péptido 5	2,3	1,3	1,4	1,0
Paciente RA	rFel d 1	3,2	1,2	2,4	1,2
	Péptido 1	0,8	0,7	1,3	1,1
	Péptido 2	1,2	0,5	1,7	1,6
	Péptido 3	2,0	2,3	1,6	0,9
	Péptido 4	3,0	1,3	1,1	0,6
	Péptido 5	0,4	0,6	0,9	0,9
Paciente AR	rFel d 1	1,4	0,6	0,9	1,0
	Péptido 1	1,0	0,5	1,7	0,7
	Péptido 2	0,7	0,6	0,9	0,6
	Péptido 3	1,6	1,6	2,1	1,0
	Péptido 4	1,0	0,7	0,7	0,6
	Péptido 5	0,8	0,5	0,3	0,5

Ejemplo 23: Los anticuerpos IgG inducidos por inmunización con péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 inhiben la unión de IgE de pacientes alérgicos a gatos al alérgeno Fel d 1 completo

10 Se examinó la capacidad de la Ig de conejo inducida por péptido para inhibir la unión de los anticuerpos IgE de pacientes alérgicos a rFel d 1 completo en ensayos de competencia de ELISA. Se recubrieron placas de ELISA (Nunc Maxisorb, Dinamarca) con rFel d 1 (0,05 µg/pocillo), se lavaron y se bloquearon. Entonces se preincubó rFel d 1 unido a las placas con antisueros de conejo anti-péptido diluidos a 1:100 (se usaron antisueros anti-péptido individuales así como una mezcla antisueros anti-péptido), antisuero de conejo anti-rFel d 1 y, con fines de control, también con los sueros preinmunitarios de conejo respectivos. Una vez lavadas las placas, se incubaron con sueros humanos diluidos a 1:5 de pacientes alérgicos a gatos. Se detectaron los anticuerpos IgE unidos con un anticuerpo anti-IgE humana marcado con peroxidasa del rábano diluido a 1:2500 (KPL, EE.UU.). Se calculó el porcentaje de inhibición de la unión a IgE lograda mediante la preincubación con los antisueros anti-péptido de la siguiente manera: % de inhibición de unión a IgE = 100 - D.O._i / D.O._p x 100, siendo D.O._i la densidad óptica medida tras la preincubación con sueros inmunitarios de conejo y D.O._p con sueros preinmunitarios de conejo.

La preincubación de Fel d 1 unido a placas de ELISA con los 5 antisueros de conejo anti-péptido dio como resultado patrones de inhibición que variaban entre los 14 sueros sometidos a prueba diferentes de pacientes alérgicos a gatos. El antisuero de conejo anti-péptido 1 bloqueó la unión de IgE de pacientes a Fel d 1 para 13/14 sueros de pacientes sometidos a prueba, el antisuero de conejo anti-péptido 2 para 8/14, el antisuero de conejo anti-péptido 3 para 13/14, el antisuero de conejo anti-péptido 4 para 9/14 y el antisuero de conejo anti-péptido 5 para 5/14.

5

Además, el intervalo de inhibición mostró variaciones entre los diferentes antisueros. Entre los antisueros de conejo anti-péptido sometidos a prueba individuales, el antisuero de conejo anti-péptido 1 mostró las mejores tasas de inhibición con inhibiciones desde el 0-55% (promedio del 29%). Con el antisuero de conejo anti-péptido 2, pudieron lograrse tasas de inhibición del 0-18% (promedio del 5%), con el antisuero de conejo anti-péptido 3 del 0-29% (promedio del 11%), con el antisuero de conejo anti-péptido 4 del 0-24% (promedio del 8%) y con el antisuero de conejo anti-péptido 5 del 0-18% (promedio del 4%).

10

Una mezcla de los 5 antisueros de conejo anti-péptido inhibió la unión de IgE de los pacientes a Fel d 1 lo más eficazmente con inhibiciones logradas para todos los sueros de pacientes y tasas de inhibición del 25-84% (promedio del 59%). Estas inhibiciones fueron incluso más pronunciadas que las logradas mediante la preincubación con el antisuero de conejo anti-Fel d 1 (tabla 10).

15

20 Tabla 10: Los antisueros de conejo producidos frente a péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 inhiben la unión de IgE humana a Fel d 1. Se muestra el porcentaje de inhibición de la unión de IgE a Fel d 1 logrado mediante la preincubación de Fel d 1 con antisueros de conejo para 14 pacientes y como medias. Se realizaron preincubaciones con 5 antisueros de conejo producidos frente a los 5 péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 (anti-péptido 1-5), una mezcla de los 5 antisueros anti-péptido (mezcla) y un antisuero producido frente a Fel d 1 (anti-rFel d 1).

Paciente	anti-péptido 1	anti-péptido 2	anti-péptido 3	anti-péptido 4	anti-péptido 5	Mezcla de los 5 antisueros anti-péptido	anti-rFel d 1
1	48	18	29	20	18	78	64
2	24	0	8	0	0	67	43
3	55	11	5	17	8	84	74
4	38	7	11	24	8	66	49
5	10	5	5	12	0	54	48
6	33	0	12	5	0	68	46
7	6	1	10	5	0	58	45
8	44	3	17	10	0	60	53
9	26	17	12	15	16	53	43
10	0	0	10	0	0	31	26
11	38	0	0	0	0	52	56
12	47	0	22	0	7	75	51
13	27	2	8	0	0	56	41
14	16	0	6	5	0	25	25
media	29	5	11	8	4	59	47

25

Cuando se combinaron el antisuero de conejo anti-péptido 1 con cada uno de los otros antisueros anti-péptido, la inhibición de la unión a IgE de pacientes alérgicos aumentó sustancialmente alcanzando casi los valores (por ejemplo anti-péptido 1+4:41%, anti-péptido 1+5:42%) obtenidos con anticuerpos anti-rFel d 1 (67%) (tabla 11).

30

Tabla 11:

Paciente	anti-péptido 1 + anti-péptido 2	anti-péptido 1 + anti-péptido 3	anti-péptido 1 + anti-péptido 4	anti-péptido 1 + anti-péptido 5	anti-rFel d 1
1	61	49	61	63	75
2	24	17	28	28	74
3	60	52	62	57	86
4	43	33	43	40	68
5	m	9	27	30	67
6	37	24	42	46	73
7	26	21	36	34	74
8	51	46	53	55	72
9	40	28	46	43	61
10	16	11	30	34	40
11	45	35	47	45	78
12	52	40	56	59	76
13	29	17	29	32	62
14	7	10	14	16	28

media	36	28	41	42	67
-------	----	----	----	----	----

Ejemplo 24: Los péptidos derivados de Bet v 1 inducen respuestas de IgG específica de Bet v 1 que reciben la ayuda de células T de epítopos de células T derivados de portador y reducen la proliferación de células T específicas de Bet v 1

5 Ya se ha mostrado que los péptidos de células B expuestos en superficie derivados de Bet v 1 inducen una respuesta de IgG específica de Bet v 1 protectora en un modelo de vacunación terapéutica y profiláctica (Focke M *et al.* Clin Exp Allergy (2004) 34:1525-1533). En Focke M *et al.* (2004), se acoplaron 6 péptidos derivados de Bet v 1 a la molécula portadora KLH antes de la inmunización de ratones. En el presente ejemplo se muestra que 10 la respuesta de IgG específica de Bet v 1 inducida con estos péptidos (tabla 1) se dirige con la ayuda de epítopos de células T derivados del portador pero no del alérgeno Bet v 1. Se encontró sorprendentemente que ninguno de los 15 péptidos derivados de Bet v 1 que tenían las secuencias LFPKVAPQAISS-VENIEGNNGPGTIKKISF (SEQ ID NO. 20), GPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDEVD-HTN (SEQ ID NO. 21) y VDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK (SEQ ID NO. 22) inducía respuestas relevantes de células T, y pudo demostrarse que la mayoría de las 20 respuestas de células T se dirigía contra la molécula portadora, KLH (figuras 18 y 19). Este hallazgo es de gran importancia para la reducción de efectos secundarios durante la vacunación terapéutica y para reducir el riesgo de una posible 25 sensibilización durante la vacunación profiláctica. Se ha demostrado en el pasado que los péptidos derivados de alérgenos que carecen de cualquier reactividad frente a IgE pero que contienen epítopos de células T derivados de alérgeno inducían efectos secundarios debido a la activación de las células T. Los péptidos derivados de alérgenos que carecen de reactividad frente a células T e IgE tal como se muestra a modo de ejemplo para los péptidos de 30 Bet v 1, no inducen efectos secundarios ni mediados por IgE ni por células T durante la vacunación terapéutica. Cuando se usan para la vacunación profiláctica, los péptidos inducirán una respuesta de IgG protectora específica de Bet v 1 sin sensibilización de células T específicas de Bet v 1. Esto minimizará el riesgo de sensibilizar previamente una respuesta inmunitaria alérgica a través de la vacuna, lo que puede preparar el camino para una 35 sensibilización alérgica posterior.

En este ejemplo se estudiaron las respuestas de células T específicas de alérgeno y portador en un modelo de ratón de vacunación con alérgeno terapéutica y profiláctica. Se eligieron los péptidos derivados de Bet v 1 2, 3 y 6 (Focke M *et al.* (2004)) y se sometieron a prueba para determinar si contenían cualquiera de los epítopos de células T específicos de Bet v 1 en ratones BALB/c. Se inmunizaron los ratones de la siguiente manera (la tabla 10 muestra el protocolo de sensibilización y tratamiento): Se inmunizaron grupos de ratones BALB/c (n=5) con 10 µg de Bet v 1 recombinante (Biomay, Austria) y/o una mezcla de los péptidos 2, 3 y 6 sintéticos derivados de Bet v 1 (10 µg de cada uno). Se acoplaron los péptidos a KLH tal como se describió anteriormente (Focke M *et al.* (2004)). Para la inmunización, se adsorbieron Bet v 1 y la mezcla de péptidos en hidróxido de aluminio (Alu-Gel-S, Serva, Alemania) en un volumen total de 150 µl/ratón.

Tabla 12: Protocolo de sensibilización y tratamiento.

grupos (n=5)	Sensibilización (rBet v 1)	Terapia (péptidos KLH)
Sin sensibilización / sin terapia (S-/T-)	-	-
Sensibilización / sin terapia (S+/T-)	día 0, 20, 40	-
Sin sensibilización / terapia (S-/T+)	-	día 60, 80, 100
Sensibilización / terapia (S+/T+)	día 0, 20, 40	día 60, 80, 100
	Profilaxis (péptidos KLH)	Sensibilización (rBet v 1)
Sin profilaxis / sensibilización (P-/S+)	-	día 60, 80, 100
Profilaxis / sin sensibilización (P+/S-)	día 0, 20, 40	-
Profilaxis / sensibilización (P+/S+)	día 0, 20, 40	día 60, 80, 100

40 Se analizó la linfoproliferación específica de alérgeno, péptido y portador en un ensayo de proliferación de células T. Se extirparon bazos en condiciones estériles y se homogeneizaron. Tras la lisis de los eritrocitos, se lavaron las células y se resuspendieron en medio completo (RPMI, suero bovino fetal al 10%, gentamicina 0,1 mg/ml, glutamina 2 mM). Se sembraron en placa suspensiones de células individuales en placas de fondo redondo de 96 pocillos a una concentración de 2×10^5 células/pocillo y se estimularon con concavalina A (0,5 µg/pocillo) como control positivo, rBet v 1 (2 pg/pocillo), KLH (2 µg/pocillo), la mezcla de péptidos (0,34 µg de cada péptido/pocillo) o el medio solo durante 4 días. Se pulsaron los cultivos con 0,5 µCi/pocillo de timidina tritiada durante 16 h y se recogieron. Se midieron las respuestas de proliferación mediante recuento de centelleo. Se calculó la razón de la proliferación media tras la estimulación con antígeno y los valores de control con medio, es decir el índice de estimulación (IE).

45 Resulta interesante que pudo mostrarse que la vacunación terapéutica con péptidos derivados de Bet v 1 pudo reducir la proliferación específica de Bet v 1 en ratones sensibilizados con Bet v 1 (grupo S+/T+) en comparación con el grupo sensibilizado pero no tratado S-/T-. En el grupo sensibilizado y tratado, no pudo medirse proliferación específica de péptido, pero según el efecto del portador, se observó una proliferación específica de KLH. La vacuna con péptido sola (grupo S-/T+) indujo principalmente células T específicas de KLH, pero casi ninguna respuesta de 50 células T específica de Bet v 1 (figura 18).

5 La vacunación profiláctica con los péptidos casi no indujo proliferación específica de Bet v 1 (grupo P+/S-) en comparación con el grupo sensibilizado con Bet v 1, P-/S+, pero sí proliferación específica de KLH. En ratones vacunados de manera profiláctica y sensibilizados posteriormente (grupo P+/S+) se redujo notablemente la proliferación específica de Bet v 1, además no pudo observarse ninguna respuesta específica de péptido en ningún grupo de ratones (figura 19).

10 10 Por tanto, pudo mostrarse en un modelo de ratón de alergia que la vacunación profiláctica con péptidos de células B derivados de alérgeno unidos a portador no sensibilizaba las células T específicas de péptido, y casi no lo hacía en células T específicas de portador pero no específicas de alérgeno. La vacunación profiláctica que precede a la sensibilización alérgica pero también la vacunación terapéutica de ratones sensibilizados reduce la proliferación de células T específicas de alérgeno.

15 15 El tratamiento profiláctico con péptidos derivados de Bet v 1 indujo respuestas de IgG específica de Bet v 1 sin ayuda de células T específicas de Bet v 1. Además, el tratamiento profiláctico aumentó las respuestas de IgG específica de Bet v 1 inducidas por el alérgeno Bet v 1 ya 20 y 40 días tras la primera sensibilización (figura 20).

20 20 Estos resultados demuestran que la vacuna con péptido induce una respuesta de IgG específica de Bet v 1 que puede reforzarse por la exposición al alérgeno.

Ejemplo 25: Péptidos derivados de Der p 2 que muestran capacidad de unión a IgE reducida

25 25 Se determinó la capacidad de unión a IgE de péptidos derivados de Der p 2 tal como se describió en los ejemplos 15.1 y 20.1 empleando los péptidos según la tabla 13 y usando sueros de individuos que padecen alergia a ácaros del polvo doméstico.

Tabla 13: péptidos derivados de Der p 2

Péptido	Posición	Secuencia	SEQ ID NO.
Pep 1 de Der p 2	1-33	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGK	96
Pep 2 de Der p 2	21-51	CHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNSKTAK	97
Pep 3 de Der p 2	42-73	EANQNSKTAKIEIKASIEGLEVDVPGIDPNAC	98
Pep 4 de Der p 2	62-103	EVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYDIKYTWIVP- KIAPKSEN	99
Pep 5 de Der p 2	98-129	APKSENVVVTVKVMGDNGVLACAIATHAKIRD	100

30 30 Los resultados muestran claramente que los péptidos derivados de Der p 2 de la presente invención presentan capacidad de unión a IgE significativamente reducida.

Tabla 14: Resultados

	rDer p 2	péptido 1	péptido 2	péptido 3	péptido 4	péptido 5
Medias (n=50)	1,080	0,010	0,015	0,004	0,031	0,006

Ejemplo 26: Las variaciones en la longitud de los péptidos no tienen ningún efecto sobre la capacidad de unión a IgE de los péptidos, la reactividad frente a células T y la inmunogenicidad.

40 40 26.1. Diseño de péptidos

Para estudiar el efecto de la variación en la longitud de los péptidos sobre la capacidad de unión a IgE, la reactividad frente a células T y la inmunogenicidad se diseñaron variantes de péptidos derivados de Phl p 5 aumentando la longitud del péptido 1 (P1) y disminuyendo la longitud del péptido 2 (P2) en algunos aminoácidos (tabla 15).

45 45 Tabla 15: Posición, secuencia, longitud en número de aminoácidos y peso molecular de péptidos derivados de Phl p 5 sintéticos (1, 2) y variantes de los mismos (1a, 2b)

Tabla 15: Variantes de péptidos sintéticos derivados de Phl p 5

	Posición de aa	Secuencia	Número de aa	Peso molecular (PM)
Péptido 1	98-128	CGAASNKAFAEGLSGEPKGAAESSSSKAALTSK	32	3026
	93-128	CFVATFGAASNKAFAEGLSGEPKGAAESSSSKAALTSK	37	3592
Péptido 2	26-58	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAPAGKC	34	3068
	26-53	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAC	29	2644

26.2. Falta de reactividad frente a IgE

Para analizar la reactividad frente a IgE de los péptidos derivados de Phl p 5 1, 2 y sus variantes 1a, 2b, se realizaron ensayos de transferencia puntual aplicando 0,2 µg de péptido/punto y usando sueros de 7 pacientes alérgicos al polen de gramíneas (p1-p7) y el suero de un individuo no atópico (NHS). Se detectó IgE unida con anticuerpo anti-IgG humana marcado con ¹²⁵I (Phadia, Uppsala, Suecia). Se usó rPhl p 5 como control positivo y HSA como control negativo. Los pacientes reaccionan con rPhl p 5 pero no con los péptidos ni las variantes de péptidos (figura 21).

10 26.3. Respuestas linfoproliferativas

Se estimularon CMSP de 2 pacientes alérgicos al polen de gramíneas con diferentes concentraciones de los péptidos derivados de Phl p 5 1, 2, sus variantes 1a, 2b y, con fines de control, con rPhl p 5. Los índices de estimulación obtenidos con los péptidos fueron significativamente más bajos que los obtenidos con rPhl p 5 (figura 22).

15 26.4. Inmunogenicidad de las variantes de péptidos

20 Se inmunizaron conejos con péptidos derivados de Phl p 5 acoplados a KHL y sus variantes. Se usaron experimentos de ELISA para medir la reactividad de IgG de los antisueros de conejo obtenidos frente a los péptidos y sus variantes (tabla 16). La inmunización con los péptidos y sus variantes indujo anticuerpos IgG con reactividad cruzada que reconocían el péptido y la variante correspondiente.

25 Tabla 16: Reactividad cruzada de antisueros anti-péptido Phl p 5 producidos en conejos mediante inmunización con péptidos conjugados con KLH. Se representan las reactividades frente a IgG de los antisueros de péptidos frente a los péptidos (1, 2) y sus variantes (1a, 2b). No se observó reactividad con los sueros preinmunitarios (pre P1, pre P1a, pre P2, pre P2b)

30 a. El antisero anti-péptido 1 (anti-P1) presenta reactividad cruzada con la variante del péptido 1 (1a) y el antisero anti-péptido 1a (anti-P1a) presenta reactividad cruzada con el péptido 1

35 b. Antisero anti-péptido 2 (anti-P2) presenta reactividad cruzada con la variante del péptido 2 (2b) y el antisero anti-péptido 2b (anti-P2b) presenta reactividad cruzada con el péptido 2.

35 Tabla 16: Reactividad cruzada de antisueros de conejo

a)	Pre-P1	anti-P1	pre-P1a	anti-P1a
P1	0,041	0,880	0,052	0,947
P1a	0,038	0,705	0,048	0,859
b)	pre-P2	anti-P2	pre-P2b	anti-P2b
P2	0,089	1,168	0,042	1,175
P2b	0,075	0,954	0,053	1,122

26.5. Los antisueros de conejo inducidos por péptidos inhiben la unión de IgE de pacientes alérgicos al polen de gramíneas a rPhl p 5

40 Se estudió la capacidad de IgG de conejo anti-péptido 2 y 2b para inhibir la unión de la IgE humana a rPhl p 5 en ELISA de competencia. Se preincubó rPhl p 5 unido a placas de ELISA con antisueros anti-P2, anti-P2b y, con fines de control, con anti-Phl p 5. Entonces se expusieron las placas a sueros de 12 pacientes alérgicos al polen de gramíneas. En la tabla 17 se representa el porcentaje de inhibición de la unión de IgE a rPhl p 5. Los antisueros anti-péptido 2 y anti-péptido 2b inhiben la unión de IgE de los pacientes a rPhl p 5 en el mismo grado.

45 También se realizaron ELISA de competencia con antisueros de conejo anti-péptido 1 y 1a. En el ejemplo 17 (la inmunización con péptidos derivados de Phl p 5 induce anticuerpos IgG que inhiben la unión de IgE de pacientes alérgicos al polen de gramíneas a Phl p 5) los anticuerpos anti-péptido 1 (P1) inhibían la unión de IgE de pacientes a Phl p 5 con una tasa de inhibición media del 28,5%. Se obtuvieron resultados similares con antisero anti-péptido 1a que produjo una tasa de inhibición del 23,7%.

50 Tabla 17: Inhibición de la unión de IgE de pacientes a rPhl p 5 por antisueros anti-péptido. Los antisueros anti-péptido 2 y anti-péptido 2b inhiben la unión de IgG de pacientes a rPhl p 5 en el mismo grado. Se preincubó rPhl p 5 unido a placas de ELISA con antisueros anti-P2, anti-P2b y, con fines de control, con anti-Phl p 5. Entonces se expusieron las placas a sueros de 12 pacientes alérgicos al polen de gramíneas. Se representa el porcentaje de inhibición de la unión de IgE a rPhl p 5.

Tabla 17: % de inhibición de la unión de IgE

paciente	anti-P2	anti-P2b	anti-Ph1 p 5
1	33,38	24,40	84,77
2	52,20	57,40	87,00
3	52,70	54,85	90,81
4	51,44	59,76	78,26
5	43,19	49,15	77,93
6	47,04	52,02	83,68
7	62,67	58,00	76,62
8	52,36	50,27	74,44
9	57,63	50,91	88,13
10	35,10	37,99	75,03
11	44,44	41,24	68,39
12	47,56	45,41	77,34

Ejemplo 27: Protección cruzada de anticuerpos anti-VP1

5 Los rinovirus humanos comprenden más de cien cepas diferentes. En esta prueba de neutralización se muestra que la infección por rinovirus de una cepa también puede inhibirse por anticuerpos específicos de VP1 de otra cepa. Se sembraron células HeLa en los pocillos a igual densidad. Se preincubó HRV14 a 100DCT₅₀ con diluciones de anticuerpos anti-14VP1 y anti-89VP1 (sin diluir; 1:2-1:32 pocillos 1-6) y se añadió a los pocillos en los carriles A y D, respectivamente. En los carriles B y C, se añadió a las células HRV 89 a 100CCT₅₀ preincubado con diluciones de anticuerpos anti-14VP1 y anti-89VP1, respectivamente. Tras 3 días, se tiñeron las células vivas de color violeta. Los anticuerpos anti-89VP1 y los anticuerpos anti-14VP1 bloquean la infección de HRV14 de manera comparable. Los anticuerpos producidos frente a 14VP1 y 89VP1 también inhiben la infección de HRV89 hasta la misma concentración.

15 **Lista de secuencias**

20 <110> Biomay AG
 25 <120> Portador de vacuna
 <130> R 49994
 <150> Documento AT A 994/2006
 <151> 09-06-2006
 <160> 142
 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 1
 40 cggaattcat taatatgaac ccagttgaaa attatataga tagtgttatta 50
 <210> 2
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 50 cgatttaattc agtgggtggg gtgggtggg acgtttgtaa cggtaa 46
 <210> 3

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 3
 cttaagaag gagatatact taagatgaac ccagttg 37

10 <210> 4
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador

<400> 4
 20 caactgggtt catcttaagt atatccctt cttaaag 37

<210> 5
 <211> 33
 <212> ADN

25 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

30 <400> 5
 cctgatgtt ttaccggtaac aaacgtccac cac 33

<210> 6
 <211> 33

35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

40 <400> 6
 gtgggtggacg ttgttaccgg taaaaacatc agg 33

<210> 7

45 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> Cebador

<400> 7
 cgcgcctaag atggtccgct acaccaccga gggc 34

55 <210> 8
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Cebador

<400> 8
 65 cgcgcctaag ctggactcg taggcggtgt cgcc 34

<210> 9

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

<400> 9
 Cys Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
 1 5 10 15

Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
 20 25 30

10 <210> 10
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

<400> 10
 Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Cys

<210> 11
 <211> 32
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

30 <400> 11
 Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala
 1 5 10 15

Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg Ile Cys
 20 25 30

35 <210> 12
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

<400> 12
 Cys Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 20 25 30

45 <210> 13
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

<400> 13

Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala
1 5 10 15Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys
20 25 30

5 Cys

<210> 14

<211> 38

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

15 <400> 14

Cys Ala Glu Glu Val Lys Val Ile Pro Ala Gly Glu Leu Gln Val Ile
1 5 10 15Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala
20 25 30Ala Pro Ala Asn Asp Lys
35

<210> 15

<211> 35

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 1

25

<400> 15

Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly
1 5 10 15Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro
20 25 30Val Val Cys
35

<210> 16

30 <211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 1

<400> 16

Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr
 1 5 10 15

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr
 20 25 30

Ser Pro Leu Cys
 35

<210> 17

<211> 35

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 1

10

<400> 17

Val Lys Met Ala Ile Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30

Asn Ala Cys
 35

<210> 18

15 <211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 1

<400> 18

Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val
 1 5 10 15

Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Cys
 20 25 30

25 <210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 1

<400> 19

Cys Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val
 1 5 10 15

Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
 20 25 30

35

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Bet v 1

<400> 20
 Leu Phe Pro Lys Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile
 1 5 10 15

Glu Gly Asn Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe
 20 25 30

5 <210> 21
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Bet v 1

<400> 21
 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
 1 5 10 15

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn
 20 25 30

15 <210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Bet v 1

<400> 22
 Val Asp His Thr Asn Phe Lys Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly
 1 5 10 15

Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys
 20 25 30

25 <210> 23
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 1

30 <400> 23
 Ala Pro Leu Glu Ser Arg Gln Asp Thr Ala Ser Cys Pro Val Thr Thr
 1 5 10 15

Glu Gly Asp Tyr Val Trp Lys Ile Ser Glu Phe Tyr Gly Arg Lys Pro
 20 25 30

Glu Gly Thr Tyr Tyr Asn Ser Leu
 35 40

<210> 24
 <211> 37
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 1

45 <400> 24

Gly Phe Asn Ile Lys Ala Thr Asn Gly Gly Thr Leu Asp Phe Thr Cys
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Ala Asp Lys Leu Glu Asp His Lys Trp Tyr Ser Cys Gly
 20 25 30

Glu Asn Ser Phe Met
 35

5 <210> 25
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 1
 <400> 25
 Glu Asn Ser Phe Met Asp Phe Ser Phe Asp Ser Asp Arg Ser Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Lys Gln Lys Val Ser Asp Asp Ile Thr Tyr Val Ala
 20 25 30

15 <210> 26
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 1
 <400> 26
 Thr Ala Thr Leu Pro Asn Tyr Cys Arg Ala Gly Gly Asn Gly Pro Lys
 1 5 10 15

Asp Phe Val Cys Gln Gly Val Ala Asp Ala Tyr Ile Thr Leu Val Thr
 20 25 30

Leu Pro Lys Ser Ser
 35
 25 <210> 27
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 2
 <400> 27
 Met His Ser Ser Asn Asn Phe Phe Lys Asp Asn Ile Phe Arg Ser Leu
 1 5 10 15

Ser Lys Glu Asp Pro Asp Tyr Ser Arg Asn Ile Glu Gly Gln Val Ile
 20 25 30

Arg Leu His Trp Asp Trp Ala Gln
 35 35 40
 40 <210> 28
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 2

<400> 28

Leu Leu Met Leu Ser Ala Lys Arg Met Lys Val Ala Phe Lys Leu Asp
1 5 10 15

Ile Glu Lys Asp Gln Arg Val Trp Asp Arg Cys Thr Ala Asp Asp Leu
20 25 30

Lys Gly Arg Asn Gly Phe Lys Arg
35 40

5

<210> 29

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 2

<400> 29

Cys Leu Gln Phe Thr Leu Tyr Arg Pro Arg Asp Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Asn Glu Ala Phe Phe Ser Ala Phe Arg Glu Asn Arg Glu Thr Ile Ile
20 25 30

15

Asn Thr Asp Leu Glu Tyr Ala Ala
35 40

<210> 30

<211> 40

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 2

25 <400> 30

Lys Ser Ile Ser Met Ala Arg Leu Glu Asp Leu Trp Lys Glu Tyr Gln
1 5 10 15

Lys Ile Phe Pro Ser Ile Gln Val Ile Thr Ser Ala Phe Arg Ser Ile
20 25 30

Glu Pro Glu Leu Thr Val Tyr Thr
35 40

<210> 31

<211> 30

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 2

35 <400> 31

Cys Leu Lys Lys Ile Glu Ala Ser Phe Glu Leu Ile Glu Glu Asn Gly
1 5 10 15

Asp Pro Lys Ile Thr Ser Glu Ile Gln Leu Leu Lys Ala Ser
20 25 30

<210> 32

<211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 6

<400> 32
 Met Thr Ile Thr Lys Ile His Ala Arg Ser Val Tyr Asp Ser Arg Gly
 1 5 10 15

Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Ile Val Thr Glu Thr Gly Leu His Arg
 20 25 30

Ala Ile
 10 <210> 33
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 6

<400> 33
 Val Thr Glu Thr Gly Leu His Arg Ala Ile Val Pro Ser Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Thr Gly Ser His Glu Ala Cys Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Ser Lys
 20 25 30

Trp Gly Gly Lys Gly Val Thr Lys
 20 35 40

<210> 34
 <211> 42
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 6

30 <400> 34
 Ala Pro Ala Leu Ile Lys Glu Lys Leu Asp Val Lys Asp Gln Ser Ala
 1 5 10 15
 Val Asp Ala Phe Leu Asn Lys Leu Asp Gly Thr Thr Asn Lys Thr Asn
 20 25 30

Leu Gly Ala Asn Ala Ile Leu Gly Val Ser
 35 40

<210> 35
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 6

<400> 35

Glu Lys Gly Val Pro Leu Tyr Ala His Ile Ser Asp Leu Ala Gly Thr
 1 5 10 15

Lys Lys Pro Tyr Val Leu Pro Val Pro Phe Gln Asn Val Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Ser His Ala Gly Gly Arg Leu Ala
 35 40

<210> 36

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 6

10

<400> 36

Cys Glu Ala Pro Thr Phe Ser Glu Ala Met Arg Gln Gly Ala Glu Val
 1 5 10 15

Tyr Gln Lys Leu Lys Ala Leu Ala Lys Lys Thr Tyr Gly Gln Ser Ala
 20 25 30

Gly Asn Val Gly Asp Glu Gly Gly
 35 40

<210> 37

<211> 40

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 6

<400> 37

Ile Lys Ile Ala Met Asp Val Ala Ser Ser Glu Phe Tyr Lys Ala Asp
 1 5 10 15

Glu Lys Lys Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Asn Pro Asp Ser Asp Lys Ser
 20 25 30
 Lys Trp Leu Thr Tyr Glu Gln Leu
 35 40

25

<210> 38

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 6

<400> 38

Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Ala Glu Asp Asp Trp Glu Ala Trp Ser
 1 5 10 15

Tyr Phe Phe Lys Thr Tyr Asp Gly Gln Ile Val Gly Asp Asp Leu Thr
 20 25 30

35

Val Thr Asn Pro Glu Phe Ile Lys
 35 40

<210> 39

<211> 40

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 6

<400> 39
 Ala Lys Asp Ala Phe Gly Ala Gly Trp Gly Val Met Val Ser His Arg
 1 5 10 15

Ser Gly Glu Thr Glu Asp Val Thr Ile Ala Asp Ile Val Val Gly Leu
 20 25 30

Arg Ser Gly Gln Ile Lys Thr Gly
 35 40

10 <210> 40
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Alt a 6

<400> 40
 Ala Pro Ala Arg Ser Glu Arg Leu Ala Lys Leu Asn Gln Ile Leu Arg
 1 5 10 15

Ile Glu Glu Glu Leu Gly Asp Asn Ala Val Tyr Ala Gly Asn Asn Phe
 20 25 30

Arg Thr Ala Val Asn Leu
 35

20 <210> 41
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Amb a 1

<400> 41
 Glu Ile Leu Pro Val Asn Glu Thr Arg Arg Leu Thr Thr Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Tyr Asn Ile Ile Asp Gly Cys Trp Arg Gly Lys Ala Asp Trp Ala Glu
 20 25 30

Asn Arg Lys Ala Leu Ala Asp Cys
 35 40

<210> 42
 <211> 41
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Amb a 1

40 <400> 42

Gly Gly Lys Asp Gly Asp Ile Tyr Thr Val Thr Ser Glu Leu Asp Asp
 1 5 10 15

Asp Val Ala Asn Pro Lys Glu Gly Thr Leu Arg Phe Gly Ala Ala Gln
 20 25 30

Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Glu
 35 40

<210> 43

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Amb a 1

10

<400> 43

Ile Arg Leu Asp Lys Glu Met Val Val Asn Ser Asp Lys Thr Ile Asp
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Ala Lys Val Glu Ile Ile Asn Ala Gly Phe Thr Leu
 20 25 30

<210> 44

<211> 41

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Amb a 1

<400> 44

Asn Val Ile Ile His Asn Ile Asn Met His Asp Val Lys Val Asn Pro
 1 5 10 15

Gly Gly Leu Ile Lys Ser Asn Asp Gly Pro Ala Ala Pro Arg Ala Gly
 20 25 30

Ser Asp Gly Asp Ala Ile Ser Ile Ser
 35 40

25 <210> 45

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Amb a 1

<400> 45

Gly Thr Thr Arg Leu Thr Val Ser Asn Ser Leu Phe Thr Gln His Gln
 1 5 10 15

Phe Val Leu Leu Phe Gly Ala Gly Asp Glu Asn Ile Glu Asp Arg Gly
 20 25 30

Met Leu Ala Thr Val Ala Phe
 35

35

<210> 46

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Amb a 1

5 <400> 46

Asn Thr Phe Thr Asp Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg His
1 5 10 15Gly Phe Phe Gln Val Val Asn Asn Tyr Asp Lys Trp Gly Ser Tyr
20 25 30Ala Ile Gly Gly Ser
35

<210> 47

<211> 46

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Amb a 1

15

<400> 47

Ile Leu Ser Gln Gly Asn Arg Phe Cys Ala Pro Asp Glu Arg Ser Lys
1 5 10 15
Lys Asn Val Leu Gly Arg His Gly Glu Ala Ala Ala Glu Ser Met Lys
20 25 30Trp Asn Trp Arg Thr Asn Lys Asp Val Leu Glu Asn Gly Ala
35 40 45

20 <210> 48

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Amb a 1

<400> 48

Gly Val Asp Pro Val Leu Thr Pro Glu Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro
1 5 10 15Ala Glu Pro Gly Glu Ser Ala Leu Ser Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val
20 25 30Leu Ser Cys Gln Pro Gly Ala Pro Cys
35 40

30

<210> 49

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Art v 1

<400> 49

Ser Lys Leu Cys Glu Lys Thr Ser Lys Thr Tyr Ser Gly Lys Cys Asp
 1 5 10 15

Asn Lys Lys Cys Asp Lys Lys Cys Ile Glu Trp Glu Lys Ala Gln His
 20 25 30

Gly Ala Cys His Lys Arg Glu Ala Gly Lys Glu Ser
 35 40

<210> 50

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Art v 1

10

<400> 50

Ser Cys Phe Cys Tyr Phe Asp Cys Ser Lys Ser Pro Pro Gly Ala Thr
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ala Gly Gly Ser
 20 25 30

<210> 51

<211> 41

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Art v 1

<400> 51

Ala Pro Pro Pro Ala Ala Gly Gly Ser Pro Ser Pro Pro Ala Asp Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Pro Pro Pro Pro Ala Asp Gly Gly Ser Pro Pro Val Asp Gly
 20 25 30

Gly Ser Pro Pro Pro Pro Ser Thr His
 35 40

25 <210> 52

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 1

<400> 52

Gln Asp Thr Pro Ala Leu Gly Lys Asp Thr Val Ala Val Ser Gly Lys
 1 5 10 15

Trp Tyr Leu Lys Ala Met Thr Ala Asp Gln Glu Val Pro Glu Lys Pro
 20 25 30

Asp Ser Val Thr Pro Met
 35

35

<210> 53

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220> 53
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 1
 Asp Ser Val Thr Pro Met Ile Leu Lys Ala Gln Lys Gly Gly Asn Leu
 1 5 10 15
 Glu Ala Lys Ile Thr Met Leu Thr Asn Gly Gln Cys Gln Asn Ile Thr
 20 25 30
 Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu
 35 40
 10 <210> 54
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 1
 15 <400> 54
 Cys Gln Asn Ile Thr Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Tyr Thr Ala Tyr Glu Gly Gln Arg Val Val Phe Ile Gln Pro Ser Pro
 20 25 30
 Val Arg Asp His Tyr Ile Leu Tyr Cys
 35 40
 20 <210> 55
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 1
 <400> 55
 Gln Pro Ser Pro Val Arg Asp His Tyr Ile Leu Tyr Cys Glu Gly Glu
 1 5 10 15
 Leu His Gly Arg Gln Ile Arg Met Ala Lys Leu Leu Gly Arg Asp Pro
 20 25 30
 Glu Gln Ser Gln Glu Ala Leu Glu
 35 40
 30 <210> 56
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 1
 <400> 56

Arg Asp Pro Glu Gln Ser Gln Glu Ala Leu Glu Asp Phe Arg Glu Phe
 1 5 10 15

Ser Arg Ala Lys Gly Leu Asn Gln Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gln Ser
 20 25 30

Glu Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gln
 35 40

<210> 57

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 2

10

<400> 57

Gln Glu Gly Asn His Glu Glu Pro Gln Gly Gly Leu Glu Glu Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Arg Trp His Ser Val Ala Leu Ala Ser Asn Lys Ser Asp Leu Ile
 20 25 30

Lys Pro Trp Gly His Phe Arg Val
 35 40

<210> 58

15 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 2

<400> 58

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

Gly Asn Leu His Gly Asp Ile Leu Ile Pro Gln Asp Gly Gln Cys Glu
 20 25 30

Lys Val Ser Leu Thr Ala Phe Lys
 35 40

25 <210> 59

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 2

<400> 59

Cys Glu Lys Val Ser Leu Thr Ala Phe Lys Thr Ala Thr Ser Asn Lys
 1 5 10 15

Phe Asp Leu Glu Tyr Trp Gly His Asn Asp Leu Tyr Leu Ala Glu Val
 20 25 30

Asp Pro Lys Ser Tyr Leu
 35

35

<210> 60

<211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 2

<400> 60
 Asn Asp Leu Tyr Leu Ala Glu Val Asp Pro Lys Ser Tyr Leu Ile Leu
 1 5 10 15

Tyr Met Ile Asn Gln Tyr Asn Asp Asp Thr Ser Leu Val Ala His Leu
 20 25 30

Met Val Arg Asp Leu Ser Arg
 35

10 <210> 61
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de can f 2

<400> 61
 Val Arg Asp Leu Ser Arg Gln Gln Asp Phe Leu Pro Ala Phe Glu Ser
 1 5 10 15

Val Cys Glu Asp Ile Gly Leu His Lys Asp Gln Ile Val Val Leu Ser
 20 25 30

Asp Asp Asp Arg Cys Gln Gly Ser Arg Asp
 35 40

<210> 62
 <211> 34
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

30 <400> 62
 Glu Ala His Gln Ser Glu Ile Ala His Arg Phe Asn Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Glu His Phe Arg Gly Leu Val Leu Val Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Cys

<210> 63
 <211> 35
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

40 <400> 63
 Cys Thr Val Ala Ser Leu Arg Asp Lys Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
 1 5 10 15

Cys Glu Lys Lys Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
 20 25 30

Asp Asp Asn
 35

<210> 64

<211> 30

5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

10 <400> 64

Asn Glu Gln Arg Phe Leu Gly Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
 1 5 10 15

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu
 20 25 30

<210> 65

15 <211> 31

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>

20 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

<400> 65

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

Asp Ser Ile Ser Thr Lys Leu Lys Glu Cys Cys Gly Lys Pro Val
 20 25 30

25 <210> 66

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

<400> 66

Val Glu Asp Lys Glu Val Cys Lys Asn Tyr Gln Glu Ala Lys Asp Val
 1 5 10 15

Phe Leu Gly Thr Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro
 20 25 30

35 <210> 67

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

<400> 67

Leu Ala Lys Glu Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Thr Asp
 1 5 10 15

Asp Pro Pro Ala Cys Tyr Ala His Val Phe Asp Glu Phe Lys
 20 25 30

5 <210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

15 <400> 68
Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Ser Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His
1 5 10 15

20 Lys Pro Lys Ala Thr Glu Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Gly
20 25 30

25 <210> 69
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

35 <400> 69
Val Asp Lys Cys Cys Ala Ala Glu Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala Glu
1 5 10 15

40 Glu Gly Pro Lys Leu Val Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Ala
20 25 30

45 <210> 70
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

55 <400> 70
Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
1 5 10 15

60 Ala Lys Gly Cys Val Ala Asp Gln Ser Ala Ala Asn Cys Glu Lys Ser
20 25 30

65 Leu His Glu Leu Leu Gly Asp Lys Leu Cys
35 40

70 <210> 71
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial

75 <220>
<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

80 <400> 71

Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Gly Phe Gly Gln Leu Val
 1 5 10 15

Thr Pro Glu Ala Asp Ala Met Cys Thr Ala Phe His Glu Asn Glu Gln
 20 25 30

Arg Phe Leu Gly Lys Tyr Leu Tyr Glu
 35 40

<210> 72

<211> 42

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

10

<400> 72

Glu Glu Tyr Lys Gly Val Phe Thr Glu Cys Cys Glu Ala Ala Asp Lys
 1 5 10 15

Ala Ala Cys Leu Thr Pro Lys Val Asp Ala Leu Arg Glu Lys Val Leu
 20 25 30

Ala Ser Ser Ala Lys Glu Arg Leu Lys Cys
 35 40

<210> 73

<211> 38

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

<400> 73

Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ser
 1 5 10 15

Val Ala Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Ile
 20 25 30

Ser Lys Leu Val Thr Asp
 35

25 <210> 74

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

<400> 74

Phe Ala Glu Ile Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Ala Lys Ile His Lys
 1 5 10 15

Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp
 20 25 30

Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
 35

35 <210> 75

<211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

<400> 75
 Cys Gly Lys Pro Val Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ser Glu Val Glu
 1 5 10 15

Arg Asp Glu Leu Pro Ala Asp Leu Pro Pro Leu Ala Val Asp Phe Val
 20 25 30

Glu Asp Lys Glu Val Cys
 35

10 <210> 76
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

<400> 76
 Cys Glu Leu Phe Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 20 25 30

20 Val Glu Val Ser Arg Ser Leu Gly Lys Val
 35 40

<210> 77
 <211> 39
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

30 <400> 77
 Cys Thr His Pro Glu Ala Glu Arg Leu Ser Cys Ala Glu Asp Tyr Leu
 1 5 10 15

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

Ser Glu Arg Val Thr Lys Cys
 35

<210> 78
 <211> 42
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Fel d 2

40 <400> 78

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Ser Ala Glu Thr Phe Thr
 20 25 30

Phe His Ala Asp Leu Cys Thr Leu Pro Glu
 35 40

<210> 79

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de ole e 1

10

<400> 79

Glu Asp Ile Pro Gln Pro Pro Val Ser Gln Phe His Ile Gln Gly Gln
 1 5 10 15

Val Tyr Cys Asp Thr Cys Arg Ala Gly Phe Ile Thr Glu Leu Ser Glu
 20 25 30

Phe Ile Pro Gly Ala Ser Leu Arg
 35 40

<210> 80

<211> 31

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Molécula hiperalergénica derivada de ole e 1

<400> 80

Gly Ala Ser Leu Arg Leu Gln Cys Lys Asp Lys Glu Asn Gly Asp Val
 1 5 10 15
 Thr Phe Thr Glu Val Gly Tyr Thr Arg Ala Glu Gly Leu Tyr Ser
 20 25 30

25

<210> 81

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de ole e 1

<400> 81

Gly Leu Tyr Ser Met Leu Val Glu Arg Asp His Lys Asn Glu Phe Cys
 1 5 10 15

Glu Ile Thr Leu Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile Pro
 20 25 30

35

Thr Glu Gly Trp Ala
 35

<210> 82

<211> 35

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de ole e 1

<400> 82

Gly Arg Lys Asp Cys Asn Glu Ile Pro Thr Glu Gly Trp Ala Lys Pro
1 5 10 15

Ser Leu Lys Phe Lys Leu Asn Thr Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val
20 25 30

Asn Pro Leu
35

5

<210> 83

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de ole e 1

<400> 83

Leu Asn Thr Val Asn Gly Thr Thr Arg Thr Val Asn Pro Leu Gly Phe
1 5 10 15

Phe Lys Lys Glu Ala Leu Pro Lys Cys Ala Gln Val Tyr Asn Lys Leu
20 25 30

Gly Met Tyr Pro Pro Asn Met
35

15

<210> 84

<211> 30

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Par j 2

25 <400> 84

Gly Glu Glu Ala Cys Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu
1 5 10 15

His Phe Val Lys Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu Cys
20 25 30

<210> 85

<211> 36

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Par j 2

35

<400> 85

Cys Leu His Phe Val Lys Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu Cys
1 5 10 15

Cys Ser Gly Thr Lys Lys Leu Ser Glu Glu Val Lys Thr Thr Glu Gln
20 25 30

Lys Arg Glu Ala
35

<210> 86

<211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Par j 2

<400> 86
 Cys Cys Ser Gly Thr Lys Lys Leu Ser Glu Glu Val Lys Thr Thr Glu
 1 5 10 15

Gln Lys Arg Glu Ala Cys Lys Cys Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile
 20 25 30

Ser Gly Ile Lys Asn
 35

10 <210> 87
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Par j 2

<400> 87
 Glu Leu Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr Ile
 20 25 30

Phe Arg Gly Tyr Tyr
 35

20 <210> 88
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 1

30 <400> 88
 Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly
 20 25 30

<210> 89
 <211> 33
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 1

40 <400> 89

Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala ser
 1 5 10 15

Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile
 20 25 30

Gln

<210> 90

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 1

10

<400> 90

His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu
 1 5 10 15

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

<210> 91

<211> 37

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 1

20 <400> 91

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

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

Leu Ala Gln Thr His
 35

25 <210> 92

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 1

<400> 92

Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln
 1 5 10 15

Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val
 20 25 30

35

<210> 93

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 1

<400> 93

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

Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp
 20 25 30

Ile

<210> 94

5 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

10 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 1

<400> 94

Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn
 1 5 10 15

Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala
 20 25 30

Asn Ile

15 <210> 95

<211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 1

<400> 95

Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr
 1 5 10 15

Phe Ala Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val
 20 25 30

Val Ile Leu
 35

25

<210> 96
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 2

<400> 96

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Val
 1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly
 20 25 30

35 Lys

<210> 97

<211> 31

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 2

<400> 97
 Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Gln
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln Asn Ser Lys Thr Ala Lys
 20 25 30

10 <210> 98
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 2

<400> 98
 Glu Ala Asn Gln Asn Ser Lys Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser
 1 5 10 15

Ile Glu Gly Leu Glu Val Asp Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys
 20 25 30

20 <210> 99
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 2

<400> 99
 Glu Val Asp Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys
 1 5 10 15

Cys Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Ile
 20 25 30

30 Val Pro Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn
 35 40

<210> 100
 <211> 32
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 2

40 <400> 100
 Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp
 1 5 10 15

Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg Asp
 20 25 30

45 <210> 101
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 5

5 <400> 101
 Met Glu Asp Lys Lys His Asp Tyr Gln Asn Glu Phe Asp Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Met Glu Arg Ile His Glu Gln Ile Lys Lys Gly Glu Leu Ala Leu Phe
 20 25 30

Tyr Leu Gln
 35

<210> 102
 <211> 36

10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 5

15 <400> 102
 Lys Lys Gly Glu Leu Ala Leu Phe Tyr Leu Gln Glu Gln Ile Asn His
 1 5 10 15

Phe Glu Glu Lys Pro Thr Lys Glu Met Lys Asp Lys Ile Val Ala Glu
 20 25 30

Met Asp Thr Ile
 35

<210> 103
 <211> 31

20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 5

25 <400> 103
 Asp Gly Val Arg Gly Val Leu Asp Arg Leu Met Gln Arg Lys Asp Leu
 1 5 10 15

Asp Ile Phe Glu Gln Tyr Asn Leu Glu Met Ala Lys Lys Ser Gly
 20 25 30

30 <210> 104
 <211> 36

<212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 5

<400> 104
 Asp Leu Asp Ile Phe Glu Gln Tyr Asn Leu Glu Met Ala Lys Lys Ser
 1 5 10 15

Gly Asp Ile Leu Glu Arg Asp Leu Lys Lys Glu Glu Ala Arg Val Lys
 20 25 30

Lys Ile Glu Val
 35

<210> 105

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 7

<400> 105
 Asp Pro Ile His Tyr Asp Lys Ile Thr Glu Glu Ile Asn Lys Ala Val
 1 5 10 15

Asp Glu Ala Val Ala Ala Ile Glu Lys Ser Glu Thr Phe Asp
 20 25 30

10 <210> 106
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 7

<400> 106
 Val Ala Ala Ile Glu Lys Ser Glu Thr Phe Asp Pro Met Lys Val Pro
 1 5 10 15

Asp His Ser Asp Lys Phe Glu Arg His Ile Gly Ile Ile Asp Leu
 20 25 30

20 <210> 107
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 7

25 <400> 107
 Leu Lys Gly Glu Leu Asp Met Arg Asn Ile Gln Val Arg Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Met Lys Arg Val Gly Asp Ala Asn Val Lys Ser Glu Asp Gly
 20 25 30

30 <210> 108
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 7

35 <400> 108
 Val His Asp Asp Val Val Ser Met Glu Tyr Asp Leu Ala Tyr Lys Leu
 1 5 10 15

Gly Asp Leu His Pro Asn Thr His Val Ile Ser Asp Ile Gln Asp Phe
 20 25 30

Val Val Glu Leu
 35

40 <210> 109
 <211> 31
 <212> PRT

5 <210> 113
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 10

10 <400> 113
 Leu Glu Glu Lys Glu Lys Ala Leu Gln Thr Ala Glu Gly Asp Val Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Asn Arg Arg Ile Gln Leu Ile Glu Glu Asp Leu Glu Arg Ser
 20 25 30

Glu Glu Arg Leu Lys Ile Ala Thr
 35 40

<210> 114
 <211> 35
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 10

20 <400> 114
 Ala Lys Leu Glu Glu Ala Ser Gln Ser Ala Asp Glu Ser Glu Arg Met
 1 5 10 15

Arg Lys Met Leu Glu His Arg Ser Ile Thr Asp Glu Glu Arg Met Glu
 20 25 30

Gly Leu Glu
 35

25 <210> 115
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 10
 <400> 115
 Arg Met Glu Gly Leu Glu Asn Gln Leu Lys Glu Ala Arg Met Met Ala
 1 5 10 15

Glu Asp Ala Asp Arg Lys Tyr Asp Glu Val Ala Arg Lys Leu Ala
 20 25 30

35 <210> 116
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 10
 <400> 116

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

Val Glu Leu Glu Glu Leu Arg Val Val Gly Asn Asn Leu Lys
 20 25 30

5 <210> 117

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 10

<400> 117

Ser Glu Glu Lys Ala Gln Gln Arg Glu Glu Ala His Glu Gln Gln Ile
 1 5 10 15

Arg Ile Met Thr Thr Lys Leu Lys Glu Ala Glu Ala Arg Ala Glu Phe
 20 25 30

Ala Glu Arg Ser Val Gln Lys Leu Gln
 35 40

15 <210> 118

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 10

<400> 118

Gln Lys Glu Val Asp Arg Leu Glu Asp Glu Leu Val His Glu Lys Glu
 1 5 10 15

Lys Tyr Lys Ser Ile Ser Asp Glu Leu Asp Gln Thr Phe Ala Glu Leu
 20 25 30

35 Thr Gly Tyr

25 <210> 119

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 21

<400> 119

Met Phe Ile Val Gly Asp Lys Lys Glu Asp Glu Trp Arg Met Ala Phe
 1 5 10 15

Asp Arg Leu Met Met Glu Glu Leu Glu Thr Lys Ile Asp Gln Val Glu
 20 25 30

35 Lys Gly Leu

<210> 120

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 21

5 <400> 120
 Leu His Leu Ser Glu Gln Tyr Lys Glu Leu Glu Lys Thr Lys Ser Lys
 1 5 10 15

 Glu Leu Lys Glu Gln Ile Leu Arg Glu Leu Thr Ile Gly Glu Asn Phe
 20 25 30

 Met Lys Gly Ala Leu
 35

<210> 121
 <211> 31
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 21

15 <400> 121
 Gly Ala Leu Lys Phe Phe Glu Met Glu Ala Lys Arg Thr Asp Leu Asn
 1 5 10 15

 Met Phe Glu Arg Tyr Asn Tyr Glu Phe Ala Leu Glu Ser Ile Lys
 20 25 30

20 <210> 122
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Der p 21

 <400> 122
 Tyr Asn Tyr Glu Phe Ala Leu Glu Ser Ile Lys Leu Leu Ile Lys Lys
 1 5 10 15

 Leu Asp Glu Leu Ala Lys Lys Val Lys Ala Val Asn Pro Asp Glu Tyr
 20 25 30

 Tyr

30 <210> 123
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada del clon 30

 <400> 123
 Met Ala Asn Asp Asn Asp Asp Pro Thr Thr Thr Val His Pro Thr
 1 5 10 15

40 <210> 124
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

 Thr Thr Glu Gln Pro Asp Asp Lys Phe Glu Cys Pro Ser Arg Phe Gly
 20 25 30

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada del clon 30

5 <400> 124
 Pro Thr Thr Thr Glu Gln Pro Asp Asp Lys Phe Glu Cys Pro Ser Arg
 1 5 10 15

Phe Gly Tyr Phe Ala Asp Pro Lys Asp Pro His Lys Phe Tyr Ile Cys
 20 25 30

Ser Asn

<210> 125

<211> 39

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada del clon 30

15 <400> 125
 Gly Tyr Phe Ala Asp Pro Lys Asp Pro His Lys Phe Tyr Ile Cys Ser
 1 5 10 15

Asn Trp Glu Ala Val His Lys Asp Cys Pro Gly Asn Thr Arg Trp Asn
 20 25 30

Glu Asp Glu Glu Thr Cys Thr
 35

<210> 126

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Bet v 1

<400> 126

Leu Phe Pro Lys Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile
 1 5 10 15

Glu Gly Asn Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe
 20 25 30

30 <210> 127

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Bet v 1

<400> 127

Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro Phe
 1 5 10 15

Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn
 20 25 30

40

<210> 128

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Bet v 1

5 <400> 128

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

1 5 10 15

Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys

20 25 30

10 <210> 129

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada la cadena 1 de Fel d 1

<400> 129

Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly

1 5 10 15

Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro

20 25 30

Val Val Cys

20 35

25 <210> 130

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada la cadena 1 de Fel d 1

<400> 130

Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr

1 5 10 15

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr

20 25 30

30 Ser Pro Leu Cys

30 35

35 <210> 131

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada la cadena 2 de Fel d 1

40 <400> 131

Val Lys Met Ala Ile Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30

Asn Ala Cys
 35

<210> 132

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada la cadena 2 de Fel d 1

10

<400> 132

Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val
 1 5 10 15

Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Cys
 20 25 30

<210> 133

<211> 30

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Molécula hiperalergénica derivada la cadena 2 de Fel d 1

<400> 133

Cys Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val
 1 5 10 15

Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
 20 25 30

25 <210> 134

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

<400> 134

Cys Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gly Glu
 1 5 10 15

Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Ser Lys
 20 25 30

35

<210> 135

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

<400> 135

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly
 20 25 30

Lys Cys

5 <210> 136
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

<400> 136
 Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala
 1 5 10 15

Lys Tyr Asp Ala Tyr Val Ala Thr Leu Ser Glu Ala Leu Arg Ile Cys
 20 25 30

15 <210> 137
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

<400> 137
 Cys Glu Ala Ala Phe Asn Asp Ala Ile Lys Ala Ser Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Tyr Glu Ser Tyr Lys Phe Ile Pro Ala Leu Glu Ala Ala Val Lys
 20 25 30

25 <210> 138
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

<400> 138
 Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala
 1 5 10 15

Leu Lys Lys Ala Ile Thr Ala Met Ser Glu Ala Gln Lys Ala Ala Lys
 20 25 30

35 Cys

<210> 139
 <211> 38
 <212> PRT
 40 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalergénica derivada de Phl p 5

45 <400> 139

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

Glu Lys Val Asp Ala Ala Phe Lys Val Ala Ala Thr Ala Ala Asn Ala
 20 25 30

Ala Pro Ala Asn Asp Lys
 35

<210> 140

<211> 70

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Alérgeno del clon 30 de *Dermatophagoides pteronyssinus*

10

<400> 140

Met Ala Asn Asp Asn Asp Asp Asp Pro Thr Thr Thr Val His Pro Thr
 1 5 10 15

Thr Thr Glu Gln Pro Asp Asp Lys Phe Glu Cys Pro Ser Arg Phe Gly
 20 25 30

Tyr Phe Ala Asp Pro Lys Asp Pro His Lys Phe Tyr Ile Cys Ser Asn
 35 40 45

Trp Glu Ala Val His Lys Asp Cys Pro Gly Asn Thr Arg Trp Asn Glu
 50 55 60

Asp Glu Glu Thr Cys Thr
 65 70

<210> 141

15 <211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Péptido derivado de Phl p 5

<400> 141

Cys Phe Val Ala Thr Phe Gly Ala Ala Ser Asn Lys Ala Phe Ala Glu
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Gly Glu Pro Lys Gly Ala Ala Glu Ser Ser Ser Lys Ala
 20 25 30

Ala Leu Thr Ser Lys
 35

25 <210> 142

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Péptido derivado de Phl p 5

<400> 142

ES 2 541 311 T3

Ala Asp Leu Gly Tyr Gly Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Ala Thr Pro Ala Ala Pro Ala Glu Ala Cys
20 25

REIVINDICACIONES

1. Proteína hipoalergénica para su uso en el tratamiento o la prevención de una alergia en un ser humano o animal que consiste en al menos una molécula hipoalergénica derivada de un alérgeno, que se fusiona con al menos una segunda proteína no alergénica, en la que la al menos una molécula hipoalergénica derivada de un alérgeno muestra una capacidad de unión a IgE reducida en al menos el 50% y una reactividad frente a células T reducida en al menos el 30% en comparación con el alérgeno de tipo natural y en la que la al menos una segunda proteína es una proteína viral.
- 5 2. Proteína hipoalergénica para el uso según la reivindicación 1, caracterizada porque la proteína viral es una proteína de cápside.
- 10 3. Proteína hipoalergénica para el uso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la al menos una proteína viral se deriva de un virus patógeno humano, preferiblemente un virus de la familia de picornavirus.
- 15 4. Proteína hipoalergénica para el uso según la reivindicación 3, caracterizada porque el virus de la familia de picornavirus es del género de rinovirus, preferiblemente de la especie de rinovirus humanos, en particular rinovirus humano 89 ó 14.
- 20 5. Proteína hipoalergénica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque el alérgeno se selecciona del grupo que consiste en alérgenos del polen de abedul principales, en particular Bet v 1 y Bet v 4, alérgenos del polen de hierba timotea principales, en particular Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 y Phl p 7, alérgenos de ácaro del polvo doméstico principales, en particular Der p 1, Der p 2, Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 21 y clon 30, alérgeno de gato principal Fel d 1 y Fel d 2, alérgenos de abeja principales, alérgenos de avispa principales, profilinas, especialmente Phl p 12, alérgenos de olivo, especialmente Ole e 1, alérgenos de *Parietaria judaica*, especialmente Par j 2, alérgenos de ambrosía, especialmente Amb a 1, alérgenos del polen de artemisa, especialmente Art v 1, y alérgenos de ácaro de almacenamiento, especialmente Lep d 2, Alt a 1, Alt a 2, Alt a 6, Can f 1, Can f 2.
- 25 6. Proteína hipoalergénica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque la al menos una molécula hipoalergénica derivada de un alérgeno es un fragmento de alérgeno compuesto por los aminoácidos 151 a 177, 87 a 117, 1 a 30, 43 a 70 ó 212 a 241 de Phl p 1, los aminoácidos 93 a 128, 98 a 128, 26 a 53, 26 a 58, 132 a 162, 217 a 246, 252 a 283 ó 176 a 212 de Phl p 5, los aminoácidos 1 a 34 ó 35 a 70 de la cadena 1 de Fel d 1, los aminoácidos 1 a 34, 35 a 63 ó 64 a 92 de la cadena 2 de Fel d 1, los aminoácidos 30 a 59, 50 a 79 ó 75 a 104 de Bet v 1, los aminoácidos 1 a 33, 21 a 51, 42 a 73, 62 a 103 ó 98 a 129 de Der p 2, los aminoácidos 1 a 30, 20 a 50, 50 a 80, 90 a 125, 125 a 155 ó 165 a 198 de Der p 7, los aminoácidos 1-35, 36-70, 71-110, 111-145, 140-170, 175-205, 210-250 ó 250-284 de Der p 10, los aminoácidos 1 a 35, 35 a 72, 70 a 100 ó 90 a 122 de Der p 21, los aminoácidos 1 a 32, 15 a 48 ó 32 a 70 del clon 30, los aminoácidos 19 a 58, 59 a 95, 91 a 120 ó 121 a 157 de Alt a 1, los aminoácidos 31 a 60, 45 a 80, 60 a 96 ó 97 a 133 de Par j 2, los aminoácidos 1 a 40, 36 a 66, 63 a 99, 86 a 120 ó 107 a 145 de Ole e 1, los aminoácidos 25 a 58, 99 a 133, 154 a 183, 277 a 307, 334 a 363, 373 a 402, 544 a 573, 579 a 608, 58 a 99, 125 a 165, 183 a 224, 224 a 261, 252 a 289, 303 a 340, 416 a 457, 460 a 500 ó 501 a 542 de Fel d 2, los aminoácidos 19 a 58, 52 a 91, 82 a 119, 106 a 144 ó 139 a 180 de Can f 2, los aminoácidos 19 a 56, 51 a 90, 78 a 118, 106 a 145 ó 135-174 de Can f 1, los aminoácidos 27 a 70, 70 a 100 ó 92 a 132 de Art v 1, los aminoácidos 31 a 70, 80 a 120, 125 a 155, 160 a 200, 225 a 263, 264 a 300, 305 a 350 ó 356 a 396 de Amb a 1, los aminoácidos 1 a 34, 35 a 74, 74 a 115, 125 a 165, 174 a 213, 241 a 280, 294 a 333, 361 a 400 ó 401 a 438 de Alt a 6, los aminoácidos 1 a 40, 41 a 80, 81 a 120 ó 121 a 160 de Alt a 2.
- 30 7. Proteína hipoalergénica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque la proteína hipoalergénica se administra a un individuo en la cantidad de 0,01 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal.

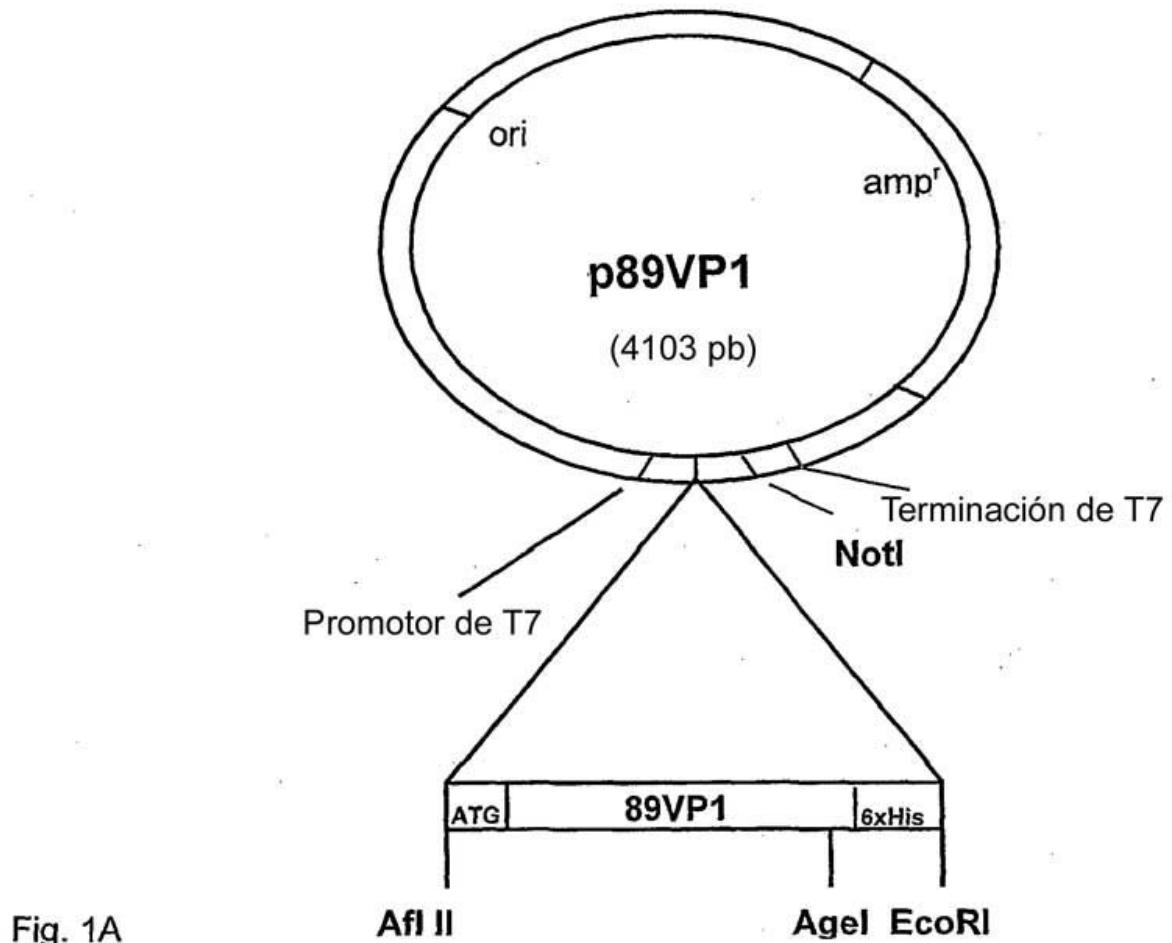


Fig. 1B

MCS p89VP1:

SD Afl II

5'.TAAGAAGGAGATATACTTAAGATG AAC CCA GTT GAA AAT TAT ATA GAT
 inicio N P V E N Y I D

AGT GTA TTA AAT GAA GTT CTT GTG GTG CCA AAT ATC CAA CCT AGC ACA
 S V L N E V L V V P N I Q P S T

TCT GTG TCA AGT CGT GCA GCG CCT GCA TTG GAT GCT GCG GAA ACC
 S V S S H A A P A L D A A E T

GGA CAC ACC AGC TCT GTT CAA CCT GAA GGT ATG ATT GAA ACT AGA
 G H T S S V Q P E D M I E T R

TAT GTT ATA ACT GAT CAA ACA AGG GAT GAA ACA AGT ATT GAG AGT TTC
 Y V I T D Q T R D E T S I E S F

TTA GGT AGG TCA GGG TGT ATC GCT ATG ATA GAA TTT AAT ACA AGT AGT
 L G R S G C I A M I E F N T S S

GAT AAA ACT GAA CAT GAT AAA ATT GGT AAA GGA TTC AAA ACA TGG AAG
 D K T E H D K I G K G F K T W K

GTT AGT CTT CAA GAA ATG GCA CAA ATC AGA AGA AAA TAT GAA TTA TTC
 I S L Q E M A Q I R R K Y E L F

ACA TAT ACA AGA TTT GAT TCA GAG ATA ACA ATA GTC ACT GCA GCC GCA
 T Y T R F D S E I T I V T A A A

GCT CAA GGA AAT GAT AGT GGA CAT ATA GTA TTG CAA TTT ATG TAT GTA
 A Q G D D S G H I V L Q F M Y V

CCC CCA GGA GCA CCT GTC CCC GAA AAA CGT GAT GAT TAC ACA TGG
 P P G A P V P E K R D D Y T W

CAA TCA GGA ACA AAT GCA TCT GTG TTC TGG CAA GAA GGA CAA CCA
 Q S G T N A S V F W Q E G Q P

Fig. 1B cont.

TAC CCC AGA TTC ACA ATC CCT TTT ATG AGC ATT GCA TCA GCC TAT TAC
 Y P R F T I P F M S I A S A Y Y
 ATG TTT TAT GAT GGT TAT GAT GGT GAT AGT GCA GCA TCA AAA TAC GGT
 M F Y D G Y D G D S A A S K Y G
 TCT GTA GTC ACT AAT GAT ATG GGA ACC ATA TGT GTT AGA ATA GTG ACA
 S V V T N D M G T I C V R I V T
 TCC AAC CAA AAA CAT GAT TTA AAT ATT GTG TGC CGC ATT TAC CAC AAG
 S N Q K H D L N I V C R I Y H K
 GCC AAA CAT ATA AAA GCA TGG GT CCT CGC CCA CCA AGG GCT GTT GCC
 A K H I K A W C P R P P R A V A
 TAT CAA CAC ACA CAC TCA ACC AAT TAC ATA CCA TCC AAT GGT GAG GCC
 Y Q H T H S T N Y I P S N G E A
 ACA ACT CAG ATT AAA ACC AGA CCT GAT GTT TTT ~~ACA AAC GTC~~ ACA AAC GTC
 T T Q I K T R P D V F T G T N V
 CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAA TTC TGC AGA TAT CCA TCA CAC
 H H H H H H ^{terminacion} EcoRI EcoRV
TGG CGG CCG CTC GAG CAG ATC CGG CTG CTA ACA AAG CCC GAA AGG
 NotI
 AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG .. 3'

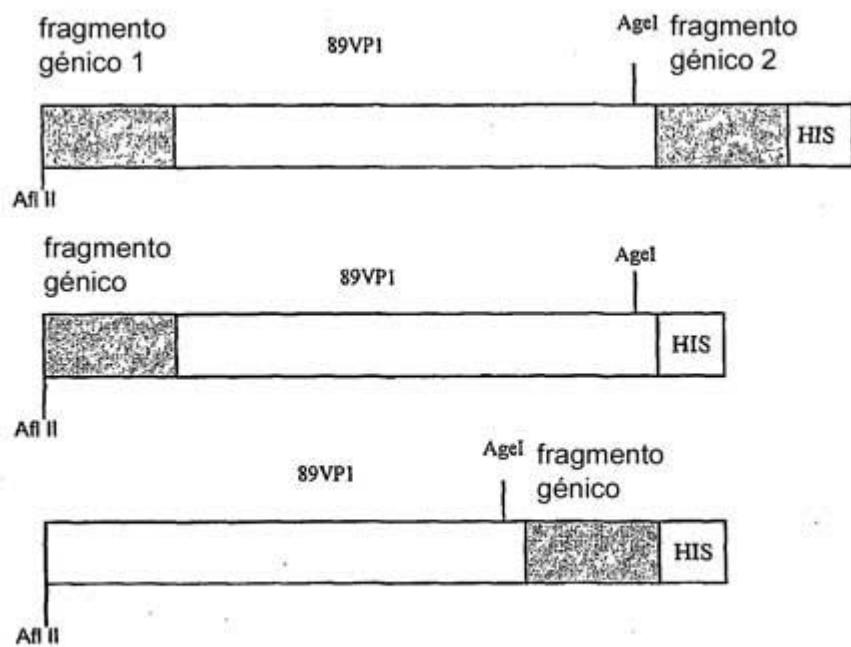


Fig. 1C

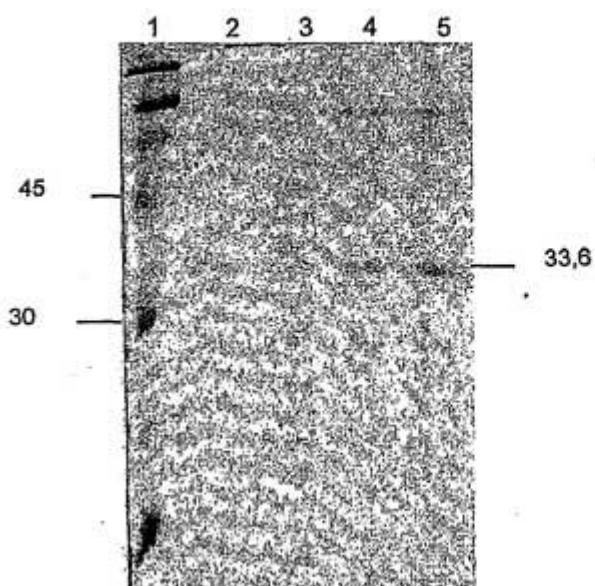


Fig. 2

ES 2 541 311 T3

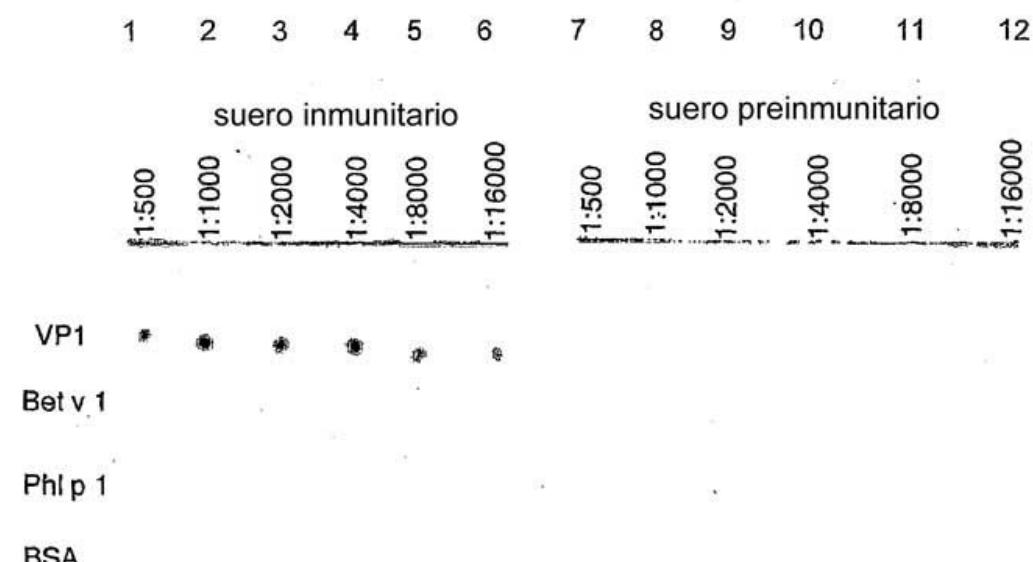


Fig. 3

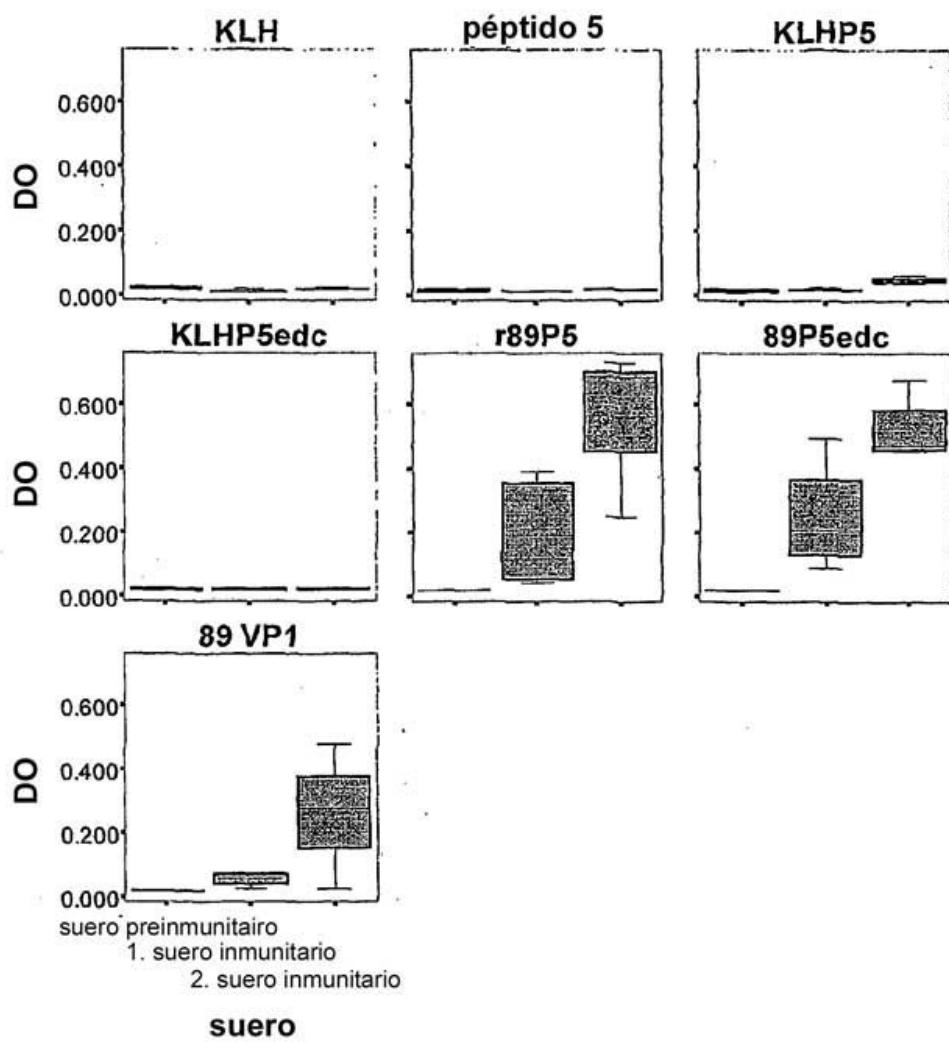


Fig. 4

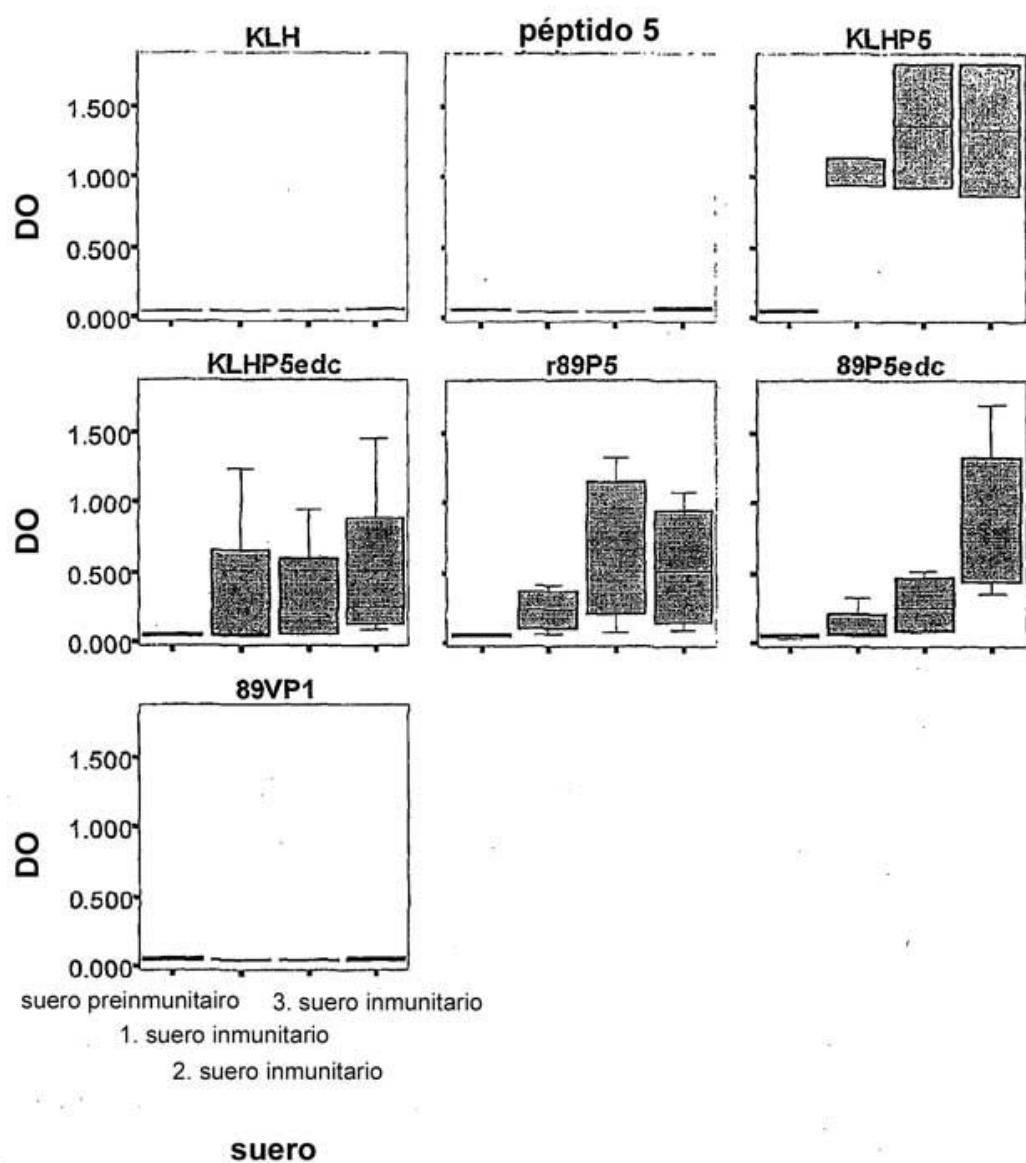


Fig. 5

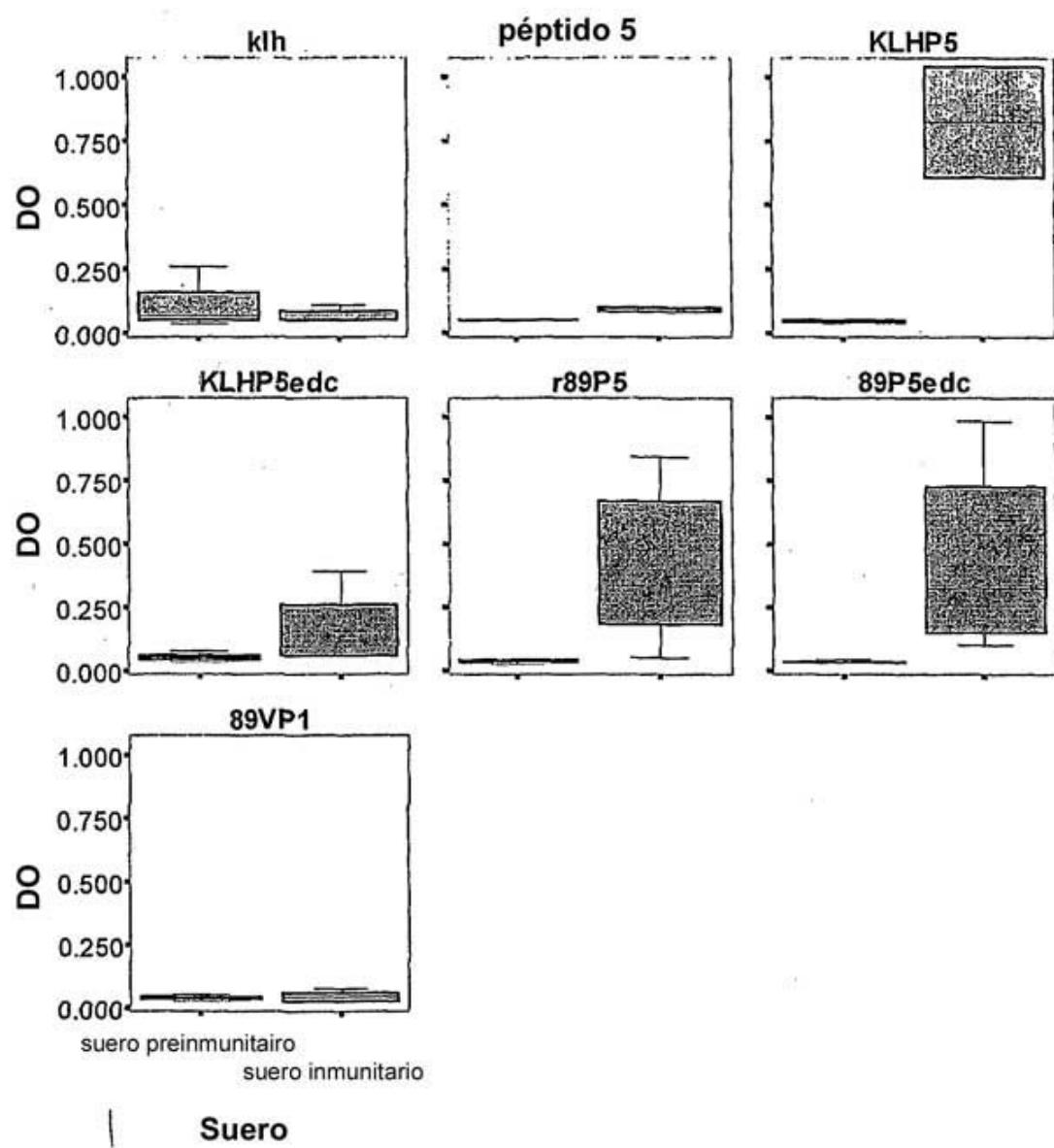


Fig. 6

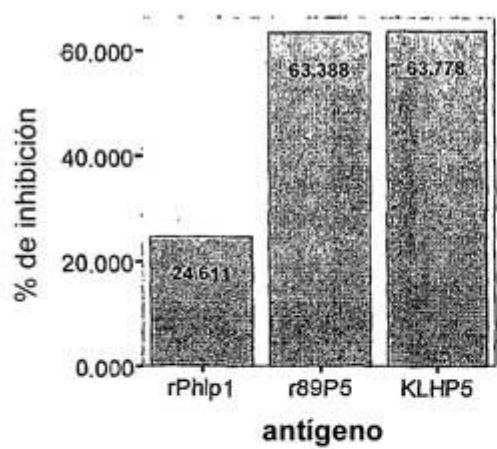


Fig. 7

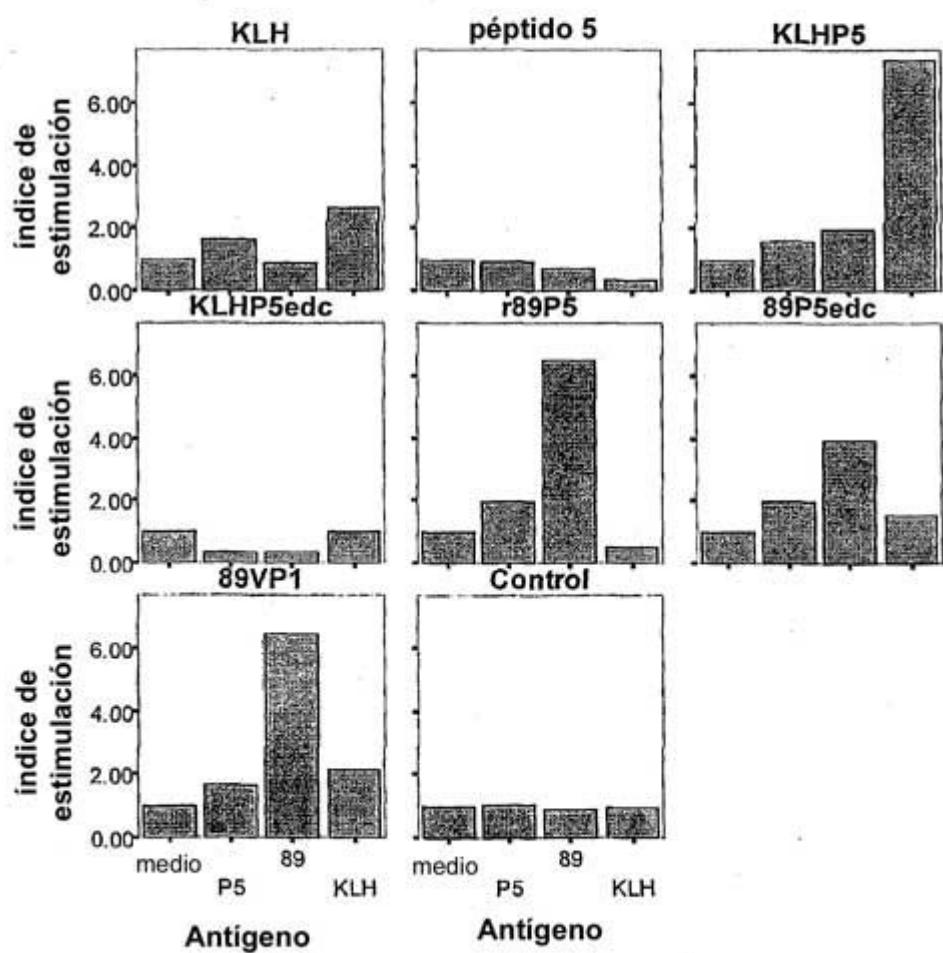


Fig. 8

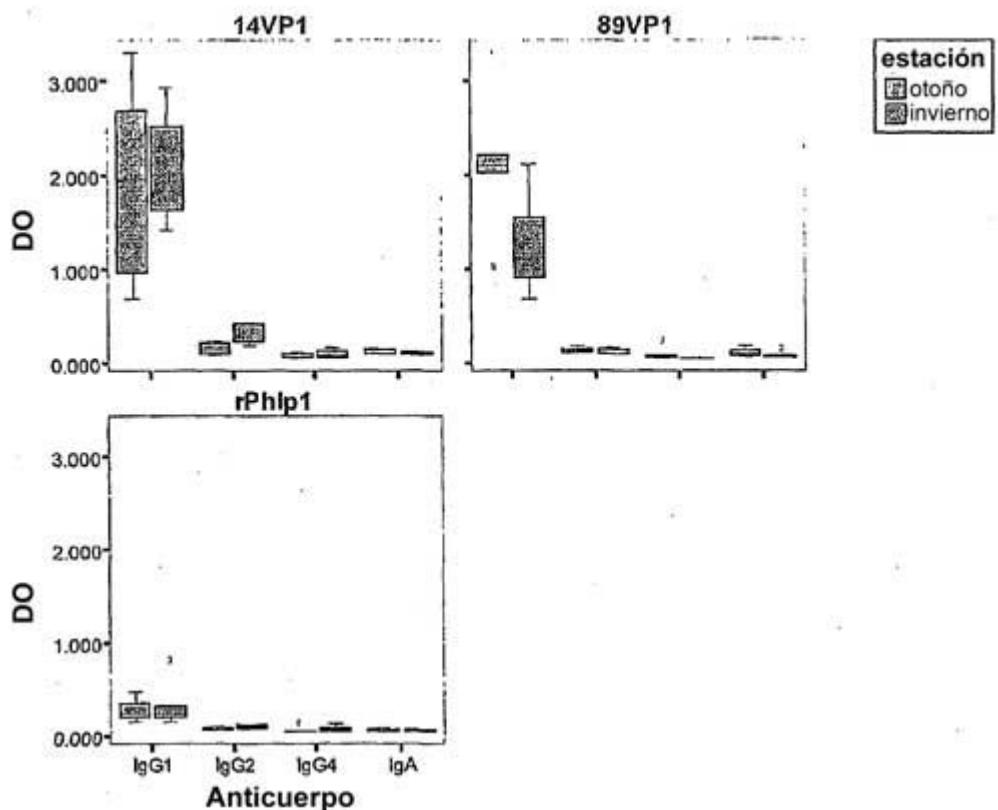


Fig. 9

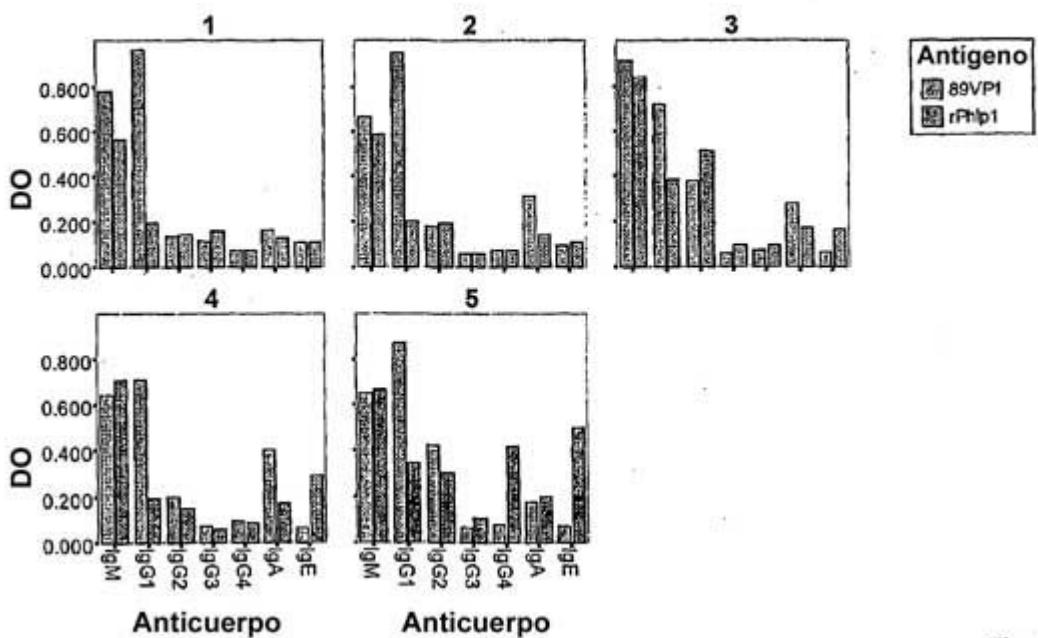


Fig. 10

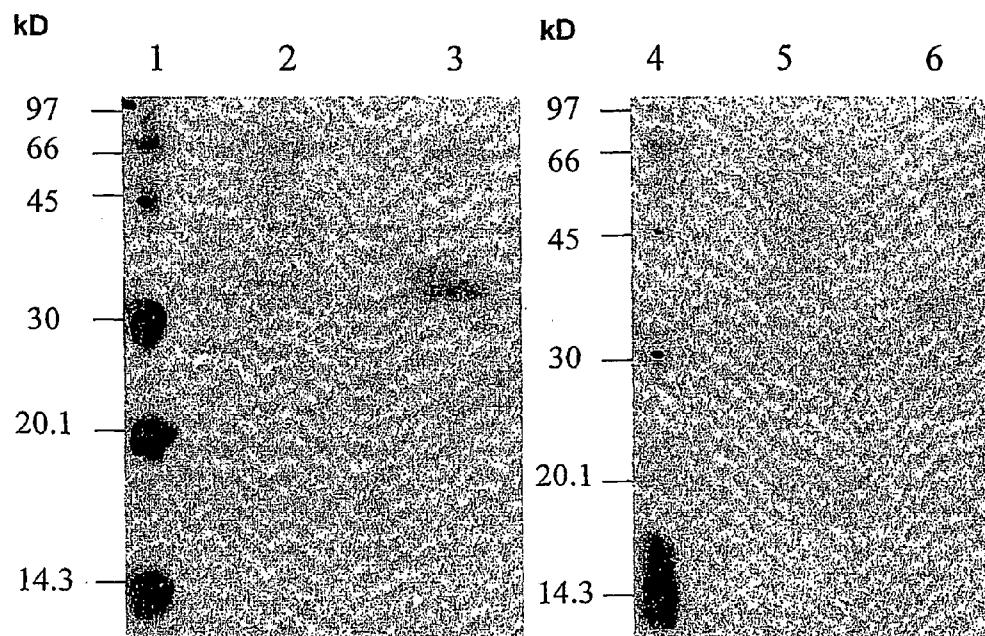


Fig. 11

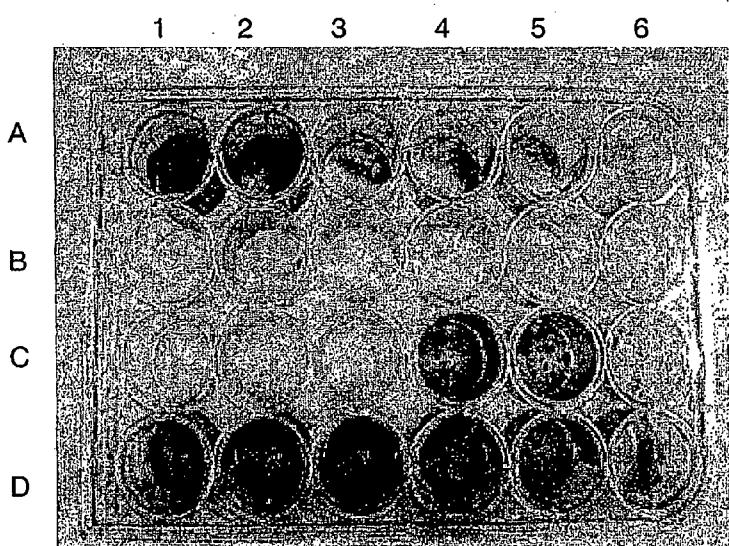


Fig. 12

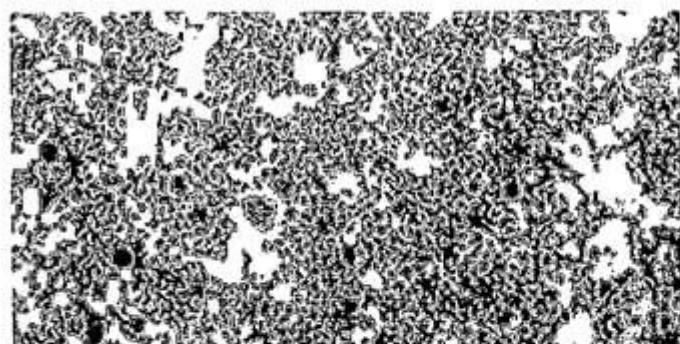


Fig. 12A

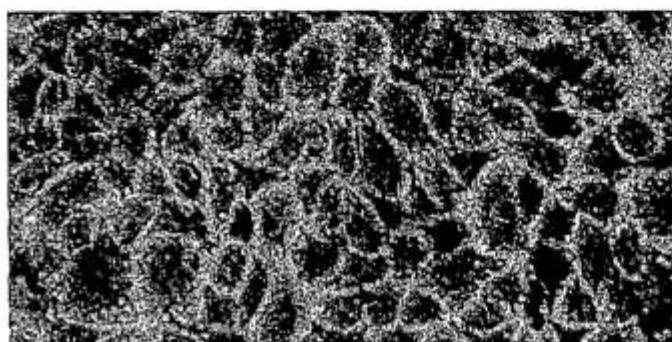


Fig. 12B

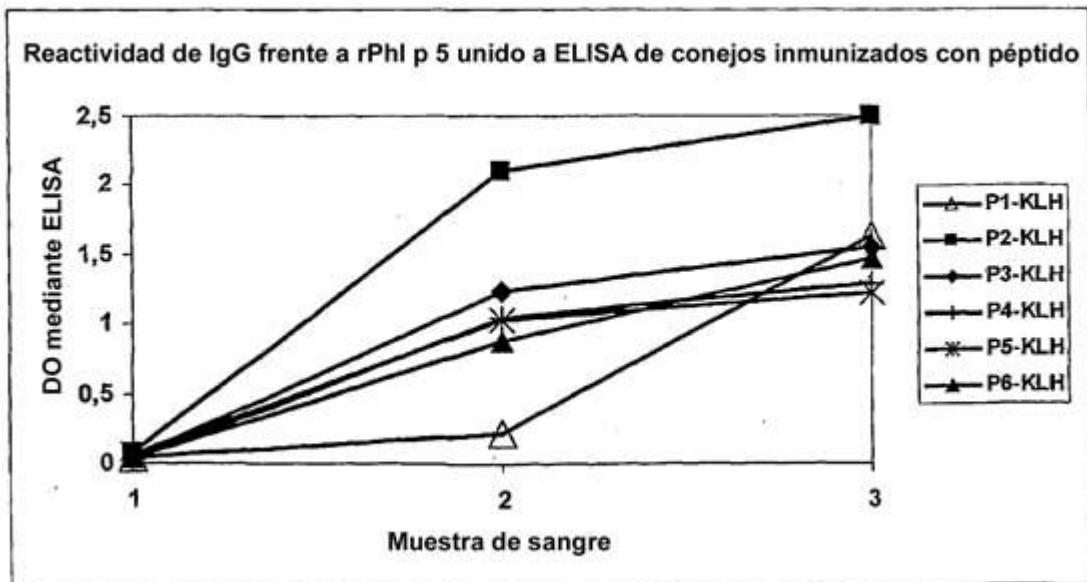


Fig. 13

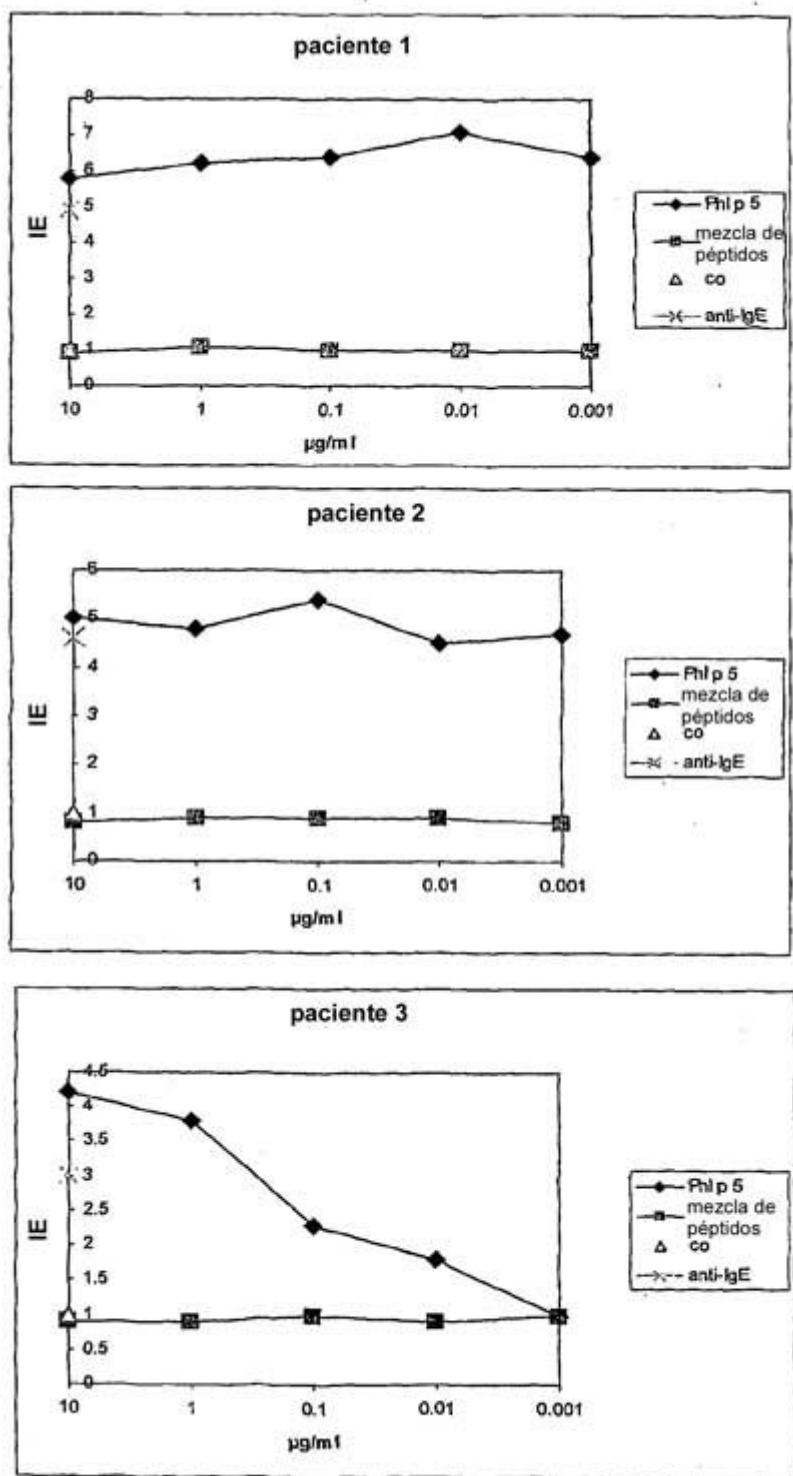


Fig. 14

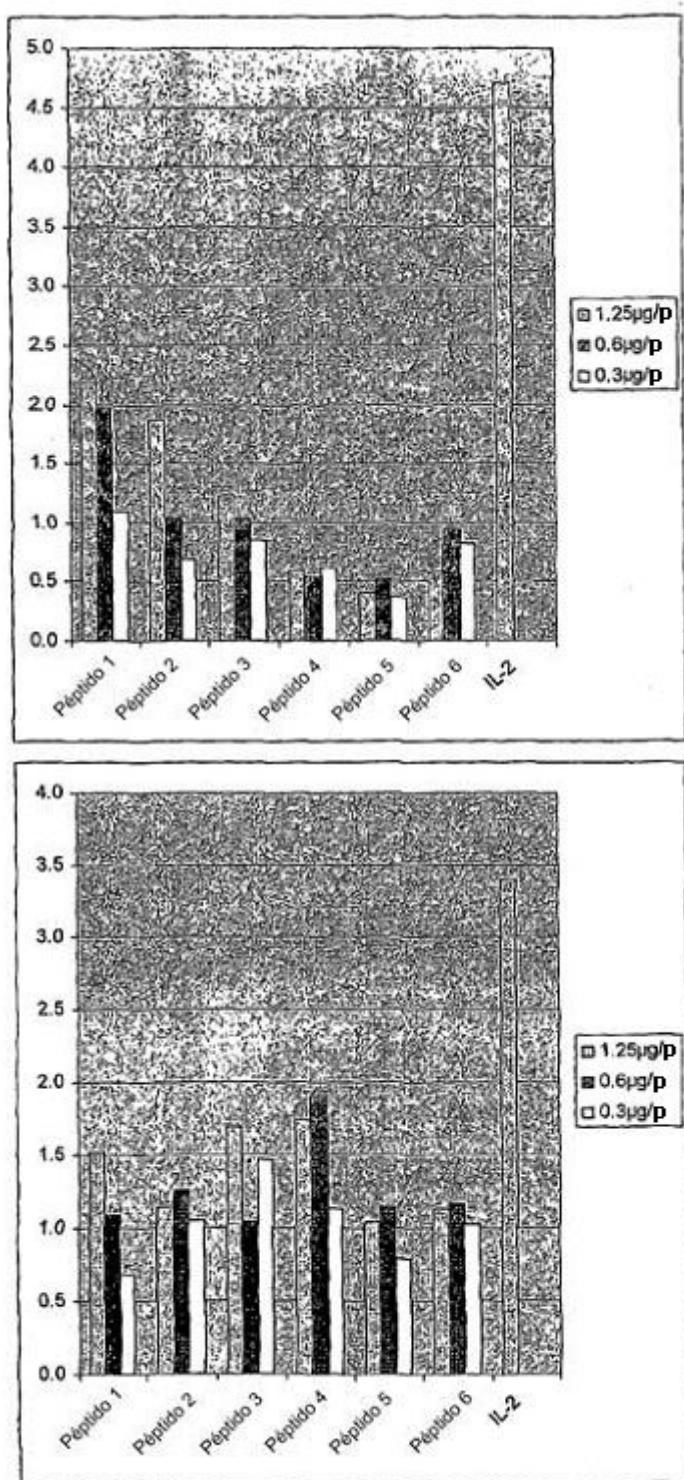


Fig. 15

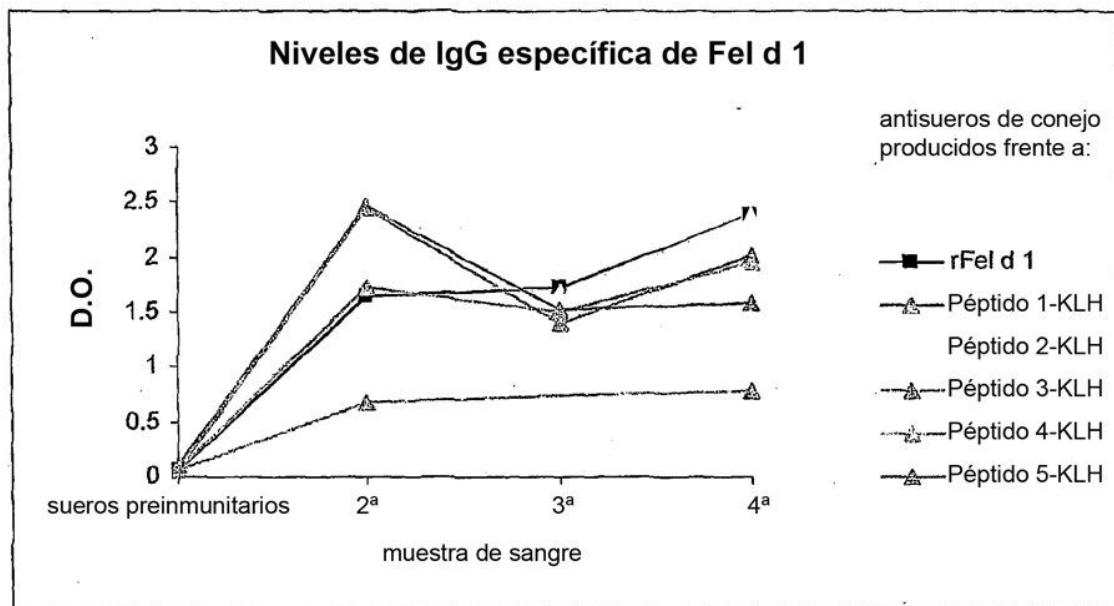


Fig. 16

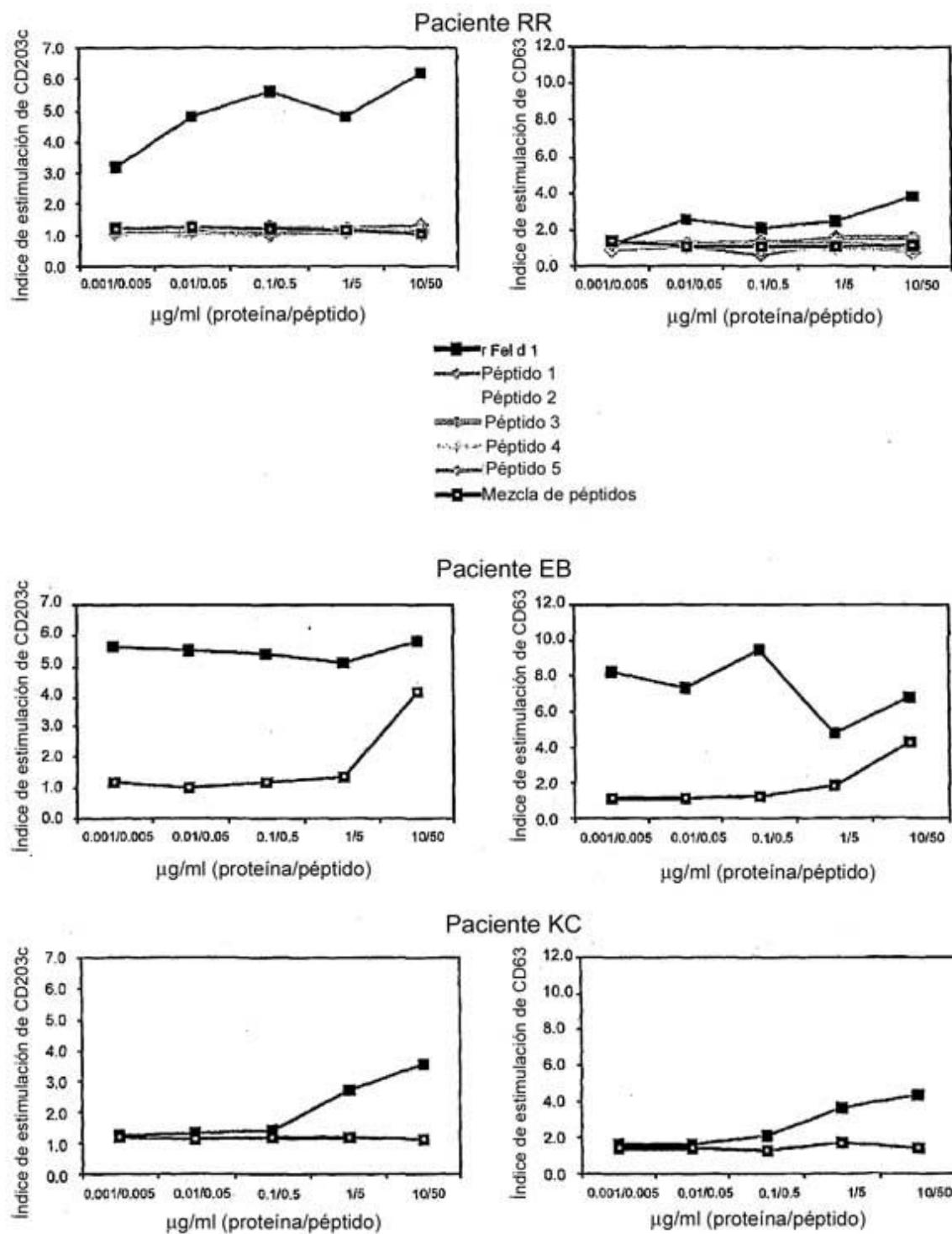
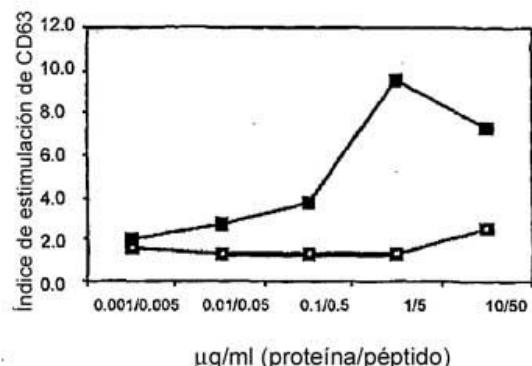
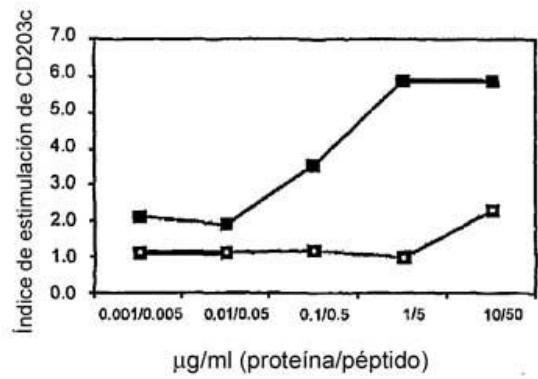
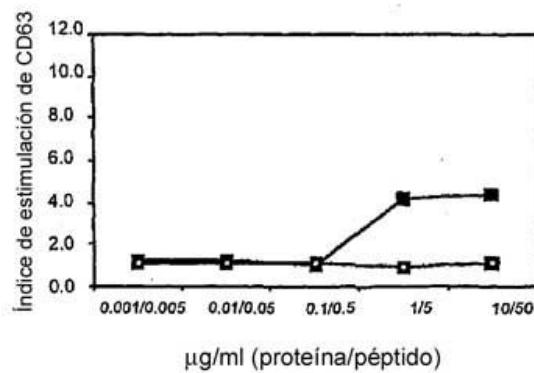
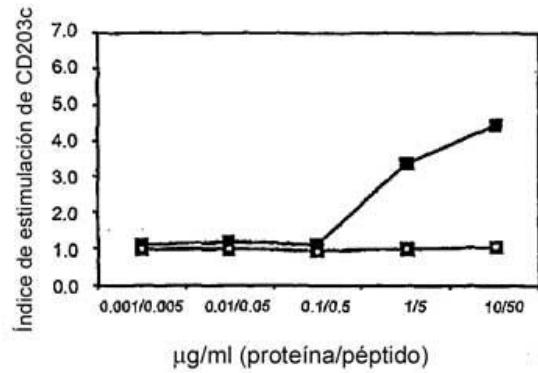


Fig. 17

Paciente MG



Paciente SM



Cont. Fig. 17

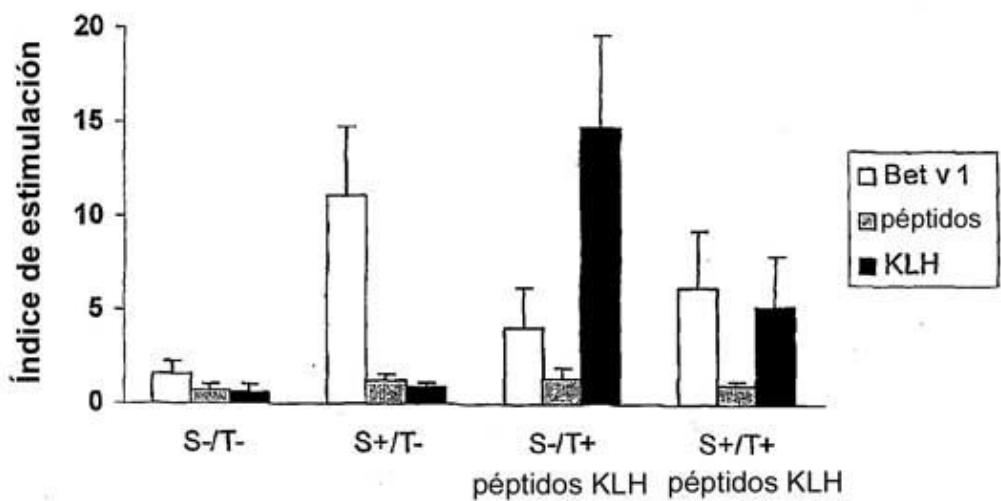


Fig. 18

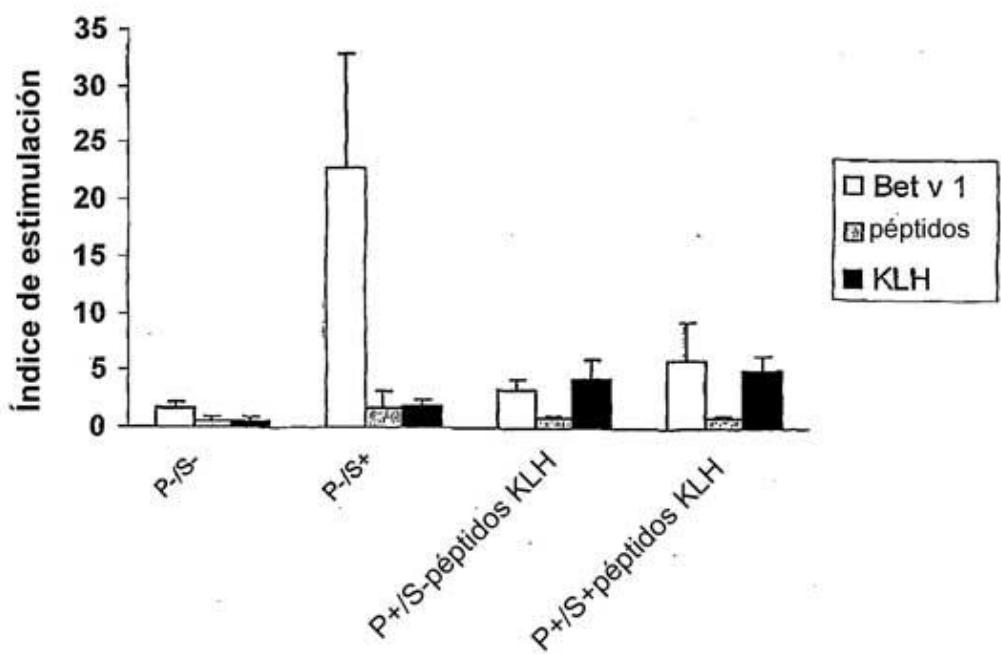


Fig. 19

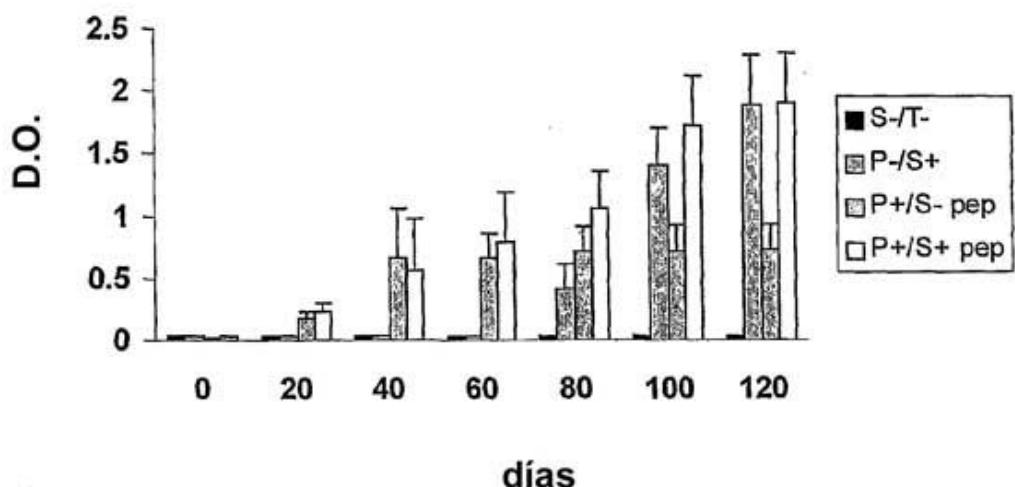


Fig. 20

Reactividad frente a IgE

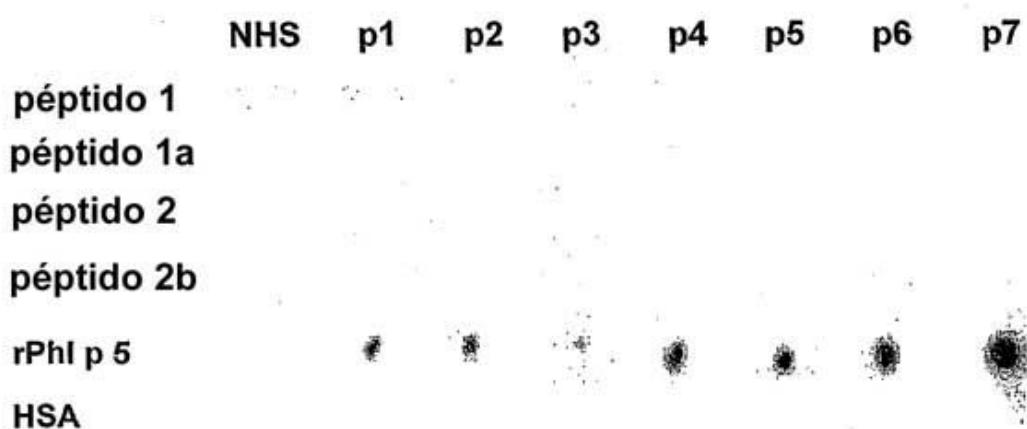
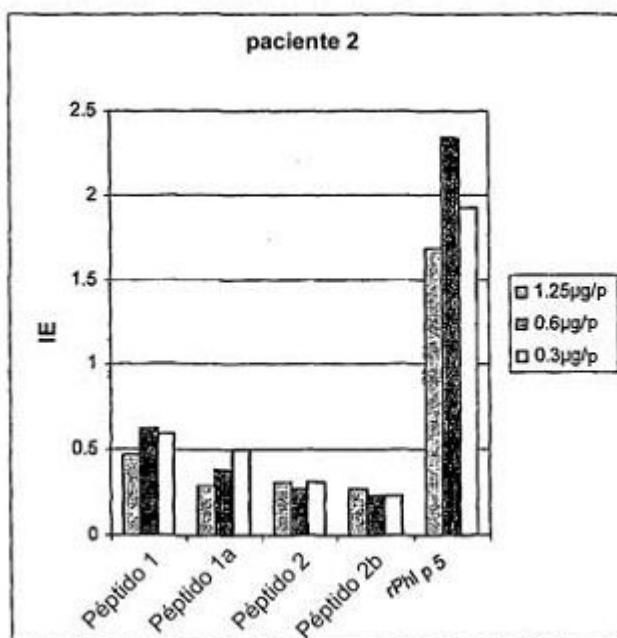
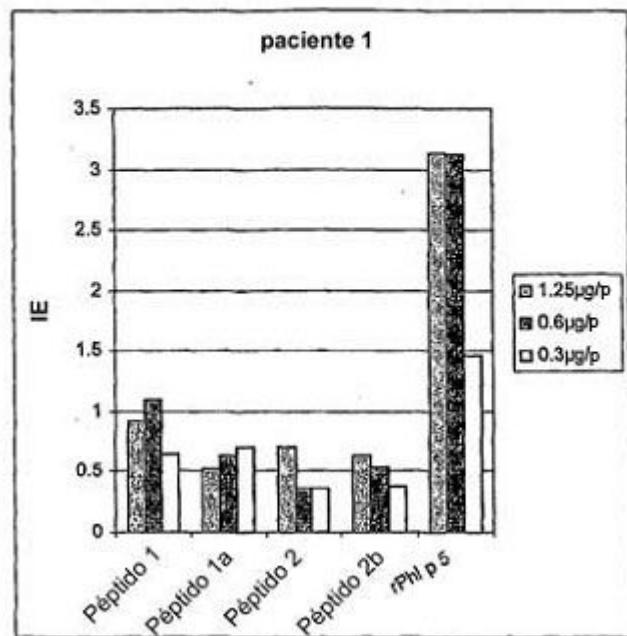


Fig. 21

Reactividad frente a células T



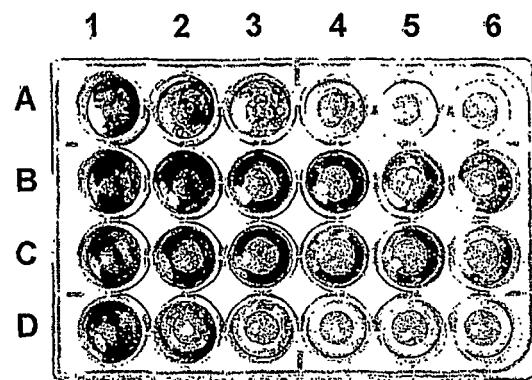


Fig. 23