

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 588**

51 Int. Cl.:

A61K 39/36 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2008 E 08715749 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2121012**

54 Título: **Péptidos derivados del alérgeno principal de ambrosía (*Ambrosia artemisiifolia*) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

13.02.2007 EP 07102260

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

29.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FERREIRA, FATIMA;
BOHLE, BARBARA;
JAHN-SCHMID, BEATRICE;
WOPFNER, NICOLE;
SCHMIDT, GEORG y
EBNER, CHRISTOF**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

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

ES 2 561 588 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados del alérgeno principal de ambrosía (*Ambrosia artemisiifolia*) y usos de los mismos

5 La presente invención se refiere a péptidos derivados de Amb a 1.

10 Ambrosía (*Ambrosia artemisiifolia*) y la artemisa (*Artemisia vulgaris*) son malas hierbas alergénicas importantes que pertenecen a la familia de plantas *Asteraceae* o *Compositae*. El polen de artemisa es una de las principales causas de reacciones alérgicas a finales del verano y otoño en Europa y afecta a aproximadamente el 10-14% de los
 15 pacientes que padecen polinosis. El polen de ambrosía representa la fuente principal de proteína alergénica en los Estados Unidos, con una prevalencia de aproximadamente el 50% en individuos atópicos 27.10. En Europa, la alergia a ambrosía está aumentando en la actualidad rápidamente, en particular en determinadas zonas de Francia, Italia, Austria, Hungría, Croacia y Bulgaria. Amb a 1, el alérgeno principal de ambrosía y Art v 1, el alérgeno principal de artemisa, respectivamente, son proteínas no relacionadas. Amb a 1 es una proteína no glicosilada de 38 kDa
 20 ácida. Amb a 1 natural experimenta proteólisis durante la purificación y se escinde dando dos cadenas designadas como cadena alfa y beta. Se notificó que la cadena alfa de 26-kDa se asociaba de manera no covalente con la cadena beta de 12-kDa (King *et al.* *Immunochem* 11:83-92, 1974). La forma de dos cadenas de Amb a 1 parece ser indistinguible inmunológicamente de la molécula de longitud completa (King *et al.* *Arch Biochem Biophys* 212:127-135, 1981).

25 Amb a 1 natural (nAmb a 1) de ambrosía fue el primer alérgeno descrito y aislado (King *et al.* *Biochem* 3:458-468, 1964). El ADNc que codifica para Amb a 1 se aisló de polen de ambrosía en 1991 por Rafnar *et al.* (*J. Biol. Chem.* 266:1229-1236). Pero hasta ahora, no se ha notificado ningún método para expresar y purificar grandes cantidades de Amb a 1 recombinante (rAmb a 1).activa y correctamente plegada

30 El documento WO 96/13589 se refiere a péptidos aislados que se derivan de Amb a 1 y comprenden al menos un epítipo de células T.

35 En el documento WO 90/11293 se describe la secuencia de aminoácidos de Amb a 1. En el mismo, también se han identificado péptidos de Amb a 1 que comprenden epítopos de células T y que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria específica de ambrosia.

40 El documento WO 99/34826 se refiere a métodos y medios para la desensibilización de pacientes mediante la administración de un péptido derivado de un alérgeno, péptido que puede desencadenar una respuesta de células T en un individuo.

45 En Michael J.G. *et al.* (*J.Br.Soc.Aller.Clin.Immunol.* 20(6) (1990):669-674) se ha examinado la respuesta de células T de péptidos que se obtienen mediante una digestión por proteasas de Amb a 1.

50 Cardinale E.J. *et al.* (*J.Aller.Clin.Immunol.* 107(2001):pág. 19) se refiere al uso de espectrometría de masas MALDI-TOF para identificar y caracterizar alérgenos.

55 El documento US 6.335.019 se refiere, entre otros, a péptidos de Amb a 1 que pueden provocar una respuesta de células T contra Amb a 1 en un individuo. Griffith *et al.* (*Int.Arch.Aller.Appl.Immunol.* 96(1991):296-304) se refiere a los polimorfismos de secuencia de los miembros de la familia Amb a 1 y Amb a 2.

60 Un objeto de la presente invención es proporcionar péptidos y moléculas derivados del alérgeno de polen de ambrosía Amb a 1 que pueden emplearse en el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de alergias, en particular alergias provocadas por alérgenos de polen de ambrosía.

65 Por tanto, la presente invención se refiere a formulaciones de vacuna, péptidos, proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, vectores y usos de los mismos tal como se define en las reivindicaciones.

Los péptidos derivados del alérgeno de polen de ambrosía Amb a 1, en particular de Amb a 1.3, pueden consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 37, SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 41, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 47, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 67, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 69, SEQ ID No. 77, SEQ ID No. 78, SEQ ID No. 79, SEQ ID No. 80, SEQ ID No. 81, SEQ ID No. 83, SEQ ID No. 86, SEQ ID No. 87, SEQ ID No. 88, SEQ ID No. 89, SEQ ID No. 90, SEQ ID No. 91, SEQ ID No. 93, SEQ ID No. 94, SEQ ID No. 96, SEQ ID No. 97, SEQ ID No. 98, SEQ ID No. 99, SEQ ID No. 100, SEQ ID No. 101, SEQ ID No. 102, SEQ ID No. 107, SEQ ID No. 108, SEQ ID No. 109, SEQ ID No. 110, SEQ ID No. 111, SEQ ID No. 112, SEQ ID No. 114, SEQ ID No. 115, SEQ ID No. 118, SEQ ID No. 119, SEQ ID No. 120, SEQ ID No. 121, SEQ ID No. 122, SEQ ID No. 123, SEQ ID No. 124, SEQ ID No. 125, SEQ ID No. 126, SEQ ID No. 127, SEQ ID No. 128, SEQ ID No. 129, SEQ ID No. 130, SEQ ID No. 131, SEQ ID No. 132, SEQ ID No. 133, SEQ ID No. 134, SEQ ID No. 135, SEQ ID No. 136, SEQ ID No. 137, SEQ ID No. 138 y SEQ ID No. 139.

Resultó que los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 37, SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 41, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 47, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 67, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 69, SEQ ID No. 77, SEQ ID No. 78, SEQ ID No. 79, SEQ ID No. 80, SEQ ID No. 81, SEQ ID No. 83, SEQ ID No. 86, SEQ ID No. 87, SEQ ID No. 88, SEQ ID No. 89, SEQ ID No. 90, SEQ ID No. 91, SEQ ID No. 93, SEQ ID No. 94, SEQ ID No. 96, SEQ ID No. 97, SEQ ID No. 98, SEQ ID No. 99, SEQ ID No. 100, SEQ ID No. 101, SEQ ID No. 102, SEQ ID No. 107, SEQ ID No. 108, SEQ ID No. 109, SEQ ID No. 110, SEQ ID No. 111, SEQ ID No. 112, SEQ ID No. 114, SEQ ID No. 115, SEQ ID No. 118, SEQ ID No. 119, SEQ ID No. 120, SEQ ID No. 121, SEQ ID No. 122, SEQ ID No. 123, SEQ ID No. 124, SEQ ID No. 125, SEQ ID No. 126, SEQ ID No. 127, SEQ ID No. 128, SEQ ID No. 129, SEQ ID No. 130, SEQ ID No. 131, SEQ ID No. 132, SEQ ID No. 133, SEQ ID No. 134, SEQ ID No. 135, SEQ ID No. 136, SEQ ID No. 137, SEQ ID No. 138 y SEQ ID No. 139, muestran reactividad con células T aisladas de individuos alérgicos y, en consecuencia, pueden emplearse en la producción de vacunas, especialmente vacunas para alergias provocadas por alérgenos de polen de ambrosía y alergias que reaccionan de manera cruzada con alérgenos de polen de ambrosía. En particular los péptidos que tienen SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 86, SEQ ID No. 91 y SEQ ID No. 126 a SEQ ID No. 139 muestran alta reactividad de células T con muestras obtenidas de individuos que padecen alergia al polen de ambrosía.

Una ventaja adicional de los péptidos de la presente invención es que todos ellos carecen de actividad de unión a IgE. Por tanto, las moléculas que comprenden estos péptidos no provocan reacciones alérgicas (por ejemplo aumento de la liberación de histamina) cuando se administran a un individuo.

Para fines terapéuticos, los péptidos derivados de los alérgenos no se unen a IgE específica para Amb a 1 o se unen a tal IgE en un grado sustancialmente menor (por ejemplo al menos 100 veces menos y más preferiblemente al menos 1000 veces menos de unión) que el correspondiente Amb a 1 nativo purificado o la cadena beta de Amb a 1 producida de manera recombinante. Si un péptido de la invención va a usarse como reactivo de diagnóstico, no es necesario que el péptido o la proteína tenga actividad de unión a IgE reducida en comparación con el alérgeno Amb a 1 nativo. La actividad de unión a IgE de los péptidos puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando, por ejemplo, sueros obtenidos de un individuo (es decir un individuo alérgico) que se ha expuesto previamente al Amb a 1 nativo. En resumen, los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un péptido que va a someterse a prueba. Tras lavar y bloquear los pocillos, se incuba en los pocillos una disolución de anticuerpo que consiste en el suero o plasma de un individuo alérgico que se ha expuesto al péptido que está sometiéndose a prueba o a la proteína de la que se derivó. Generalmente se agota la IgG del plasma antes de la incubación. Sin embargo, el agotamiento no es necesario si se usan anticuerpos anti-IgE altamente específicos. Además, los individuos alérgicos que no se han sometido a inmunoterapia específica en algunos casos casi no tienen anticuerpos IgG detectables específicos para el alérgeno en cuestión. Se añade un anticuerpo secundario marcado a los pocillos y se incuba. Se cuantifica entonces la cantidad de unión a IgE y se compara con la cantidad de IgE a la que se une una proteína Amb a 1 nativa purificada. Alternativamente, la actividad de unión de un péptido puede determinarse mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Por ejemplo, un péptido que va a someterse a prueba se procesa sobre un gel de poliacrilamida usando SDS-PAGE. El péptido se transfiere entonces a nitrocelulosa y se incuba posteriormente con sueros de un sujeto alérgico. Tras la incubación con el anticuerpo secundario marcado, se determina entonces y se cuantifica la cantidad de IgE unida.

Otro ensayo que puede usarse para determinar la actividad de unión a IgE de un péptido es un ensayo ELISA de competición. En resumen, se genera una reserva de anticuerpo IgE combinando plasma o suero de individuos alérgicos al polen de ambrosía que se ha mostrado mediante ELISA directo que tienen IgE reactiva con Amb a 1 nativo. Esta reserva se usa en ensayos ELISA de competición para comparar la unión de IgE a Amb a 1 nativo con el péptido sometido a prueba. Se determina y se cuantifica la unión a IgE para la proteína Amb a 1 nativa y el péptido que está sometiéndose a prueba.

Además, los péptidos de la presente invención preferiblemente no dan como resultado la liberación de mediadores (por ejemplo histaminas) a partir de mastocitos o basófilos. Para determinar si un péptido que se une a IgE da como resultado la liberación de mediadores, puede realizarse un ensayo de liberación de histamina usando reactivos y protocolos convencionales. En resumen, se combina una disolución tamponada de un péptido que va a someterse a prueba con un volumen igual de sangre heparinizada completa de un sujeto alérgico. Tras el mezclado y la incubación, se sedimentan las células y se procesan los sobrenadantes y se analizan usando, por ejemplo, un radioinmunoanálisis para determinar la cantidad de histamina liberada.

La molécula descrita en el presente documento puede comprender en cualquier combinación más de un péptido de la presente invención. Estos péptidos pueden conjugarse químicamente o fusionarse entre sí mediante tecnología recombinante. Una molécula de este tipo puede comprender al menos dos, tres, cuatro, cinco, siete, diez, 15, 20, péptidos.

Los péptidos de la invención pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante en una célula huésped

transformada con un ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica para tal péptido. Los péptidos aislados de la invención también pueden producirse mediante síntesis química. Por supuesto, también es posible producir los péptidos mediante escisión química o enzimática del alérgeno proteico.

5 Cuando se produce un péptido mediante técnicas recombinantes, se cultivan células huésped transformadas con un ácido nucleico de la invención (o el equivalente funcional del ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica para el péptido (o equivalente funcional del péptido) en un medio adecuado para las células. Pueden purificarse péptidos del medio de cultivo celular, células huésped o ambos usando técnicas conocidas en la técnica para purificar péptidos y proteínas incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis o inmunopurificación con anticuerpos específicos para el péptido. Péptidos aislados de la invención están sustancialmente libres de material celular o medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas de ADN recombinante o sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente o libres de otros materiales y reactivos cuando se producen mediante escisión química o enzimática.

15 Los péptidos descritos en el presente documento también pueden modificarse mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por tanto, estos péptidos pueden comprender al menos 7 residuos de aminoácido de las secuencias de aminoácidos SEQ ID No. 1 a 139. Los péptidos pueden tener más de 12 residuos de aminoácido, por lo cual estos residuos adicionales pueden derivarse de la molécula Amb a 1 nativa y encontrándose adyacentes al péptido en la molécula de Amb a 1 nativa, aminoácidos al azar u otros péptidos o proteínas. Sin embargo, estos péptidos modificados (variantes) presentan propiedades similares o incluso idénticas que los péptidos no modificados. En particular las propiedades inmunogénicas tienen que ser sustancialmente idénticas. Esto significa que los anticuerpos dirigidos a estos péptidos modificados también pueden unirse a péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID No. 1 a 139.

25 Tal como se usa en el presente documento, un "péptido" se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene menos residuos de aminoácido que la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de la que se derivó el péptido. El término "péptido" también se refiere a cualquier equivalente funcional o variantes de un péptido o a cualquier fragmento o porción de un péptido. Los "equivalentes funcionales" de un péptido incluyen péptidos que tienen la misma capacidad o una capacidad potenciada para unirse a MHC, péptidos que pueden estimular las mismas subpoblaciones de células T, péptidos que tienen la misma capacidad o una capacidad aumentada para inducir respuestas de células T tales como estimulación (proliferación o secreción de citocina), péptidos que tienen al menos el mismo nivel de unión a IgE reducida, y péptidos que provocan al menos el mismo nivel mínimo de actividad estimulante de la síntesis de IgE que los péptidos derivados directamente de Amb a 1. Actividad estimulante de IgE mínima se refiere a una actividad estimulante de la síntesis de IgE que es menor que la cantidad de producción de IgE provocada por un alérgeno de polen de ambrosía nativo purificado. Los péptidos descritos en el presente documento pueden consistir en de 6 a 50, preferiblemente de 7 a 45, más preferiblemente de 8 a 40, incluso más preferiblemente de 9 a 35, en particular de 10 a 30, residuos de aminoácido. Los "equivalentes funcionales" de péptidos pueden comprender además en el extremo C- y/o N-terminal de dichos péptidos al menos un residuo de aminoácido adicional, que puede servir como grupo de unión (por ejemplo cisteína) o que puede encontrarse adyacente al péptido en Amb a 1 de tipo natural.

45 El término "variante" tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácido de otro péptido habitualmente relacionado. La variante puede tener cambios "conservativos", en la que un aminoácido sustituido tiene propiedades químicas o estructurales similares. Un tipo de sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-de hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Más raramente, una variante puede tener cambios "no conservativos" (por ejemplo, sustitución de una glicina por un triptófano). Variaciones menores similares también pueden incluir delecciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Las variantes de los péptidos y las moléculas descritas en el presente documento tienen menos del 10%, y preferiblemente menos del 5%, y todavía más preferiblemente menos del 2% de cambios (ya sean sustituciones, delecciones e inserciones).

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un péptido derivado del alérgeno de polen de ambrosía Amb a 1 y que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 52 y variantes de la misma que difieren en un residuo de aminoácido.

65 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una proteína de fusión tal como se define en las reivindicaciones 5 y 6 que comprende al menos un péptido de la presente invención y al menos un segundo péptido derivado de un inmunógeno distinto de Amb a 1.

Una proteína de fusión de este tipo puede emplearse, por ejemplo, como vacuna que induce una respuesta inmunitaria contra un péptido de alérgeno de polen de ambrosía de la presente invención y dicho segundo inmunógeno.

5 Con el fin de obtener anticuerpos contra moléculas pequeñas (hapteno) como los péptidos de la presente invención, estas moléculas pequeñas pueden unirse (por ejemplo conjugarse) a un portador. Esta unión hace que el hapteno sea inmunogénico, esto significa que se generan anticuerpos tras la inyección en un individuo. La unión del hapteno a una proteína portadora es a menudo covalente, pero puede ser iónica o efectuarse a través de un componente
10 químico que forma un puente entre el hapteno y el portador. El portador es normalmente una proteína, pero también puede contener azúcar y grasa en forma de polímero o monomérica.

El inmunógeno según la presente invención es un alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Amb a 2, Amb a
15 3, Amb a 5, Amb a 6, Amb a 7, Amb a 8, Amb a 9, Amb a 10, Amb t 5, Art v 1, Art v 2, Art v 3, Art v 4, Art v 5, Art v 6, Hel a 1, Hel a 2, Hel a 3, Mer a 1, Che a 1, Che a 2, Che a 3, Sal k 1, Cat r 1, Pla 1 1, Hum j 1, Par j 1, Par j 2, Par j 3, Par o 1, Cyn d 1, Cyn d 7, Cyn d 12, Cyn d 15, Cyn d 22w, Cyn d 23, Cyn d 24, Dac g 1, Dac g 2, Dac g 3, Dac g 5, Fes p 4w, Hol 1 1, Lol p 1, Lol p 2, Lol p 3, Lol p 5, Lol p 11, Pha a 1, Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 11, Phl p 12, Phl p 13, Poa p 1, Poa p 5, Sor h 1, Pho d 2, Aln g 1, Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 6, Bet v 7, Car b 1, Cas s 1, Cas s 5, Cas s 8, Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 10, Cor a 11, Que a 1, Fra e 1, Lig v 1, Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 4, Ole e 5, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10, Syr v 1, Cry j 1, Cry j 2, Cup a 1, Cup s 1, Cup s 3w, Jun a 1, Jun a 2, Jun a 3, Jun o 4, Jun s 1, Jun v 1, Pla a 1, Pla a 2, Pla a 3, Aca s 13, Blo t 1, Blo t 3, Blo t 4, Blo t 5, Blo t 6, Blo t 10, Blo t 11, Blo t 12, Blo t 13, Blo t 19, Der f 1, Der f 2, Der f 3, Der f 7, Der f 10, Der f 11, Der f 14, Der f 15, Der f 16, Der f 17, Der f 18w, Der m 1, Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9, Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 20, Der p 21, Eur m 2, Eur m 14, Gly d 2, Lep d 1, Lep d 2, Lep d 5, Lep d 7, Lep d 10, Lep d 13, Tyr p 2, Tyr p 13, Bos d 2, Bos d 3, Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d 8, Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Equ c 4, Equ c 5, Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5w, Fel d 6w, Fel d 7w, Cav p 1, Cav p 2, Mus m 1, Rat n 1, Alt a 1, Alt a 3, Alt a 4, Alt a 5, Alt a 6, Alt a 7, Alt a 8, Alt a 10, Alt a 12, Alt a 13, Cla h 2, Cla h 5, Cla h 6, Cla h 7, Cla h 8, Cla h 9, Cla h 10, Cla h 12, Asp f 13, Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4, Asp f 5, Asp f 6, Asp f 7, Asp f 8, Asp f 9, Asp f 10, Asp f 11, Asp f 12, Asp f 13, Asp f 15, Asp f 16, Asp f 17, Asp f 18, Asp f 22w, Asp f 23, Asp f 27, Asp f 28, Asp f 29, Asp n 14, Asp n 18, Asp n 25, Asp o 13, Asp o 21, Pen b 13, Pen b 26, Pen ch 13, Pen ch 18, Pen ch 20, Pen c 3, Pen c 13, Pen c 19, Pen c 22w, Pen c 24, Pen o 18, Fus c 1, Fus c 2, Tri r 2, Tri r 4, Tri t 1, Tri t 4, Cand a 1, Cand a 3, Cand b 2, Psi c 1, Psi c 2, Cop c 1, Cop c 2, Cop c 3, Cop c 5, Cop c 7, Rho m 1, Rho m 2, Mala f 2, Mala f 3, Mala f 4, Mala s 1, Mala s 5, Mala s 6, Mala s 7, Mala s 8, Mala s 9, Mala s 10, Mala s 11, Mala s 12, Mala s 13, Epi p 1, Aed a 1, Aed a 2, Api m 1, Api m 2, Api m 4, Api m 6, Api m 7, Bom p 1, Bom p 4, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Bla g 6, Bla g 8, Per a 1, Per a 3, Per a 6, Per a 7, Chi k 10, Chi t 1-9, Chi t 1.01, Chi t 1.02, Chi t 2.0101, Chi t 2.0102, Chi t 3, Chi t 4, Chi t 5, Chi t 6.01, Chi t 6.02, Chi t 7, Chi t 8, Chi t 9, Cte f 1, Cte f 2, Cte f 3, Tha p 1, Lep s 1, Dol m 1, Dol m 2, Dol m 5, Dol a 5, Pol a 1, Pol a 2, Pol a 5, Pol d 1, Pol d 4, Pol d 5, Pol e 1, Pol e 5, Pol f 5, Pol g 5, Pol m 5, Vesp c 1, Vesp c 5, Vesp m 1, Vesp m 5, Ves f 5, Ves g 5, Ves m 1, Ves m 2, Ves m 5, Ves p 5, Ves s 5, Ves vi 5, Ves v 1, Ves v 2, Ves v 5, Myr p 1, Myr p 2, Sol g 2, Sol g 4, Sol i 2, Sol i 3, Sol i 4, Sol s 2, Tria p 1, Gad c 1, Sal s 1, Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d 8, Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 4, Gal d 5, Met e 1, Pen a 1, Pen i 1, Pen m 1, Pen m 2, Tod p 1, Hel as 1, Hal m 1, Ran e 1, Ran e 2, Bra j 1, Bra n 1, Bra o 3, Bra r 1, Bra r 2, Hor v 15, Hor v 16, Hor v 17, Hor v 21, Sec c 20, Tri a 18, Tri a 19, Tri a 25, Tri a 26, Zea m 14, Zea m 25, Ory s 1, Api g 1, Api g 4, Api g 5, Dau c 1, Dau c 4, Cor a 1.04, Cor a 2, Cor a 8, Fra a 3, Fra a 4, Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, Mal d 4, Pyr c 1, Pyr c 4, Pyr c 5, Pers a 1, Pru ar 1, Pru ar 3, Pru av 1, Pru av 2, Pru av 3, Pru av 4, Pru d 3, Pru du 4, Pru p 3, Pru p 4, Aspa o 1, Cro s 1, Cro s 2, Lac s 1, Vit v 1, Mus xp 1, Ana c 1, Ana c 2, Cit 1 3, Cit s 1, Cit s 2, Cit s 3, Lit c 1, Sin a 1, Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4, Vig r 1, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7, Ara h 8, Len c 1, Len c 2, Pis s 1, Pis s 2, Act c 1, Act c 2, Cap a 1w, Cap a 2, Lyc e 1, Lyc e 2, Lyc e 3, Sola t 1, Sola t 2, Sola t 3, Sola t 4, Ber e 1, Ber e 2, Jug n 1, Jug n 2, Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Ana o 1, Ana o 2, Ana o 3, Ric c 1, Ses i 1, Ses i 2, Ses i 3, Ses i 4, Ses i 5, Ses i 6, Cuc m 1, Cuc m 2, Cuc m 3, Ziz m 1, Ani s 1, Ani s 2, Ani s 3, Ani s 4, Arg r, Asc s 1, Car p 1, Den n 1, Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 6.03, Hev b 7.01, Hev b 7.02, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10, Hev b 11, Hev b 12, Hev b 13, Hom s 1, Hom s 2, Hom s 3, Hom s 4, Hom s 5 y Trip s 1.

Se prefiere particularmente fusionar los péptidos de la presente invención derivados del alérgeno de polen de ambrosía Amb a 1 con péptidos derivados de otros alérgenos. Una proteína de fusión/polipéptido/péptido de este tipo es útil cuando se usa en una vacuna o en diagnóstico. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para un péptido o una proteína de fusión según la presente invención.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede emplearse, por ejemplo, para la producción recombinante de los péptidos/polipéptidos/proteínas codificados por dicha molécula de ácido nucleico. Además, también pueden usarse para aspectos terapéuticos (por ejemplo terapia génica, terapia celular).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la presente invención.

65 La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede introducirse en un vector. El vector puede usarse para

la producción recombinante de los péptidos y moléculas de la presente invención o para aspectos terapéuticos.

“Vector”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un plásmido, cósmido y ADN viral y de fago. Un plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico según la presente invención puede contener próximo a dicha molécula, por ejemplo, un origen de replicación, marcadores de selección (por ejemplo marcadores de resistencia a antibióticos, marcadores auxotróficos), un sitio de clonación múltiple, una región promotora unida operativamente a dicha molécula y/o tramos de secuencia para la integración homóloga del vector o partes del mismo en el genoma de un huésped.

Preferiblemente, el vector de la presente invención comprende además un promotor operativamente unido a dicha molécula de ácido nucleico, dando como resultado así un casete de expresión.

El casete de expresión de la presente invención comprende un promotor y una molécula de ácido nucleico que codifica para un péptido de la presente invención. El promotor está situado preferiblemente en el extremo 5' (en el sentido de 5') de la molécula de ácido nucleico de la presente invención. El promotor que va a usarse en el casete de expresión puede ser uno cualquiera, siempre que el promotor pueda controlarse por el huésped respectivo.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una formulación de vacuna que comprende al menos una proteína de fusión y/o un péptido según la presente invención.

El péptido y/o proteína de fusión de la presente invención que comprende al menos un péptido derivado del alérgeno de polen de ambrosía Amb a 1 y que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 52 puede usarse en una formulación de vacuna. Puesto que estos péptidos pueden provocar una respuesta de células T contra el alérgeno de polen de ambrosía Amb a 1, la formulación de vacuna puede usarse para la desensibilización, la prevención o el tratamiento de alergias al polen de ambrosía y alergias que reaccionan de manera cruzada con alérgenos de polen de ambrosía (por ejemplo polen de artemisa). Debido a la falta de actividad de unión a IgE, los péptidos son en particular ventajosos cuando se usan en una vacuna, porque dicha vacuna no provoca o sustancialmente no provoca una reacción alérgica. La formulación de vacuna de la presente invención puede comprender al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, péptidos tal como se dan a conocer en el presente documento.

La administración de las composiciones terapéuticas de la presente invención a un individuo que va a desensibilizarse puede llevarse a cabo usando procedimientos conocidos a dosis y durante periodos de tiempo eficaces para reducir la sensibilidad (es decir reduce la respuesta alérgica) del individuo al alérgeno. Las cantidades eficaces de las composiciones terapéuticas variarán según factores tales como el grado de sensibilidad del individuo a Amb a 1, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad de la proteína o el fragmento de la misma para provocar una respuesta antigénica en el individuo. El compuesto activo (es decir proteína o fragmento de la misma) puede administrarse de una manera conveniente tal como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, aplicación transdérmica o administración rectal. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede recubrirse con un material para proteger el compuesto frente a la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto (véase a continuación). Por ejemplo, preferiblemente pueden administrarse mediante inyección aproximadamente 0,05 µg-1000 µg, más preferiblemente desde aproximadamente 0,1-100 µg de compuesto activo (es decir proteína o fragmento de la misma) por unidad de dosificación. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse diariamente varias dosis divididas o la dosis puede reducirse proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

La formulación de vacuna de la presente invención comprende además al menos un adyuvante, excipiente y/o portador farmacéutico aceptable.

Portadores farmacéuticamente aceptables usados preferiblemente son solución salina fisiológica, aceites vegetales, aceite mineral, carboximetilcelulosa de sodio acuosa o polivinilpirrolidona acuosa. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a: sustancias activas de superficie, por ejemplo, hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de aminoácido de octadecilo, lisolecitina, bromuro de dimetil-dioctadecilamonio, metoxihexadecilglicerol y polioles plurónicos; poliaminas, por ejemplo, pirano, sulfato de dextrano, poli IC, carbopol; péptidos, por ejemplo, dipéptido de muramilo, dimetilglicina, tuftsina; emulsiones de aceite; y geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc. y complejos inmunoestimulantes. El adyuvante puede ser, por ejemplo, alumbre o una composición que contiene un aceite vegetal, monooleato de isomanida y monoestearato de aluminio. Otros adyuvantes preferidos incluyen micropartículas o perlas de materiales de matriz biocompatibles. Las moléculas de la presente invención pueden incorporarse en micropartículas o microcápsulas para prolongar la exposición del material antigénico al individuo y por tanto proteger a dicho individuo frente a la infección durante largos periodos de tiempo. El inmunógeno puede incorporarse también en liposomas o conjugarse con polisacáridos y/u otros polímeros para su uso en una formulación de vacuna.

También parte de esta invención es una composición que comprende las moléculas, en particular los péptidos, de esta invención y un portador, preferiblemente un portador biológicamente aceptable, y más preferiblemente un

portador farmacéuticamente aceptable. Portadores típicos son portadores acuosos tales como agua, disoluciones acuosas tamponadas, mezclas alcohólicas acuosas, y similares. Composiciones que comprenden portadores que son para uso farmacéutico, particularmente para su uso en seres humanos, comprenden un portador que es farmacéuticamente aceptable. En la técnica se conocen ejemplos de tales portadores.

5 Normalmente, tales vacunas se preparan como formulaciones inyectables: o bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de su inyección. La vacuna puede administrarse a un animal objetivo por cualquier vía conveniente, tal como por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía intravenosa, por vía oral, por vía intranasal o por vía intramamaria, en presencia de un diluyente fisiológicamente aceptable. Los antígenos pueden administrarse en una única dosis o en una pluralidad de dosis. La vacuna de la presente invención puede almacenarse con refrigeración o en forma congelada o liofilizada. La vacuna se administra a un individuo en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria protectora en comparación con un control. La cantidad eficaz variará, por ejemplo, con la edad y el tamaño y puede determinarla fácilmente el experto en la técnica. Los regímenes adecuados para la administración inicial y administraciones de refuerzo también serán variables, pero pueden tipificarse mediante una administración inicial seguida por inoculaciones posteriores u otras administraciones.

20 La formulación de vacuna de la presente invención contiene al menos una molécula que comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 37, SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 41, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 47, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 67, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 69, SEQ ID No. 77, SEQ ID No. 78, SEQ ID No. 79, SEQ ID No. 80, SEQ ID No. 81, SEQ ID No. 83, SEQ ID No. 86, SEQ ID No. 87, SEQ ID No. 88, SEQ ID No. 89, SEQ ID No. 90, SEQ ID No. 91, SEQ ID No. 93, SEQ ID No. 94, SEQ ID No. 96, SEQ ID No. 97, SEQ ID No. 98, SEQ ID No. 99, SEQ ID No. 100, SEQ ID No. 101, SEQ ID No. 102, SEQ ID No. 107, SEQ ID No. 108, SEQ ID No. 109, SEQ ID No. 110, SEQ ID No. 111, SEQ ID No. 112, SEQ ID No. 114, SEQ ID No. 115, SEQ ID No. 118, SEQ ID No. 119, SEQ ID No. 120, SEQ ID No. 121, SEQ ID No. 122, SEQ ID No. 123, SEQ ID No. 124, SEQ ID No. 125, SEQ ID No. 126, SEQ ID No. 127, SEQ ID No. 128, SEQ ID No. 129, SEQ ID No. 130, SEQ ID No. 131, SEQ ID No. 132, SEQ ID No. 133, SEQ ID No. 134, SEQ ID No. 135, SEQ ID No. 136, SEQ ID No. 137, SEQ ID No. 138 y SEQ ID No. 139.

35 La formulación de vacuna de la presente invención puede comprender al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 86, SEQ ID No. 91 y SEQ ID No. 126-SEQ ID No. 139, en la que una realización adicional preferida de la formulación comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 137 a 139. En particular, estas moléculas muestran una alta reactividad frente a células T en pacientes que padecen alergia a ambrosía (los péptidos se reconocen por más del 90% de los individuos alérgicos sensibilizados a alergias a ambrosía). Además, estas moléculas/péptidos pueden formularse solos o en cualquier combinación en una única formulación. Por tanto la formulación de vacuna puede comprender al menos dos, preferiblemente al menos tres, de los péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 86, SEQ ID No. 91 y SEQ ID No. 126-SEQ ID No. 139, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID No. 52 y SEQ ID No. 137 a 139. Combinaciones preferidas particulares de los péptidos son: SEQ ID No. 52 y SEQ ID No. 137; SEQ ID No. 52 y SEQ ID No. 138; SEQ ID No. 52 y SEQ ID No. 139; SEQ ID No. 137 y SEQ ID No. 138; SEQ ID No. 137 y SEQ ID No. 139; SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 137 y SEQ ID No. 138; SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 138 y SEQ ID No. 139; SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 137 y SEQ ID No. 139; SEQ ID No. 137, SEQ ID No. 138 y SEQ ID No. 139; SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 137, SEQ ID No. 138 y SEQ ID No. 139.

50 Aún otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un péptido y/o una proteína de fusión según la presente invención para la fabricación de una formulación de vacuna tal como se explicó de manera resumida anteriormente.

55 La formulación de vacuna se usa para prevenir o tratar una alergia al polen de ambrosía en un individuo, en particular una alergia provocada por Amb a 1, o una alergia que reacciona de manera cruzada con una alergia al polen de ambrosía.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una molécula tal como se da a conocer en el presente documento para diagnosticar *in vitro* una alergia a ambrosía o la sensibilidad de un individuo a un alérgeno de polen de ambrosía, en particular a Amb a 1.

65 Las moléculas de la presente invención, en particular los péptidos de la presente invención, pueden usarse también para fines de diagnóstico. Pueden usarse moléculas y péptidos de la presente invención para detectar y diagnosticar *in vitro* alergia a ambrosía o una alergia que reacciona de manera cruzada con Amb a 1. Por ejemplo, esto podría realizarse combinando sangre o productos sanguíneos obtenidos de un individuo que va a examinarse para detectar sensibilidad a alergia a ambrosía con un péptido o péptidos antigénicos aislados de Amb a 1 o cadena alfa o beta de Amb a 1 aislada, en condiciones apropiadas para la unión de componentes en la sangre (por ejemplo, anticuerpos,

células T, células B) con el/los péptido(s) o proteína y determinando el grado en que se produce tal unión. Otros métodos de diagnóstico para enfermedades alérgicas con los que pueden usarse los péptidos de la presente invención incluyen prueba radioalergosorbente (RAST), prueba radioinmunsorbente sobre papel (PRIST), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), inmunoanálisis radiométricos (IRMA),
 5 inmunoensayos de luminiscencia (LIA), ensayos de liberación de histamina e inmunotransferencias de IgE.

Un método para diagnosticar la sensibilidad de un individuo a un alérgeno de polen de ambrosía, en particular a Amb a 1, puede comprender las etapas:

- 10 - proporcionar una muestra de un individuo que contiene mastocitos o basófilos y/o anticuerpos, en particular anticuerpos de la clase IgE,
- poner en contacto dicha muestra con una proteína de fusión/péptido según la presente invención
- 15 - determinar la cantidad de histamina liberada desde los mastocitos o basófilos tras el contacto con dicha molécula y/o determinar la cantidad de anticuerpos específicos para alérgeno de polen de ambrosía en la muestra, y
- diagnosticar la sensibilidad de un individuo a un alérgeno de polen de ambrosía, en particular a Amb a 1, si la cantidad de histamina liberada y/o la cantidad de anticuerpos específicos para alérgeno de polen de ambrosía en
 20 la muestra aumenta en comparación con una muestra obtenida de un individuo que no padece una alergia al polen de ambrosía o una alergia que presenta reactividad cruzada con alergia al polen de ambrosía.

La muestra usada en el método según la presente invención es preferiblemente una muestra de sangre, lágrimas, saliva o secreción nasal.

25 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin embargo, sin restringirse a los mismos.

30 La figura 1 muestra la purificación de rAmb a 1.3 con cromatografía de quelato de níquel (NCC) en urea 8 M. Se analizaron muestras con SDS-PAGE/tinción de Coomassie. Las fracciones purificadas mostraron una agregación extensa.

35 La figura 2 muestra el análisis de transferencia puntual de IgE de Amb a 1.3 recombinante. Se purificó rAmb a 1.3 producido en *E. coli* tal como se describió anteriormente y se transfirió en puntos sobre membranas de nitrocelulosa. Se sometieron a prueba sueros de 17 pacientes alérgicos al polen de ambrosía (1-17) y mostraron una reactividad de IgE muy débil o ausente con rAmb a 1.3. Los mismos pacientes mostraron una reactividad de IgE fuerte con nAmb a 1.

40 La figura 3 muestra TCL estimuladas con Amb a 1 natural purificado o rAmb a 1.3 a diferentes concentraciones. Se muestran los valores de las concentraciones óptimas. N=13; coeficiente de correlación de Pearson: 0,979 ** (p<0,01) o rho de Spearman: 0,912**.

45 La figura 4 muestra ejemplos de titulaciones de alérgenos en ensayos de proliferación de TCL - alérgenos naturales frente a recombinantes (lotes diferentes de rAmb a 1.3, lotes L1-L4). STA y OPO son TCL de 2 pacientes alérgicos a ambrosía diferentes, respectivamente.

La figura 5 muestra una producción de citocina similar inducida por extracto de ambrosía y rAmb a 1.3 en TCL.

50 La figura 6 muestra una producción de citocina comparable inducida por Amb a 1.3 natural y rAmb a 1.3 en TCL y TCC.

La figura 7 muestra que TCL inducidas con Amb a 1.3 natural o rAmb a 1.3 reconocen epítomos de células T similares.

55 La figura 8 muestra regiones de activación de células T relevantes de Amb a 1.3. Se analizó por separado el porcentaje de pacientes que reconocen cada epítomo para índices de estimulación superiores a 3 (SI>3) y 5 (SI>5), respectivamente.

60 La figura 9 muestra una inmunotransferencia de IgE de nAmb a 1 purificado. Se separó nAmb a 1 mediante SDS-PAGE, y se sometió a electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. Se incubaron tiras de la membrana con sueros de pacientes alérgicos al polen de ambrosía (carriles 1-29) o con suero de un donante no alérgico (carril C). Se detectó la IgE unida con anticuerpo de cabra anti-IgE humana marcado con ¹²⁵I. Se reclutaron pacientes sensibilizados al polen de ambrosía en Austria (carriles 1-13) o en Italia (carriles 14-29).

65 La figura 10 muestra una tinción de Coomassie de Amb a 1 natural purificado tras SDS-PAGE y electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. Las bandas correspondientes a nAmb a 1 no procesado, cadenas alfa y beta se

sometieron a degradación de Edman para obtener las secuencias N-terminales.

La figura 11 muestra la secuencia N-terminal de Amb a 1 natural no procesado (nAmb a 1, véase la figura 10) y su alineación con secuencias de aminoácidos deducidas de isoformas de Amb a 1.

5 La figura 12 muestra la secuencia N-terminal de la cadena alfa de Amb a 1 natural (nAmb a 1, véase la figura 10) y su alineación con secuencias de aminoácidos deducidas de isoformas de Amb a 1.

10 La figura 13 muestra la secuencia N-terminal de la cadena beta de Amb a 1 natural (nAmb a 1, véase la figura 10) y su alineación con secuencias de aminoácidos deducidas de isoformas de Amb a 1.

15 La figura 14 muestra secuencias de aminoácidos deducidas de isoformas de Amb a 1 y sus cadenas alfa y beta supuestas. Las isoformas Amb a 1.1, Amb a 1.2, Amb a 1.3, Amb a 1.4 y Amb a 2 se publicaron (Rafnar *et al.*, J. Biol. Chem. 266: 1229-1236, 1991) y patentaron (patente estadounidense 5.776.761). El clon R2 se aisló en el laboratorio mediante examen inmunológico de un ADNc de polen de ambrosía con anticuerpos de conejo anti-Amb a 1 purificados por afinidad y es idéntico a Amb a 1.3 al nivel proteico. Letras subrayadas, el péptido señal predicho usando el algoritmo SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). En cursiva, la secuencia de cadena beta supuesta basada en secuenciación N-terminal y medición de masa de Amb a 1 natural. En cursiva y subrayada, la secuencia de cadena alfa supuesta basada en secuenciación N-terminal y medición de masa de Amb a 1 natural (figuras 10-13; tabla 4). El análisis de la secuencia N-terminal mostró que las secuencias en negrita se eliminaron proteolíticamente en la preparación de Amb a 1 natural purificado.

20 La figura 15 muestra una alineación de secuencia de isoformas de Amb a 1. Amb a 1.1, Amb a 1.2, Amb a 1.3 y Amb a 2 se clonaron, se secuenciaron y se publicaron previamente (Rafnar *et al.*, J. Biol. Chem. 266: 1229-1236, 1991). Se generó la alineación de secuencia usando el software Clustalw (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html). Para la alineación se usaron las secuencias de aminoácidos deducidas completas (incluyendo el péptido señal) proporcionadas en la figura 14.

30 La figura 16 muestra la secuencia de aminoácido deducida de Amb a 1.3 (clon R2) y las cadenas. (a) Cadenas alfa y beta supuestas basadas en la información de la secuenciación N-terminal y la espectrometría de masas de Amb a 1 natural purificado (véanse las figuras 10-13; tabla 4). (b) El primer constructo preparado en el laboratorio para producir las cadenas alfa y beta recombinantes de Amb a 1.3. La expresión de las cadenas fue mejor que Amb a 1.3 de longitud completa pero se obtuvieron bajos rendimientos. Además, la cadena alfa excluía un dominio reactivo con células T importante (en recuadro, aa 178-189). (c) Cadenas alfa y beta modificadas (versión 1) de Amb a 1.3 diseñadas para incluir en la cadena alfa el epítipo de células T correspondiente a los aminoácidos 178-189. (d) Cadenas alfa y beta modificadas (versión 2) de Amb a 1.3 diseñadas para incluir en la cadena alfa el epítipo de células T correspondiente a los aminoácidos 178-189 y para excluir en la cadena beta los primeros 20 aminoácidos en el extremo N-terminal, que se mostró que se eliminaban proteolíticamente en Amb a 1 natural.

40 La figura 17 muestra la expresión de las cadenas alfa y beta modificadas de Amb a 1.3 (versión 1) en las cepas de *E. coli* BL21 y Rosetta-gami B (DE3)pLysS.

45 La figura 18 muestra SDS-PAGE y tinción de Coomassie de las cadenas alfa y beta de Amb a 1.3 modificadas (versión 1) tras la purificación por afinidad en una columna de níquel. Se obtuvieron altos rendimientos de cadenas alfa y beta modificadas usando la cepa de *E. coli* Rosetta-gami B (DE3)pLysS (Novagen). Las cadenas purificadas eran solubles y no mostraron tendencia a agregarse, lo que era un grave problema con el alérgeno Amb a 1.3 de longitud completa.

50 La figura 19 muestra el ELISA de IgE humana Amb a 1 natural purificado y la cadena alfa modificada (versión 1) de Amb a 1.3

55 La figura 20 muestra la proliferación de una TCL específica de Amb a 1 con cadenas alfa y beta modificadas (versión 1) de Amb a 1.3. Se usaron como estimulantes Amb a 1 natural, diferentes concentraciones de rAmb a 1.3 de longitud completa, rAlpha y cadenas beta. Se inició TCL con rAmb a 1.3 (Amb).

La figura 21 muestra respuestas proliferativas de 2 TCL específicas de Amb a 1 usando rAmb a 1.3 de longitud completa, y cadenas alfa y beta modificadas (versión 1) de Amb a 1.3. Se iniciaron TCL o bien con rAmb a 1.3 (Amb) o bien con extracto de polen de ambrosía (RW).

60 La figura 22 muestra 26 regiones de activación de células T relevantes identificadas en Amb a 1.3. 17/26 epítopos están ubicados en la región C-terminal de Amb a 1. Por tanto las cadenas alfa y beta se diseñaron para incluir estos epítopos de células T relevantes.

Ejemplos:

65 Ejemplo 1: Aislamiento de un ADNc que codifica para Amb a 1

Ejemplo 1.1: Purificación por afinidad de anticuerpos de conejo anti-Amb a 1

5 Pueden obtenerse sueros de conejos inmunizados con Amb a 1 natural mediante métodos generales conocidos en la técnica. Para examinar la biblioteca de ADNc de polen de ambrosía, se purificaron anticuerpos específicos de Amb a 1 mediante cromatografía de afinidad. Se acoplaron 5 mg de Amb a 1 natural purificado de polen de ambrosía a CNBr-Sepharose activada (GE Healthcare Life Sciences). Tras la unión de los sueros de conejo, se lavó la resina y se eluyeron anticuerpos específicos de Amb a 1 altamente específicos con glicina 0,2 M, pH 2,8. Los anticuerpos se neutralizaron inmediatamente y se dializaron frente a 1 x PBS pH 7,4 (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 10 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄, ajustar con HCl a pH 7,4). Entonces se usaron los anticuerpos purificados para experimentos de examen de bibliotecas e inmunotransferencia.

Ejemplo 1.2: Construcción y examen inmunológico de una biblioteca de ADNc de polen de ambrosía

15 Se construyó una biblioteca de ADNc de polen de ambrosía en el vector lambda ZAP II (Stratagene). Se usaron anticuerpos de conejo anti-Amb a 1 purificados para examinar 400.000 placas de la biblioteca de ADNc de polen de ambrosía. Se aislaron cuatro clones de Amb a 1 positivos y se usaron para la escisión *in vivo* del fagémido pBluescript del vector Uni-ZAP XR. Los clones designados R1, R2, R3 y R4 se seleccionaron para el análisis de la secuencia de ADN, que se llevó a cabo mediante la técnica de "paseo con cebador" usando 4 y 5 cebadores 20 incluyendo los cebadores flanqueantes T7 y T3. R1 y R4 estaban truncados en sus extremos 3' y 5', respectivamente, y por tanto no se usaron adicionalmente en los presentes experimentos. Ambas hebras de R2 y R3 se secuenciaron dos veces. Se usaron las secuencias para búsquedas de similitud en la base de datos.

Ejemplo 1.3: Clonación en el vector de expresión pHis-parallel-2

25 Se ligó el ADNc de R2 (Amb a 1.3) en el vector pHis-parallel-2. Para el procedimiento de clonación, se construyeron dos cebadores de clonación flanqueantes. La secuencia de ADNc completa estaba truncada en el extremo 5' en 75 nucleótidos que codifican para el péptido señal supuesto. Se usaron los siguientes cebadores: Rag-Nco-forward: 5'-GAGAGAGACCATGGCCGAAGGGGTCGG-AGAAATCTTACCTTCAG-3' (SEQ ID No. 140) y Rag-Xho-reverse: 5'-GAGAGAGACTCGAGTTAGCAAGGTGCTCCAGGACGGCATGAG-3' (SEQ ID No. 141). Se introdujeron los sitios de restricción Nco I y Xho I en los extremos 5' y 3'. Se digirieron los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las enzimas de restricción Nco I y Xho I (New England Biolabs) y se ligaron en los sitios 30 respectivos del vector pHis-parallel-2. Se secuenció el constructo pHis-parallel-2/R2 resultante según el protocolo de secuenciación de ciclo de terminación con colorante (Applied Biosystems).

Ejemplo 1.4: Expresión de R2 recombinante (Amb a 1.3) en Escherichia coli

35 Se realizó la expresión de proteína recombinante usando la cepa de *Escherichia coli* competente BL21 DE3 (Stratagene) que albergaba el constructo pHis-Parallel-2/R2 (para Amb a 1.3). Se seleccionaron los transformantes en placas de LB que contenían ampicilina 100 mg/l y se recogieron colonias transformantes individuales. Se llevaron a cabo varios experimentos de expresión a pequeña escala y se optimizaron antes de intentar una producción de proteína a gran escala. Se inoculó el medio de cultivo (peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, glicerol 10 g/l, NaCl 5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/l y Na₂HPO₄·2H₂O 1,8 g/l, pH ajustado a 7,4) con el 3% de un cultivo durante la noche, hecho crecer en medio de cultivo con penicilina G 150 µg/ml (Biochemie). Se llevó a cabo la 45 fermentación en un fermentador Bioflow 3000 de 10 l (New Brunswick Scientific Co.) a 37°C con saturación de oxígeno del 7%, agitación a 200 - 400 rpm e inducción con IPTG 0,4 mM a una DO₆₀₀ de 1,0. Se recogieron células bacterianas (60-80 g de peso de células húmedas del cultivo de 10 l) mediante centrifugación 3 horas tras la inducción y se resuspendieron en 100 ml de base Tris 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0,1% (pH no ajustado, 5 ml/g de células). Tras la adición de lisozima recién disuelta (100 µg/g de células) e incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, se lisaron las células mediante 3 ciclos de congelación-descongelación. Se realizó la separación de la fracción soluble mediante centrifugación y se lavaron los cuerpos de inclusión sin procesar de dos a tres veces con Triton X-100 al 1%, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, seguido por 2 lavados con etanol al 50%, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Se disolvieron los cuerpos de inclusión purificados en 500 ml de urea 8 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0.

Ejemplo 1.5: Purificación de alérgeno R2 (Amb a 1.3) recombinante

55 Se cargó la disolución sobre una columna Cellufine de quelación de 150 ml (Millipore) preequilibrada con el tampón descrito en la última etapa, tras cargarla con NiCl₂ según las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo todas las etapas de la cromatografía en un sistema Biopilot FPLC (GE Healthcare Life Sciences). La proteína unida eluyó con un gradiente de imidazol lineal que oscilaba entre 0-300 mM. Se analizó la pureza de las fracciones mediante SDS-PAGE convencional. Las fracciones que contenían Amb a 1.3 casi puro se estabilizaron con EDTA 2 mM y se prepararon para la siguiente etapa de filtración en gel mediante concentración hasta un volumen de 50 ml en una célula de ultrafiltración Vivaflow 50 (Vivascience). Se realizó la filtración en gel en urea 8 M, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM en una columna Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare Life Sciences) (dimensiones 50 x 65 1000 mm). Se concentraron de nuevo las fracciones de Amb a 1 puras hasta una concentración de proteína de

aproximadamente 3 mg/ml mediante ultrafiltración. Antes de la liofilización, se realizó un procedimiento de replegamiento, en el que se redujeron los enlaces disulfuros mediante la adición de mercaptoetanol 10 mM y se reoxidaron durante la diálisis posterior frente al volumen de 1.000-2.000 veces de NH_4HCO_3 5 mM a 4°C.

5 *Ejemplo 1.6: Análisis de SDS-PAGE e inmunotransferencia del Amb a 1.3 recombinante purificado*

Se analizaron las proteínas por medio de SDS-PAGE usando geles de acrilamida al 15% y tinción de Coomassie al 0,1% con un patrón de peso molecular RPN 756 (GE Healthcare Life Sciences). Se sometieron a prueba los sueros de pacientes alérgicos para detectar una reactividad de IgE positiva. Se separaron rAmb a 1 y rArt v 6 en geles de poliacrilamida al 15% (p/p) y se sometieron a electrotransferencia sobre una membrana de PVDF. Tras bloquear los sitios de unión de proteína no específica con tampón de bloqueo (por l: 7,5 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NaH_2PO_4 , 5 g de BSA y 5 ml de Tween 20), se incubó la membrana con sueros de los pacientes (diluidos 1:10 en tampón de bloqueo) durante más de 6 horas a temperatura ambiente. Se lavó la membrana durante al menos 30 minutos con tampón de bloqueo antes de incubarla con anticuerpo anti-IgE humana radiomarcado [^{125}I] (RAST, 5 μCi , MedPro) diluido en tampón de bloqueo (1:40) durante la noche a temperatura ambiente. Tras un segundo lavado de 30 minutos, se colocó la membrana sobre una placa de obtención de imágenes. Se expuso la pantalla durante al menos 24 horas y se reveló usando un escáner Fosfolmager Bas-1800 II para la detección y el software de ayuda del instrumento (Fujifilm).

20 *Ejemplo 1.7: Clones de ADNc que codifican para isoformas de Amb a 1*

Los clones R2 y R3 aislados de la biblioteca de polen de ambrosía estaban completos y codificaban para isoformas de Amb a 1. La secuencia de aminoácido deducida de R3 difería de la isoforma Amb a 1.1 madura en un aminoácido: la glicina en la posición 50 de Amb a 1.1 madura se intercambia por una alanina en R3. La secuencia de aminoácido deducida de R2 es idéntica a la isoforma Amb a 1.3. Se usó el clon R2 para todos los experimentos descritos en el presente documento y se denominará Amb a 1.3.

Ejemplo 1.8: Producción recombinante y actividad de unión a IgE de Amb a 1.3

30 En cuanto a la actividad de unión a IgE, los primeros intentos para producir rAmb a 1.3 de longitud completa en *E. coli* no fueron alentadores. Lo primero de todo, se producía escisión proteolítica durante la purificación de rAmb a 1.3 producido en *E. coli*. El rendimiento de rAmb a 1.3 era de aproximadamente 15 mg de rAmb a 1.3 a partir de 10 l de cultivo de fermentación. rAmb a 1.3 se encontraba exclusivamente en cuerpos de inclusión y por tanto eran necesarios los protocolos para el replegamiento. Sin embargo, el replegamiento correcto de rAmb a 1.3 de longitud completa resultó ser un obstáculo. Tras usar diferentes procedimientos convencionales para el replegamiento, las mejores preparaciones consistían principalmente en agregados insolubles (véase la figura 1).

Diversos cambios en el protocolo de purificación y la adición de diferentes agentes estabilizantes no dieron como resultado una proteína soluble y correctamente plegada. En ensayos no desnaturizantes (por ejemplo, transferencia puntual, ELISA) rAmb a 1.3 no pudo unirse a IgE humana (figura 2). Sólo tras reducción y tratamiento térmico (procedimiento convencional para SDS-PAGE/inmunotransferencia) rAmb a 1.3 reaccionó con IgE de pacientes. Estos resultados demuestran claramente que rAmb a 1.3 producido tal como se describió anteriormente no es un reactivo adecuado para el diagnóstico y la terapia de la alergia. Por tanto, se buscó otro enfoque para producir reactivos recombinantes con actividad de unión a IgE completa, tal como se describe en la sección 4. A pesar de su baja actividad de unión a IgE, rAmb a 1.3 se usó satisfactoriamente *in vitro* para los ensayos de proliferación y mapeo de epítomos de células T, ya que no es esencial un plegamiento correcto para el reconocimiento de células T (véase el ejemplo 2).

50 *Ejemplo 2: Reconocimiento de células T de Amb a 1*

Ejemplo 2.1: Pacientes

Se caracterizó en detalle la respuesta de células T a Amb a 1 usando el sistema de cultivo *in vitro* establecido (Jahn-Schmid *et al.*, J. Immunol. 169: 6005-11, 2002; Jahn-Schmid *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol., 115: 399-404, 2005). En total, se incluyeron 85 pacientes bien definidos clínicamente (75 de Viena / 10 de Milán) con una historia clínica típica, prueba de punción cutánea positiva y pruebas de CAP/RAST para extracto de ambrosía.

Ejemplo 2.2: PBMC, líneas de células T (TCL) y clones de células T (TCC) específicos de Amb a 1

60 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre heparinizada de pacientes alérgicos mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Para generar líneas de células T (TCL) y clones de células T (TCC) específicos de alérgeno, se estimularon $1,5 \times 10^6$ PBMC con dosis óptimas de extracto de ambrosía o artemisa (4 $\mu\text{g/ml}$) o rAmb a 1.3 (10 $\mu\text{g/ml}$) en placas de cultivo celular de fondo plano de 24 pocillos (Costar, EE.UU.). Tras 5 días, se añadió rIL-2 humana (10 U/ml, Boehringer, Mannheim, Alemania) se continuaron los cultivos durante 7 días adicionales. Entonces, se aislaron los blastos de células T mediante centrifugación en densidad. La mayoría de los blastos de células T se expandieron adicionalmente con IL-2 y PBMC irradiadas. Se

usó un pequeño número de blastos de células T para establecer cultivos de células T monoclonales mediante dilución limitante: se sembraron 0,3 células T/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Nunclone) en presencia de 2 x 10⁵ PBMC irradiadas (60 Gy), PHA al 0,25% v/v (Gibco, EE.UU.) y rIL-2 (4 U/pocillo) en el medio mencionado anteriormente. Tras 14-21 días, se expandieron microcultivos en crecimiento a intervalos semanales con PBMC irradiadas y rIL-2. Se evaluó la especificidad de TCC en ensayos de proliferación usando PBMC de HLA coincidente o alogénicas irradiadas o células B alogénicas transformadas con VEB irradiadas y 5 µg/ml de Amb a 1.3. Tras 48 horas, se realizó la captación celular de (³H)-timidina tritiada para medir la proliferación en cuentas por minuto (cpm). Cuando el índice de estimulación (SI; razón entre las cpm obtenidas en cultivos que contenían TCC más APC autólogas más antígeno, y las cpm obtenidas en cultivos que contenían TCC y APC solos) era >10, se consideró que las respuestas eran positivas. Se expandieron TCC específicos de alérgeno alternando turnos de estimulación con APC irradiadas autólogas y alérgeno o con células alimentadoras alogénicas y rIL-2. Para PBMC y TCL, que mostraron diferentes grados de proliferación de fondo debido a autorreactividad, un SI de >3 o respectivamente 10.000 dpm se consideraron como un punto de corte para la especificidad de antígeno.

Se usaron TCL y TCC específicos de Amb a 1 para identificar epítomos de células T de Amb a 1.3. Se estimularon cultivos de células T con un panel de 121 péptidos de 12 meros sintéticos y un péptido de 13 meros que representa el péptido C-terminal de Amb a 1.3 (Pepset, Biotrend, Alemania). Los péptidos se habían sintetizado según la secuencia de aminoácidos de Amb a 1.3 y se solapaban en 9 residuos de aminoácido con los péptidos vecinos (tabla 1). Se usaron los péptidos a una concentración de 5 µg/ml para la estimulación y se determinó la proliferación de cultivos de células T tras 48 h mediante la captación de ³H-timidina. Debido al alto fondo frecuentemente observado provocado por la autorreactividad en TCL, se usó la media de las cpm observadas con los diez péptidos menos estimulantes (ninguno de los péptidos era tóxico) como control negativo en los cálculos de SI. A lo largo de todo este documento, un péptido comprendía un epítomo de células T cuando el índice de estimulación era de al menos 3,0. También se indican en las tablas 2 y 3 péptidos estimulantes más fuertes con SI ≥ 5,0.

Tabla 1. Péptidos sintéticos usados para el mapeo de epítomos de células T de Amb a 1.3. Se usó la secuencia de aminoácidos deducida de Amb a 1.3 maduro (sin péptido señal) como molde para diseñar 120 péptidos de 12 meros más 1 péptido de 13 meros (correspondiente al extremo C-terminal de Amb a 1.3).

Pos. de aa	Pept. n.º (= SEQ ID No.)	Secuencia	Pos. de aa	Pept. n.º (= SEQ ID No.)	Secuencia
25-36	1	SAEGVGEILPSV	205-216	61	QIWIDHCSLSKS
28-39	2	GVGEILPSVNET	208-219	62	IDHCSLSKSFDDG
31-42	3	EILPSVNETRSL	211-222	63	CSLSKSFDDGLVD
34-45	4	PSVNETRSLQAC	214-225	64	SKSFDDGLVDVTL
37-48	5	NETRSLQACEAY	217-228	65	FDGLVDVTLGST
40-51	6	RSLQACEAYNII	220-231	66	LVDVTLGSTHVT
43-54	7	QACEAYNIIDKC	223-234	67	VTLGSTHVTISN
46-57	8	EAYNIIDKCWRG	226-237	68	GSTHVTISNCKF
49-60	9	NIIDKCWRGKAD	229-240	69	HVTISNCKFTQQ
52-63	10	DKCWRGKADWEN	232-243	70	ISNCKFTQQSKA
55-66	11	WRGKADWENNRQ	235-246	71	CKFTQQSKAILL
58-69	12	KADWENNRQALA	238-249	72	TQQSKAILLGAD
61-72	13	WENNRQALADCA	241-252	73	SKAILLGADDTH
64-75	14	NRQALADCAQGF	244-255	74	ILLGADDTHVQD
67-78	15	ALADCAQGFAGK	247-258	75	GADDTHVQDKGM
70-81	16	DCAQGFAGKTYG	250-261	76	DTHVQDKGMLAT
73-84	17	QGFAGKTYGGKW	253-264	77	VQDKGMLATVAF
76-87	18	AKGTYGGKLGWGDV	256-267	78	KGMLATVAFNMF
79-90	19	TYGGKLGWGDVYTV	259-270	79	LATVAFNMFMTDN
82-93	20	GKWGDVYTVTSN	262-273	80	VAFNMFMTDNVDQ
85-96	21	GDVYTVTSNLDD	265-276	81	NMFMTDNVDQRMP
88-99	22	YTVTSNLDDDDVA	268-279	82	TDNVDQRMPRCR
91-102	23	TSNLDDDDVANPK	271-282	83	VDQRMPRCRFGF
94-105	24	LDDDDVANPKEGT	274-285	84	RMPRCRFGFFQV
97-108	25	DVANPKEGTLRF	277-288	85	RCRFGFFQVVNN
100-111	26	NPKEGTLRFAAA	280-291	86	FGFFQVVNNNYD
103-114	27	EGTLRFAAAQNR	283-294	87	FQVVNNNYDRWG
106-117	28	LRFAAAQNRPLW	286-297	88	VNNNYDRWGTYA
109-120	29	AAQNRPLWIIF	289-300	89	NYDRWGTYAIGG
112-123	30	QNRPLWIIFKND	292-303	90	RWGTYAIGGSSA
115-126	31	PLWIIFKNDMVI	295-306	91	TYAIGGSSAPTI
118-129	32	IIFKNDMVINLN	298-309	92	IGGSSAPTILCQ
121-132	33	KNDMVINLNQEL	301-312	93	SSAPTILCQGNR

124-135	34	MVINLNQELVVN	304-315	94	PTILCQGNRFLA
127-138	35	NLNQELVVNSDK	307-318	95	LCQGNRFLAPDD
130-141	36	QELVVNSDKTID	310-321	96	GNRFLAPDDQIK
133-144	37	VVNSDKTIDGRG	313-324	97	FLAPDDQIKKNV
136-147	38	SDKTIDGRGVKV	316-327	98	PDDQIKKNVLAR
139-150	39	TIDGRGVKVEII	319-330	99	QIKKNVLARTGT
142-153	40	GRGVKVEIINGG	322-333	100	KNVLARTGTGAA
145-156	41	VKVEIINGGLTL	325-336	101	LARTGTGAAESM
148-159	42	EIINGGLTLMNV	328-339	102	TGTGAAESMAWN
151-162	43	NGGLTLMNVKNI	331-342	103	GAAESMAWNWRS
154-165	44	LTLMNVKNIH	334-345	104	ESMAWNWRSKDK
157-168	45	MNVKNIHNIH	337-348	105	AWNWRSDKDLLE
160-171	46	KNIIHNIHNIHD	340-3-51	106	WRSDKDLLENGA
163-174	47	IHNINIHDVKV	343-354	107	DKDLLENGAIFV
166-177	48	NINIHDVKVLPG	346-357	108	LLENGAIFVTSG
169-180	49	IHDVKVLPGGMI	349-360	109	NGAIFVTSGSDP
172-183	50	VKVLPGGMIKSN	352-363	110	IFVTSGSDPVL
175-186	51	LPGGMIKSNNGP	355-366	111	TSGSDPVLTPVQ
178-189	52	GMIKSNNGPIL	358-369	112	SDPVLTPVQSAG
181-192	53	KSNDGPILRQA	361-372	113	VLTPVQSAGMIP
184-195	54	DGPPILRQASDG	364-375	114	PVQSAGMIPAEP
187-198	55	PILRQASDGDTI	367-378	115	SAGMIPAEPGEA
190-201	56	RQASDGDTINVA	370-381	116	MIPAEPGEAAIK
193-204	57	SDGDTINVAGSS	373-384	117	AEPGEAAIKLTS
196-207	58	DTINVAGSSQIW	376-387	118	GEAAIKLTSSAG
199-210	59	NVAGSSQIWIHD	379-390	119	AIKLTSSAGVLS
202-213	60	GSSQIWIHDHCSL	382-393	120	LTSSAGVLSERP
			385-397	121	SAGVLSERPAGPC

Ejemplo 2.3: Medición de citocinas

5 Se lavaron células T y se incubaron APC autólogas irradiadas en presencia del estimulante (5 µg/ml) durante 48 horas. Se midieron los niveles de citocina en los sobrenadantes resultantes en ELISA usando pares de anticuerpos emparejados (Endogen, EE.UU.) (límites de sensibilidad: IL-4: 9 pg/ml, IFN-γ: 9 pg/ml). Cultivos que contenían TCC y APC solas sirvieron como controles negativos. Se clasificaron TCC con una razón de IFN-γ/IL-4 > 10 como Th1, 0,1-10 como Th0 y < 0,1 como Th2.

10 Ejemplo 2.4: Citometría de flujo

Se analizó el fenotipo de TCC mediante citometría de flujo, usando un instrumento FACScan y los anticuerpos monoclonales marcados con FITC anti-Leu 4/CD3, anti-Leu 3a/CD4, anti-Leu 2a/CD8, anti-TCR αβ WT 31, anti-TCR γδ y CRTh2 más anticuerpo de cabra anti-rata-PE (todos los anticuerpos se obtuvieron de BD Bioscience, EE.UU.).

15 Ejemplo 2.5: Comparación de rAmb a 1.3 con Amb a 1 natural

20 Para confirmar que la isoforma Amb a 1.3 recombinante estimulaba células T de manera comparable a Amb a 1 natural (mezcla de isoformas), se estimularon PBMC y TCL y TCC específicos de Amb a 1 con diferentes concentraciones de Amb a 1.3 natural o rAmb a 1.3. Se determinaron las respuestas de citocina y proliferación. La capacidad estimuladora de ambos alérgenos era relativamente estable a lo largo de un intervalo de concentraciones y en general Amb a 1.3 natural y rAmb a 1.3 indujeron proliferaciones de células T (figuras 3 y 4) y producción de citocina (figuras 5 y 6) comparables. Al nivel clonal 1/6 TCC específicos de Amb a 1 sometidos a prueba que reconocían diferentes epítomos de rAmb a 1.3 no respondieron a Amb a 1 natural (epítomo: aa 265-276). TCL inducidas con extracto de ambrosía o Amb a 1.3 recombinante mostraron patrones de epítomos de células T similares (figura 7).

Ejemplo 2.6: Epítomos de células T de Amb a 1.3

30 Se realizó el mapeo de epítomos de células T de Amb a 1.3 evaluando 48 TCL de diferentes pacientes (37 de Viena y 9 de Italia), que se habían iniciado con extracto de ambrosía (que contiene el alérgeno natural) o rAmb a 1.3 (tabla 2). TCL inducidas o bien con extracto de ambrosía o bien con rAmb a 1.3 del mismo individuo reconocieron epítomos de células T similares (tabla 2; figura 7). Los pacientes austriacos e italianos mostraron un perfil de reconocimiento de epítomos similar. Por tanto, se combinaron sus datos para análisis adicionales (tabla 3). De manera típica para muchos alérgenos inhalantes, se detectaron múltiples regiones de activación de células T en Amb a 1.3. El número de péptidos reconocidos por células T de un único individuo osciló entre 2 y un máximo de 60 péptidos con una

ES 2 561 588 T3

media de 17,8 péptidos (mediana=16 / para SI>3; resp. 0-36/ 11,9 / 12 para SI >5) (véase la tabla 3). En total, se

identificaron 26 regiones de activación de células T relevantes (es decir reconocidas por $\geq 10\%$ de los pacientes

estudiados) que comprendían 12-18 aa. Se dividieron estas regiones que contenían epítomos en clases de prevalencia (en referencia a SI >5):

5

11 regiones eran positivas en el 10-20% de los pacientes:

Péptido 20 (aa 82-93), GKWGDVYTVTSN (SEQ ID No. 20), reconocido por el 14,6%

10 42; (aa 148-159), EIINGGLTLMNV (SEQ ID No. 42), reconocido por el 10,4%

44 (aa 154-165), LTLMNVKNIH (SEQ ID No. 44), reconocido por el 18,8 %

15 78; (aa 256-267), KGMLATVAFNMF (SEQ ID No. 78), reconocido por el 12,5%

80-81 (aa 262-276), VAFNMFTDNVDQRMP (SEQ ID No. 122), reconocido por el 12,5%

83; (aa 271-282), VDQRMPRCRFGF (SEQ ID No. 83), reconocido por el 16,7%

20 88-89; (aa 286-300), VNNNYDRWGTYAIGG (SEQ ID No. 123), reconocido por el 12,5%

94 (aa 304-315), PTILCQGNRFLA (SEQ ID No. 94), reconocido por el 18,8%

25 98-99; (aa 316-330), PDDQIKKNVLARTGT (SEQ ID No. 124), reconocido por el 16,7%

100; (aa 322-333). KNVLARTGTGAA (SEQ ID No. 100), reconocido por el 10,4%

101/102 (aa 325-339), LARTGTGAAESMAWN (SEQ ID No. 125), reconocido por el 14,6%

30 9 regiones eran positivas en el 21-30% de los pacientes:

Péptido 27-28 (aa 103-117), EGTLRFAAAQNRPLW (SEQ ID No. 126), reconocido por el 22,9%

35 30-31 (aa 112-126), QNRPLWIIFKNDMVI (SEQ ID No. 127), reconocido por el 20,8%

33-34 (aa 121-135), KNDMVINLNQELVVN (SEQ ID No. 128), reconocido por el 27,1%

36-37 (aa 130-144), QELVNSDKTIDGRG (SEQ ID No. 129), reconocido por el 25,0%

40 46-48 (aa 160-177), KNIIHNINIHDVKVLP (SEQ ID No. 130), reconocido por el 20,8%

86 (aa 280-291), FGFFQVVNNNYD (SEQ ID No. 86), reconocido por el 20,6%

45 91 (aa 295-306), TYAIGGSSAPTI (SEQ ID No. 91), reconocido por el 22,9%

109-111; (aa 349-366), NGAIFVTSGSDPVLTPVQ (SEQ ID No. 131), reconocido por el 22,9%

118-120 (aa 376-393); GEAAIKLTSSAGVLSRCP (SEQ ID No. 132), reconocido por el 20,8%

50 3 regiones eran positivas en el 31-49% de los pacientes:

Péptido 38-40 (aa 136-153), SDKTIDGRGVKVEIINGG (SEQ ID No. 133), reconocido por el 33,3%

55 68 (aa 226-237), GSTHVTISNCKF (SEQ ID No. 68), reconocido por el 33,3%

114-115 (aa 364-378), PVQSAGMIPAEPGEA (SEQ ID No. 134), reconocido por el 35,4%

3 regiones eran positivas en > 50% de los pacientes:

60 Péptido 52 (aa 178-189), GMIKSNDGPIL (SEQ ID No. 52), reconocido por el 56,3%

59-61 (aa 199-216), NVAGSSQIWIDHCSSLK (SEQ ID No. 135), reconocido por el 58,3%

107-108 (aa 343-357), DKDLLENGAIFVTSG (SEQ ID No. 136), reconocido por el 56,3%

5 Las tres regiones de activación de células T que inducían respuestas proliferativas en más del 50% de los pacientes alérgicos se definieron como epítomos inmunodominantes (figura 8; tabla 3).

10 En general, la capacidad de activación de células T de un determinado péptido no se correlacionaba con la frecuencia de reconocimiento. Por tanto, también se calculó un "índice de positividad" (PI; % de pacientes positivos x SI medio) para revelar otros epítomos importante. El PI osciló entre 98-2300 e identificó las tres regiones inmunodominantes mencionadas anteriormente y 4 regiones adicionales como regiones fuertemente inmunogénicas (PI>700; el 27% de los valores más altos) en Amb a 1.3:

46-48: aa 160-177: KNIIHNINIHDKVLPV (SEQ ID No. 130)

15 109-111: aa 349-366: NGAIFVTSGSDPVLTPVQ (SEQ ID No. 131)

114-115: aa 364-378: PVQSAGMIPAEPGEA (SEQ ID No. 134)

20 118-120: aa 376-393: GEAAIKLTSSAGVLSCR (SEQ ID No. 132)

25 Además de TCL, se establecieron más de 100 TCC específicos para Amb a 1 a partir de 10 pacientes alérgicos al polen de ambrosía diferentes. Con la excepción de un TCC CD8+, se mostró que estos TCC eran células T CD4⁺TCR αβ⁺. La investigación de la producción de citocinas en 108 TCC específicos para Amb a 1 (n=10 pacientes) reveló un perfil de citocinas de tipo Th2 en la mayoría (50%) de estos TCC (Th1: 11%; Th0 39%). Además, el 74% de 68 TCC investigados (pacientes n=8) expresó CRTh2, un marcador de superficie para células T Th2, lo que también indica que las células T específicas para Amb a 1 en el cultivo representan células T alérgicas relevantes. El mapeo de epítomos de células T de Amb a 1.3 usando TCC específicos para Amb a 1 reflejó los datos obtenidos a partir de TCL. Los resultados muestran que la presentación de péptidos de Amb a 1 es diversa, implicando HLA-DR, -DP o -DQ como elementos de restricción.

30 En el documento US 6.335.020 (Allergenic peptides from ragweed pollen) se han notificado 4 regiones principales de reactividad con células T: aa 57-101, 182-215, 280-322 y 342-377 (figura 6). Esta distribución de epítomos difiere en algún grado de los epítomos de la presente invención, por ejemplo en contraposición a la región aa 57-101, se encontró que los epítomos dentro de aa 109-180 se reconocen mucho más frecuentemente. Otros han descrito epítomos de células T de alérgenos de polen de árboles relacionados Cha o 1 (ciprés japonés), Cry j 1 (cedro japonés) (Sone *et al.*, Clin Exp Allergy, 35: 664-71, 2005). Los epítomos principales de estos alérgenos se ubican en regiones que son homólogas con respecto a epítomos de células T minoritarios en Amb a 1.

40 Tabla 2. Epítomos de células T de TCL específicas para Amb a 1 de 48 pacientes alérgicos al polen de ambrosía diferentes. Se iniciaron TCL o bien con rAmb a 1.3 o bien con extracto de polen de ambrosía. Para cada paciente se enumeran los péptidos que proporcionan índices de estimulación (SI) mayores de 3 y 5.

Paciente n.º	Péptido n.º (SI > 3)	Péptido n.º (SI > 5)
1	112, 114	8, 31, 33, 36, 44, 52, 59, 60, 61, 68, 78, 102, 108, 109, 110, 111, 115, 116, 117, 118, 119, 120
2	29, 30, 42, 64, 67, 79, 88, 89, 93, 98, 101, 103	27, 28, 33, 52, 60, 61, 68, 94, 107, 108, 111, 114, 115, 116, 118, 119, 120
3	120	107
4	41, 42, 60, 90, 98	52, 83, 91, 107, 108
5	39, 78, 85, 99, 101, 102, 107, 108	28, 36, 37, 44, 52, 60, 61, 86, 100, 104, 105, 106, 109, 110, 111, 119, 120
6	34	83, 91, 107, 108, 115
7	11, 58, 68, 78, 82, 84, 86, 88, 89, 99, 108	33, 39, 47, 48, 51, 52, 59, 60, 61, 107
8	34, 44, 45, 72, 79, 80	33, 39, 40, 50, 71, 83, 107
9	50, 76, 83, 87, 101, 112, 113, 119, 121	39, 69, 91, 93, 107, 117
10	47, 96, 97, 110, 119	44, 46, 60, 61, 69, 89, 101, 107, 108, 115
11	110	33, 38, 39, 46, 52, 60, 69, 83, 90, 91, 107, 108, 115
12	59	36, 37, 52, 60, 61, 68, 86, 96, 97, 98
13	14, 37, 44, 61, 71, 77, 108, 111, 121	20, 28, 36, 47, 101, 109, 110, 118
14	30, 31, 111, 120	119
15	8, 20, 46, 47, 71, 77, 107, 108	
16	87	21, 46, 47, 54, 55, 63, 86

ES 2 561 588 T3

17	14, 23, 29, 34, 53, 58, 69, 76, 80, 82, 85, 99, 102, 107, 115	20, 22, 28, 31, 33, 36, 37, 44, 52, 60, 61, 68, 77, 81, 84, 88, 98, 108, 109, 110, 111, 118, 119, 120
18	33, 104	38, 39, 52, 60, 61, 68, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 112
19		20, 28, 36, 37, 44, 47, 48, 52, 59, 60, 67, 77, 78
20	60, 61	
21	29, 34, 47, 61	30, 33, 38, 39, 42, 43, 46, 49, 52, 60, 91, 94, 107, 108, 114, 115
22	20, 39, 44, 52, 53, 64, 69, 85, 94	28, 37, 38, 40, 60, 61, 68, 86
23	23, 51, 53, 54, 55, 59, 116, 117, 120	9, 30, 31, 32, 33, 34, 38, 39, 46, 47, 48, 52, 60, 61, 68, 81, 88, 89, 98, 99, 107, 108, 111, 115, 118, 119
24	28, 114	11, 34, 37, 38, 52, 68, 83, 89, 91, 100, 101, 102, 107, 108, 109, 110, 115
25	44, 111, 119, 120	60, 61, 77, 92, 93, 94, 107, 108, 109, 110
26	28, 29, 30, 36, 44, 68, 83, 84, 118, 121	12, 15, 22, 23, 31, 33, 52, 60, 61, 73, 74, 78, 82, 86, 107, 108, 111, 113, 115, 119, 120
27	43, 107	10, 22, 28, 30, 33, 36, 37, 48, 52, 60, 61, 86, 87
28	33, 39, 61, 73, 93, 94, 99, 118	36, 52, 60, 77, 88, 102, 107, 108, 109, 110, 111, 119, 120
29	28, 81, 83, 86, 87, 91, 100	31, 39, 52, 59, 60, 61, 67, 68, 69, 80, 107, 108, 111, 115, 118, 119, 120
30	4, 78	20, 27, 28, 29, 30, 36, 37, 44, 52, 60, 61, 68, 80, 93, 94, 108, 117
31	11, 32, 77	29, 30, 38, 39, 40, 42, 46, 47, 48, 61, 79, 89, 94, 108, 115
32	1, 77	4, 20, 22, 28, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 44, 50, 52, 60, 61, 62, 66, 68, 78, 83, 86, 90, 91, 96, 97, 98, 105, 107, 108, 115
33	12, 61	52, 60, 68, 108
34	28, 30, 42, 91	24, 27, 29, 94, 108, 114
35	37, 38, 69, 72	20, 28, 33, 36, 39, 42, 44, 48, 52, 58, 60, 61, 68, 94, 114
36	7, 9, 12, 15, 16, 28, 33, 37, 39, 43, 47	30, 52, 60, 61, 68, 96, 97, 98, 107
37	5, 12, 29, 55, 59	
38	19, 37, 39, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 98, 107, 109, 113	20, 22, 28, 31, 36, 44, 52, 78, 82, 86, 89, 90, 101, 102, 110, 111, 118, 119, 120
39	4, 52	33, 42, 47, 48, 59, 60, 78, 98, 99, 107
40	24, 25, 33, 52, 73, 78, 98, 109, 111, 119	31, 66, 68, 71, 80, 81, 83, 102, 107, 108, 110, 112, 115, 120
41	2, 17, 20, 28, 30, 36, 37, 38, 44, 61, 92	27, 31, 39, 52, 83, 91, 94
42	67, 80	91, 93, 101
43	28, 62, 68, 76, 88, 89	38, 39, 51, 52, 59, 60, 61, 80, 81, 86, 92, 100, 101, 102, 109, 110
44	35, 80, 88, 90, 119	30, 31, 38, 39, 46, 47, 48, 51, 52, 59, 60, 94, 100, 107, 108, 111, 112, 115, 121
45	5, 39, 41, 42, 48, 51, 52, 53, 54, 65, 67, 68, 74, 78, 79, 84, 89, 106, 109, 112	47, 60, 61, 63, 64, 66, 72, 73, 75, 76, 80, 85, 86, 87, 88, 101, 107, 108, 115, 116
46	88	27, 91, 107
47	3, 4, 5, 6, 13, 14, 16, 23, 28, 41, 49, 61, 74, 89, 98, 102, 108, 112, 113, 114, 116, 119, 120, 121	2, 9, 15, 30, 50, 56, 62, 91, 99, 100, 103, 105, 107, 110, 111, 115, 117
48	1, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 25, 32, 36, 42, 53, 65, 67, 69, 88, 97, 105, 106, 111	10, 11, 18, 30, 31, 33, 38, 39, 40, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 54, 59, 60, 61, 66, 68, 70, 72, 79, 80, 81, 89, 98, 99, 107, 108, 109, 114, 115, 116, 118, 121

Tabla 3. Epítomos de células T de líneas de células T (TCL) específicas para Amb a 1 de 48 pacientes alérgicos al polen de ambrosía diferentes (véase la tabla 2). Se usaron 121 péptidos sintéticos solapantes (12 meros) para el mapeo de epítomos. Se evaluó por separado la relevancia de cada epítomo para índices de estimulación mayores de 3 (SI>3) y mayores de 5 (SI>5).

ES 2 561 588 T3

Péptido (=SEQ ID No.)	Posición de AA	Secuencia de AA	N.º de pacientes positivos	%	N.º de pacientes positivos	%
			SI>3		SI>5	
1	25-36	SAEGVGEILPSV	2	4,2	0	0,0
2	28-39	GVGEILPSVNET	2	4,2	1	2,1
3	31-42	EILPSVNETRSL	1	2,1	0	0,0
4	34-45	PSVNETRSLQAC	4	8,3	1	2,1
5	37-48	NETRSLQACEAY	4	8,3	0	0,0
6	40-51	RSLQACEAYNII	1	2,1	0	0,0
7	43-54	QACEAYNIIDKC	1	2,1	0	0,0
8	46-57	EAYNIIDKCWRG	3	6,3	1	2,1
9	49-60	NIIDKCWRGKAD	3	6,3	2	4,2
10	52-63	DKCWRGKADWEN	2	4,2	2	4,2
11	55-66	WRGKADWENNRQ	4	8,3	2	4,2
12	58-69	KADWENNRQALA	5	10,4	1	2,1
13	61-72	WENNRQALADCA	2	4,2	0	0,0
14	64-75	NRQALADCAQGF	4	8,3	0	0,0
15	67-78	ALADCAQGFAGK	4	8,3	2	4,2
16	70-81	DCAQGFAGKTYG	2	4,2	0	0,0
17	73-84	QGFAKGTGGKW	2	4,2	1	2,1
18	76-87	AKGTGGKWDV	1	2,1	0	0,0
19	79-90	TYGGKWDVYTV	2	4,2	0	0,0
20	82-93	GKWDVYTVTSN	9	18,8	7	14,6
21	85-96	GDVYTVTSNLDD	2	4,2	1	2,1
22	88-99	YTVTSNLDDDDVA	4	8,3	4	8,3
23	91-102	TSNLDDDDVANPK	2	4,2	1	2,1
24	94-105	LDDDDVANPKEGT	2	4,2	1	2,1
25	97-108	DVANPKEGTLRF	2	4,2	0	0,0
26	100-111	NPKEGTLRFAAAA	0	0,0	0	0,0
27	103-114	EGTLRFAAAQNR	5	10,4	5	10,4
28	106-117	LRFAAAQNRPLW	15	31,3	11	22,9
29	109-120	AAAQNRPLWIIF	4	8,3	3	6,3
30	112-123	QNRPLWIIFKND	11	22,9	9	18,8
31	115-126	PLWIIFKNDMVI	11	22,9	10	20,8
32	118-129	IIFKNDMVINLN	2	4,2	1	2,1
33	121-132	KNDMVINLNQEL	15	31,3	13	27,1
34	124-135	MVINLNQELVVN	2	4,2	2	4,2
35	127-138	NLNQELVVNSDK	1	2,1	1	2,1
36	130-141	QELVVNSDKTID	14	29,2	12	25,0
37	133-144	VVNSDKTIDGRG	14	29,2	9	18,8
38	136-147	SDKTIDGRGVKV	13	27,1	11	22,9
39	139-150	TIDGRGVKVEII	19	39,6	16	33,3
40	142-153	GRGVKVEIINGG	3	6,3	4	8,3
41	145-156	VKVEIINGGLTL	5	10,4	1	2,1
42	148-159	EIINGGLTLMNV	11	22,9	5	10,4
43	151-162	NGGLTLMNVKNI	4	8,3	1	2,1
44	154-165	LTLMNVKNIH	15	31,3	9	18,8
45	157-168	MNVKNIHNIH	2	4,2	0	0,0
46	160-171	KNIHNIHNIHD	10	20,8	8	16,7
47	163-174	IHNINIHDVKV	14	29,2	10	20,8
48	166-177	NINIHDVKVLPG	10	20,8	9	18,8
49	169-180	IHDVKVLPGGMI	3	6,3	2	4,2
50	172-183	VKVLPGGMIKSN	5	10,4	4	8,3
51	175-186	LPGGMIKSNLGP	6	12,5	3	6,3
52	178-189	GMIKSNLGPPI	31	64,6	27	56,3
53	181-192	KSNDGPPILRQA	5	10,4	0	0,0
54	184-195	DGPPILRQASDG	4	8,3	2	4,2
55	187-198	PILRQASDGTI	3	6,3	1	2,1
56	190-201	RQASDGTINVA	1	2,1	1	2,1
57	193-204	SDGDTINVAGSS	0	0,0	0	0,0
58	196-207	DTINVAGSSQIW	3	6,3	1	2,1
59	199-210	NVAGSSQIWDH	11	22,9	8	16,7

ES 2 561 588 T3

60	202-213	GSSQIWIDHCSL	30	62,5	28	58,3
61	205-216	QIWIDHCSLSKS	29	60,4	24	50,0
62	208-219	IDHCSLSKSFDG	3	6,3	2	4,2
63	211-222	CSLSKSFDDLVD	2	4,2	2	4,2
64	214-225	SKSFDGLVDVTL	3	6,3	1	2,1
65	217-228	FDGLVDVTLGST	2	4,2	1	2,1
66	220-231	LVDVTLGSTHVT	4	8,3	4	8,3
67	223-234	VTLGSTHVTISN	6	12,5	2	4,2
68	226-237	GSTHVTISNCKF	20	41,7	16	33,3
69	229-240	HVTISNCKFTQQ	8	16,7	4	8,3
70	232-243	ISNCKFTQQSKA	1	2,1	1	2,1
71	235-246	CKFTQQSKAILL	4	8,3	2	4,2
72	238-249	TQQSKAILLGAD	4	8,3	2	4,2
73	241-252	SKAILLGADDTH	4	8,3	2	4,2
74	244-255	ILLGADDTHVQD	3	6,3	1	2,1
75	247-258	GADDTHVQDKGM	1	2,1	1	2,1
76	250-261	DTHVQDKGMLAT	4	8,3	1	2,1
77	253-264	VQDKGMLATVAF	7	14,6	4	8,3
78	256-267	KGMLATVAFNMF	11	22,9	6	12,5
79	259-270	LATVAFNMFTDN	5	10,4	2	4,2
80	262-273	VAFNMFTDNVDQ	10	20,8	6	12,5
81	265-276	NMFTDNVDQRMP	7	14,6	6	12,5
82	268-279	TDNVDQRMPRCR	3	6,3	2	4,2
83	271-282	VDQRMPRCRFGF	10	20,8	8	16,7
84	274-285	RMPCRFRGFFQV	3	6,3	1	2,1
85	277-288	RCRFGFFQVVNN	4	8,3	1	2,1
86	280-291	FGFFQVVNNNYD	12	25,0	10	20,8
87	283-294	FQVVNNNYDRWG	5	10,4	2	4,2
88	286-297	VNNNYDRWGTYA	10	20,8	4	8,3
89	289-300	NYDRWGTYAIGG	11	22,9	6	12,5
90	292-303	RWGTYAIGGSSA	5	10,4	3	6,3
91	295-306	TYAIGGSSAPTI	13	27,1	11	22,9
92	298-309	IGGSSAPTILCQ	3	6,3	2	4,2
93	301-312	SSAPTILCQGNR	6	12,5	4	8,3
94	304-315	PTILCQGNRFLA	11	22,9	9	18,8
95	307-318	LCQGNRFLAPDD	0	0,0	0	0,0
96	310-321	GNRFLAPDDQIK	5	10,4	4	8,3
97	313-324	FLAPDDQIKKNV	6	12,5	4	8,3
98	316-327	PDDQIKKNVLAR	13	27,1	8	16,7
99	319-330	QIKKNVLARTGT	8	16,7	4	8,3
100	322-333	KNVLARTGTGAA	6	12,5	5	10,4
101	325-336	LARTGTGAAESM	10	20,8	7	14,6
102	328-339	TGTGAAESMAWN	9	18,8	6	12,5
103	331-342	GAAESMAWNWRS	2	4,2	1	2,1
104	334-345	ESMAWNWRSKDK	2	4,2	1	2,1
105	337-348	AWNWRSDKDLLE	4	8,3	3	6,3
106	340-351	WRSDKDLLENGA	3	6,3	1	2,1
107	343-354	DKDLLENGAIFV	30	62,5	27	56,3
108	346-357	LLENGAIFVTSG	27	56,3	24	50,0
109	349-360	NGAIFVTSGSDP	12	25,0	9	18,8
110	352-363	IFVTSGSDPVLT	13	27,1	11	22,9
111	355-366	TSGSDPVLTPVQ	16	33,3	11	22,9
112	358-369	SDPVLTPVQSAG	7	14,6	3	6,3
113	361-372	VLTPVQSAGMIP	4	8,3	1	2,1
114	364-375	PVQSAGMIPAEP	8	16,7	5	10,4
115	367-378	SAGMIPAEPGEA	18	37,5	17	35,4
116	370-381	MIPAEPGEAAIK	6	12,5	4	8,3
117	373-384	AEPGEAAIKLTS	4	8,3	3	6,3
118	376-387	GEAAIKLTSSAG	10	20,8	8	16,7
119	379-390	AIKLTSSAGVLS	16	33,3	10	20,8
120	382-393	LTSSAGVLSRCP	14	29,2	9	18,8
121	385-397	SAGVLSRCPGAPC	6	12,5	2	4,2

Ejemplo 3: Caracterización de las cadenas alfa y beta de Amb a 1

nAmb a 1 experimenta proteólisis espontáneamente durante la purificación y se escinde en dos cadenas, cadena alfa y beta, respectivamente. Los datos usando sueros recogidos de pacientes en diversos países (Italia, Canadá y Austria) mostraron que la mayoría de los pacientes (90%) reconocían fuertemente la cadena beta de 12 kDa. En cambio, la cadena alfa se unía débilmente a anticuerpos IgE de sólo el 65% de los pacientes sometidos a prueba (figura 9).

En experimentos dirigidos a la identificación de epítomos de células T (descritos en el ejemplo 2) se encontró que las tres regiones de activación de células T inducían respuestas proliferativas en más del 45% de los pacientes alérgicos y se definieron por tanto como epítomos inmunodominantes (tabla 3, figura 8). De manera interesante, estas y otras regiones de activación de células T están agrupadas en la región C-terminal de Amb a 1, que corresponde a la cadena alfa. Por tanto, al contrario que la investigación publicada anteriormente (King *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 212: 127-135, 1981), los presentes datos en conjunto muestran que las propiedades inmunológicas de las dos cadenas de Amb a 1 difieren. Estos hallazgos incitaron a investigar la posibilidad de producir por separado las cadenas en *E. coli* y usarlas como vacuna candidata para el diagnóstico y la inmunoterapia de la alergia. La cadena alfa con la capacidad de unión a IgE inferior pero con alta inmunogenicidad (activación de células T) es una herramienta perfecta para la inmunoterapia específica mientras que la cadena beta altamente reactiva con IgE es un candidato para el diagnóstico de la alergia al polen de ambrosía.

Para este fin, se realizaron experimentos para determinar el sitio de escisión exacto para la generación de las cadenas alfa y beta, lo que se describió para Amb a 1 durante su extracción y purificación a partir de polen de ambrosía (King *et al.* Immunochem. 11: 83-92, 1974). Además de la estimación de su peso molecular mediante SDS-PAGE, no se han publicado datos estructurales referentes a las cadenas de Amb a 1. Se analizó Amb a 1 natural purificado (véase King *et al.* Immunochem. 11: 83-92, 1974) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y se sometieron las bandas correspondientes a Amb a 1 intacto y cadenas alfa y beta de Amb a 1 a degradación de Edman tras SDS-PAGE/electrotransferencia/tinción de Coomassie. De este modo, fue posible determinar las masas exactas y las secuencias N-terminales de Amb a 1 natural procesado y no procesado (figuras 10-13; tabla 4).

Ejemplo 3.1: Análisis de la secuencia N-terminal

Se separó Amb a 1 natural mediante SDS-PAGE al 15% y se sometió a electrotransferencia sobre membranas de poli(difluoruro de vinilo) (PVDF) (Millipore). Se escindieron las bandas correspondientes a Amb a 1 y sus fragmentos, y se eluyeron las proteínas mediante incubación en ácido trifluoroacético al 30% (v/v) y acetonitrilo al 40% (v/v) acuoso durante 1 hora a temperatura ambiente. Se secaron las muestras a vacío, se resuspendieron en agua y se secuenciaron con el sistema de secuenciación de proteínas HP G1005A (Agilent Technologies).

Ejemplo 3.2: Espectrometría de masas por desorción/ionización por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF)

Se usaron los picos moleculares de ácido sinapínico y tripsina de páncreas bovino para la calibración. Se disolvieron 0,5 µl (~ 0,7 µg) de disolución de proteína Amb a 1 natural purificada en presencia de DTT 100 mM y 0,5 µl de una matriz de ácido sinapínico en una disolución saturada de acetonitrilo al 50% (v/v) y ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (v/v), se mezclaron y se aplicaron al portaobjetos objetivo. Se analizaron las muestras con el espectrómetro de masas Kompact MALDI-TOF IV (Shimadzu) en el modo de vuelo lineal.

Ejemplo 3.3: Resultados

Tomados conjuntamente, los datos (figuras 10-13; tabla 4) permitieron el mapeo exacto de las cadenas alfa y beta en la secuencia de aminoácidos deducida de Amb a 1 e indicaron que varias etapas proteolíticas están implicadas en su generación:

(i) La secuenciación N-terminal del Amb a 1 no procesado mostró que se eliminan 17-20 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína.

(ii) La cadena beta tiene 138 aminoácidos de longitud y corresponde a la parte N-terminal de Amb a 1 (posición de aminoácido 18 a 155 de la proteína madura, tomando la isoforma Amb a 1.1 como molde).

(iii) La cadena alfa tiene 207 aminoácidos de longitud y corresponde a la parte C-terminal de Amb a 1 (posición de aminoácido 165 a 371 de la proteína madura, tomando la isoforma Amb a 1.1 como molde).

(iv) Se eliminan nueve aminoácidos entre el extremo C-terminal de la cadena beta y el extremo N-terminal de la cadena alfa.

La figura 14 muestra las secuencias de aminoácidos deducidas de isoformas de Amb a 1 con las cadenas alfa y beta supuestas mapeadas sobre sus secuencias.

Tabla 4: Análisis de espectrometría de masas de Amb a 1 natural

	Amb a 1 no procesado		Cadena alfa de Amb a 1		Cadena beta de Amb a 1	
	Calculado	Medido	Calculado	Medido	Calculado	Medido
nAmb a 1		37.832,14		21.808,54		15.086,31
				22.323,24		
Amb a 1.1	37.864,43		21.999,50		15.017,04	
Amb a 1.2	38.625,71		22.425,10		15.268,56	
Amb a 1.3	38.255,30		22.036,77		15.286,49	
Amb a 1.4	38.008,93		21.953,62		15.130,29	
Amb a 2	39.392,56		22.921,76		15.638,88	

5 *Ejemplo 4: Producción recombinante de las cadenas alfa y beta de Amb a 1.3*

Ejemplo 4.1: Construcción de plásmidos de expresión y purificación de las cadenas alfa y beta de Amb a 1.3 diseñadas según cadenas procesadas de manera natural

10 Se realizaron la construcción de plásmidos y la purificación de cadenas tal como se describe en el ejemplo 4.2. Las diferencias en las cadenas se representan en la figura 16. La tabla 5 resume los diferentes constructos para la producción recombinante de cadenas alfa y beta.

Ejemplo 4.2: Producción recombinante de cadenas alfa y beta modificadas (versión 1) de Amb a 1.3

15 Los presentes experimentos demostraron que la producción separada de las cadenas modificadas es mucho más eficaz que la producción de la molécula de Amb a 1.3 de longitud completa. El rendimiento de producción de la cadena alfa fue de aproximadamente 100 mg/1 l de cultivo de fermentación. Además, no se observó formación significativa de agregados para cadenas tanto alfa como beta (figura 18).

20 *Ejemplo 4.2.1: Construcción de plásmidos*

A partir del clon R2 original, se realizó una PCR convencional de 100 µl con cebadores diseñados según las cadenas modificadas. Se eluyeron los productos de PCR del gel de agarosa con el sistema de limpieza Wizard Gene (Promega). Ambos conjuntos de cebadores (para beta y alfa) incluían un sitio NcoI en el extremo 5' y un codón de terminación más un sitio XhoI en el extremo 3'. Con estas enzimas, se digirieron los fragmentos de PCR y el vector pHisparallel-2 durante la noche a 37°C. Tras la elución del gel de agarosa (sistema de limpieza Wizard Gene, Promega), se ligaron los fragmentos de PCR en el vector usando un protocolo de ligamiento convencional con ADN ligasa de T4 (Invitrogen). Se usó la reacción de ligamiento para transformar la cepa bacteriana TG1 (K12, D(lac-pro), supE, thi, hsdD5/F'[traD36, proA+B+, lacIq, lacZDM15]) por medio de electroporación. Tras la siembra en placa de 100 µl de la transformación, se incubaron las placas de agar de LBamp durante la noche a 37°C. Se usó el examen de colonias por PCR para seleccionar clones positivos. (Se usa una pequeña cantidad de colonia bacteriana como molde para la PCR convencional con cebador de clonación). Se usaron clones seleccionados para cultivos en SB de 50 ml y purificación de plásmidos. Se secuenciaron los insertos con el kit de secuenciación ABI. Se usaron plásmidos con la secuencia correcta para transformar las cepas bacterianas BL21 y Rosetta-gami B (DE3)pLysS (Novagen). Los experimentos preliminares mostraron que se lograban niveles de expresión superiores con la cepa de *E. coli* Rosetta-gami B (DE3)pLysS (figura 17).

40 *Ejemplo 4.2.2: Expresión y purificación de cadenas alfa y beta de Amb a 1.3 modificadas (versión 1)*

Se hicieron crecer 10-20 clones de bacterias recién transformadas en SB hasta una DO₆₀₀ de 0,5-0,7 y luego se indujeron con IPTG 0,4 mM. Se realizó la expresión durante 4-5 h y entonces se sedimentó el cultivo mediante centrifugación (5.000 g). Se resuspendió el sedimento bacteriano en tampón de inicio (fosfato de Na 25 mM pH 8,0; NaCl 1 M). Se lisaron las células mediante congelación 3x en nitrógeno líquido y descongelación a 25°C. Se trató la suspensión con lisozima (5 mg/ml), ADNasa (0,5 µg/ml) y se sonicó durante 5 minutos. Tras la centrifugación (15.000 g) se resuspendieron los sedimentos en tampón de inicio con urea (tampón de inicio + urea 6 M + imidazol 10 mM). Tras la centrifugación (15.000 g), se cargó el sobrenadante sobre una columna HisTrap Ni²⁺ (Amersham). Se realizó la elución mediante gradiente con tampón de elución (tampón de inicio con urea + imidazol 400 mM). Se reunieron las fracciones y se dializaron 3 veces frente a L-Arg 500 mM pH 8,5. Después de eso, se dializaron las proteínas frente a PBS. Se usaron cadenas alfa y beta de Amb a 1.3 purificadas (figura 18) para los ensayos de unión a IgE y proliferación de células T.

Ejemplo 4.2.3: Respuestas de células T a cadenas alfa y beta de Amb a 1.3 modificadas (versión 1)

55 En comparación con los resultados del reconocimiento de epítomos de células T en la tabla 3, 45/46 pacientes (98%) reconocieron uno o más epítomos en la cadena alfa de Amb a 1. Por tanto, se sometieron a prueba las respuestas de

células T a cadenas alfa y beta de Amb a 1.3 modificadas (versión 1) en ensayos de proliferación usando TCL (n=6) y TCC (n=2) reactivos con Amb a 1 disponibles, descritos en el ejemplo 2.

Ejemplo 4.3: Producción recombinante

5 La producción de cadenas alfa y beta diseñadas según Amb a 1 procesado de manera natural no fue muy alentadora, con rendimientos muy bajos. Sin embargo, los datos obtenidos a partir de experimentos de mapeo de epítomos de células T indicaron que no se incluyó un epítomo importante en la cadena alfa, que alberga la mayoría de los dominios reactivos con células T (figura 16; aa 178-189). Por tanto, se diseñaron nuevas cadenas para incluir este epítomo de células T (tabla 5, figura 16).

Ejemplo 4.4: Unión a IgE

15 Tal como se muestra en el ejemplo 3, las cadenas alfa y beta de Amb a 1 procesadas de manera natural tienen propiedades inmunológicas diferenciadas. La cadena alfa muestra baja reactividad con IgE mientras que la cadena beta contiene la mayoría de los epítomos de IgE de Amb a 1. Por tanto, para someter a prueba la actividad de unión a IgE de la cadena alfa purificada, se realizó un ELISA con sueros de pacientes alérgicos a ambrosía. Los resultados de 12 pacientes confirmaron que la cadena alfa muestra baja / ninguna actividad de unión a IgE *in vitro* (figura 19). Están llevándose a cabo experimentos para la purificación y caracterización de la cadena beta.

Ejemplo 4.5: Reactividad con células T

25 De 6 TCL sometidas a prueba, en la figura 20 se muestran 2 TCL con fuerte reactividad frente a Amb a 1. La cadena alfa era mucho más eficaz en la estimulación de la proliferación que la cadena beta (el 82% y el 84% frente al 38 y el 19% de la respuesta a Amb a 1). Este hallazgo puede explicarse por el patrón de reconocimiento de epítomos de estas 2 TCL (véase la tabla 2). Otras dos TCL (figura 21) también reaccionaron con la cadena alfa y/o beta según su perfil de epítomos.

30 2 TCC específicos para epítomos dentro de Amb a 1-alfa reaccionaron con la cadena alfa pero no con la cadena beta, aunque no tan fuertemente como con Amb a 1.3.

Tabla 5. Cadenas de Amb a 1.3

Cadenas de Amb a 1.3		Posición de aminoácido	Longitud
Procesadas de manera natural	alfa	191 - 397	207 aminoácidos
	beta	44 - 181	138 aminoácidos
Diseño según el procesamiento de manera natural	alfa	191 - 397	208 aminoácidos
	beta	26 - 190	164 aminoácidos
Modificadas (versión 1)	alfa	174 - 397	224 aminoácidos
	beta	26 - 173	148 aminoácidos
Modificadas (versión 2)	alfa	174 - 397	224 aminoácidos
	beta	46 - 173	128 aminoácidos

35 Resumen:

En resumen, se identificaron 26 regiones de activación de células T relevantes de Amb a 1 tomando un SI>5 como umbral para la positividad (figuras 8 y 22).

40 En el análisis de epítomos de células T reconocidos por líneas de células T de 48 pacientes diferentes, se encontró que 17/26 epítomos se ubican en la región C-terminal de Amb a 1.3 (cadena alfa) mientras que la cadena beta sólo contiene unos cuantos epítomos de células T que se reconocieron principalmente por sólo el 10-30% de los pacientes (figura 8, tabla 3).

45 Sin embargo, una secuencia de epítomo de células T relevante/inmunodominante reconocida por más del 50% de los pacientes se elimina por escisión en las cadenas que se producen de manera natural (estaría sólo parcialmente representada en la cadena alfa). Con el fin de cubrir esta importante región de activación de células T, la invención incluye la modificación de la cadena alfa añadiendo 16 residuos de aminoácido del extremo C-terminal de la cadena beta al extremo N-terminal de la cadena alfa (versión modificada 1; figura 16, tabla 5). Por tanto, el constructo modificado (versión 1) de la cadena alfa de Amb a 1.3 incluye los 3 epítomos de células T más frecuentemente reconocidos de Amb a 1 (figura 22).

El uso de la cadena alfa completa de Amb a 1.3 (versión modificada 1) como vacuna para la alergia al polen de ambrosía cubriría al 100% de los pacientes sometidos a prueba (n=48).

55 El uso de una combinación de los tres epítomos de células T inmunodominantes identificados en el presente

documento para inmunoterapia peptídica de pacientes alérgicos al polen de ambrosía cubriría al 93% de los pacientes:

- 5 GMIKSNDGPPIL (péptido 52; SEQ ID No. 52)
 GSSQIWIDHCSLSKS (péptido 60-61; SEQ ID No. 137)
 DKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVQ (péptido 107-111; SEQ ID No. 138)

10 La siguiente mezcla de 4 péptidos cubriría al 95,8% de los pacientes:

- GMIKSNDGPPIL (péptido 52; SEQ ID No. 52)
 GSSQIWIDHCSLSKS (péptido 60-61; SEQ ID No. 137)
 15 DKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPVQ (péptido 107-111; SEQ ID No. 138)
 AIKLTSSAGVLSCRIP (péptido 119-120; SEQ ID No. 139)

20 También podría considerarse la adición de los siguientes péptidos frecuentemente reconocidos a esta combinación de péptidos óptima:

- KNIIHNINIHDVKVLPQ (péptido 46-48; SEQ ID No. 130)
 25 GSTHVTISNCKF (péptido 68; SEQ ID No. 68)
 SAGMIPAEPGEA (péptido 115; SEQ ID No. 115)

Lista de secuencias

- 30 <110> BIOMAY AG
 <120> Fragmentos de alérgenos
 35 <130> R 51484
 <150> Documento EP07102260.2
 <151> 13-02-2007
 40 <160> 145
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 45 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Fragmento de Amb a 1
 <400> 1
Ser Ala Glu Gly Val Gly Glu Ile Leu Pro Ser Val
1 5 10
 55 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 <400> 2
Gly Val Gly Glu Ile Leu Pro Ser Val Asn Glu Thr
1 5 10

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 10 <400> 3
Glu Ile Leu Pro Ser Val Asn Glu Thr Arg Ser Leu
1 5 10

 <210> 4
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 20
 <400> 4
Pro Ser Val Asn Glu Thr Arg Ser Leu Gln Ala Cys
1 5 10

 <210> 5
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 30
 <400> 5
Asn Glu Thr Arg Ser Leu Gln Ala Cys Glu Ala Tyr
.1 5 10

 35 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 6
Arg Ser Leu Gln Ala Cys Glu Ala Tyr Asn Ile Ile
1 5 10
 45
 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 7
Gln Ala Cys Glu Ala Tyr Asn Ile Ile Asp Lys Cys
1 5 10
 55
 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 8
 5 **Glu Ala Tyr Asn Ile Ile Asp Lys Cys Trp Arg Gly**
 1 5 10

 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 15 <400> 9
Asn Ile Ile Asp Lys Cys Trp Arg Gly Lys Ala Asp
 1 5 10

 <210> 10
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 25
 <400> 10
Asp Lys Cys Trp Arg Gly Lys Ala Asp Trp Glu Asn
 1 5 10

 <210> 11
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 11
Trp Arg Gly Lys Ala Asp Trp Glu Asn Asn Arg Gln
 1 5 10

 40 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 12
Lys Ala Asp Trp Glu Asn Asn Arg Gln Ala Leu Ala
 1 5 10
 50
 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 13
 60 **Trp Glu Asn Asn Arg Gln Ala Leu Ala Asp Cys Ala**
 1 5 10

<210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 10 <400> 14
Asn Arg Gln Ala Leu Ala Asp Cys Ala Gln Gly Phe
1 5 10

 <210> 15
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 20 <400> 15
Ala Leu Ala Asp Cys Ala Gln Gly Phe Ala Lys Gly
1 5 10

 <210> 16
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 30 <400> 16
Asp Cys Ala Gln Gly Phe Ala Lys Gly Thr Tyr Gly
1 5 10

 35 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 17
Gln Gly Phe Ala Lys Gly Thr Tyr Gly Gly Lys Trp
1 5 10

 45 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 18
Ala Lys Gly Thr Tyr Gly Gly Lys Trp Gly Asp Val
1 5 10

 55 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 19
 5 Thr Tyr Gly Gly Lys Trp Gly Asp Val Tyr Thr Val
 1 . 5 10

<210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 20
 15 Gly Lys Trp Gly Asp Val Tyr Thr Val Thr Ser Asn
 1 . 5 10

<210> 21
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 21
 25 Gly Asp Val Tyr Thr Val Thr Ser Asn Leu Asp Asp
 1 . 5 10

<210> 22
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 22
 35 Tyr Thr Val Thr Ser Asn Leu Asp Asp Asp Val Ala
 1 . 5 10

<210> 23
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 23
 45 Thr Ser Asn Leu Asp Asp Asp Val Ala Asn Pro Lys
 1 . 5 10

<210> 24
 <211> 12
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 24
 55 Leu Asp Asp Asp Val Ala Asn Pro Lys Glu Gly Thr
 1 . 5 10

60

<210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 10 <400> 25
Asp Val Ala Asn Pro Lys Glu Gly Thr Leu Arg Phe
1 5 10

 <210> 26
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 20 <400> 26
Asn Pro Lys Glu Gly Thr Leu Arg Phe Ala Ala Ala
1 5 10

 <210> 27
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 30 <400> 27
Glu Gly Thr Leu Arg Phe Ala Ala Ala Gln Asn Arg
1 5 10

 35 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 28
Leu Arg Phe Ala Ala Ala Gln Asn Arg Pro Leu Trp
1 5 10
 45
 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 29
Ala Ala Ala Gln Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe
1 5 10
 55
 <210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 30
 5 **Gln Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Lys Asn Asp**
 1 5 10

<210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 15 <400> 31
 Pro Leu Trp Ile Ile Phe Lys Asn Asp Met Val Ile
 1 5 10

<210> 32
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 25 <400> 32
 Ile Ile Phe Lys Asn Asp Met Val Ile Asn Leu Asn
 1 5 10

<210> 33
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 35 <400> 33
 Lys Asn Asp Met Val Ile Asn Leu Asn Gln Glu Leu
 1 5 10

<210> 34
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 45 <400> 34
 Met Val Ile Asn Leu Asn Gln Glu Leu Val Val Asn
 1 5 10

<210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 55 <400> 35
 Asn Leu Asn Gln Glu Leu Val Val Asn Ser Asp Lys
 1 5 10

60

<210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 10 <400> 36
Gln Glu Leu Val Val Asn Ser Asp Lys Thr Ile Asp
1 5 10

 <210> 37
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 20 <400> 37
Val Val Asn Ser Asp Lys Thr Ile Asp Gly Arg Gly
1 5 10

 <210> 38
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 38
Ser Asp Lys Thr Ile Asp Gly Arg Gly Val Lys Val
1 5 10

 35 <210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 39
Thr Ile Asp Gly Arg Gly Val Lys Val Glu Ile Ile
1 5 10

 45 <210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 40
Gly Arg Gly Val Lys Val Glu Ile Ile Asn Gly Gly
 55 **1 5 10**

 <210> 41
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 41
 Val Lys Val Glu Ile Ile Asn Gly Gly Leu Thr Leu
 5 1 5 10

 <210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 15 <400> 42
 Glu Ile Ile Asn Gly Gly Leu Thr Leu Met Asn Val
 1 5 10

 <210> 43
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 25
 <400> 43
 Asn Gly Gly Leu Thr Leu Met Asn Val Lys Asn Ile
 1 5 10

 <210> 44
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 44
 Leu Thr Leu Met Asn Val Lys Asn Ile Ile Ile His
 1 5 10

 40 <210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 45
 Met Asn Val Lys Asn Ile Ile Ile His Asn Ile Asn
 50 1 5 10

 <210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 46
 Lys Asn Ile Ile Ile His Asn Ile Asn Ile His Asp
 60 1 5 10

<210> 47
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 10 <400> 47
Ile Ile His Asn Ile Asn Ile His Asp Val Lys Val
1 5 10

 <210> 48
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 20 <400> 48
Asn Ile Asn Ile His Asp Val Lys Val Leu Pro Gly
1 5 10

 <210> 49
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 30 <400> 49
Ile His Asp Val Lys Val Leu Pro Gly Gly Met Ile
1 5 10

 35 <210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 50
Val Lys Val Leu Pro Gly Gly Met Ile Lys Ser Asn
1 5 10

 45 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 51
Leu Pro Gly Gly Met Ile Lys Ser Asn Asp Gly Pro
1 5 10

 55 <210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 52
 Gly Met Ile Lys Ser Asn Asp Gly Pro Pro Ile Leu
 5 1 5 10

<210> 53
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

15 <400> 53
 Lys Ser Asn Asp Gly Pro Pro Ile Leu Arg Gln Ala
 1 5 10

<210> 54
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

25 <400> 54
 Asp Gly Pro Pro Ile Leu Arg Gln Ala Ser Asp Gly
 1 5 10

<210> 55
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

35 <400> 55
 Pro Ile Leu Arg Gln Ala Ser Asp Gly Asp Thr Ile
 1 5 10

40 <210> 56
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 56
 Arg Gln Ala Ser Asp Gly Asp Thr Ile Asn Val Ala
 1 5 10

50 <210> 57
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 57
 Ser Asp Gly Asp Thr Ile Asn Val Ala Gly Ser Ser
 60 1 5 10

<210> 58
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 10 <400> 58
Asp Thr Ile Asn Val Ala Gly Ser Ser Gln Ile Trp
1 5 10

 <210> 59
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 20 <400> 59
Asn Val Ala Gly Ser Ser Gln Ile Trp Ile Asp His
1 5 10

 <210> 60
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 30 <400> 60
Gly Ser Ser Gln Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu
1 5 10

 35 <210> 61
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 61
Gln Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser
1 5 10

 45 <210> 62
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 62
Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser Phe Asp Gly
 55 **1 5 10**

 <210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 63
 5 **Cys Ser Leu Ser Lys Ser Phe Asp Gly Leu Val Asp**
 1 5 10

<210> 64
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 15 <400> 64
 Ser Lys Ser Phe Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu
 1 5 10

<210> 65
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 25 <400> 65
 Phe Asp Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Gly Ser Thr
 1 5 10

<210> 66
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 35 <400> 66
 Leu Val Asp Val Thr Leu Gly Ser Thr His Val Thr
 1 5 10

<210> 67
 <211> 12
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 45 <400> 67
 Val Thr Leu Gly Ser Thr His Val Thr Ile Ser Asn
 1 5 10

<210> 68
 <211> 12
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 55 <400> 68
 Gly Ser Thr His Val Thr Ile Ser Asn Cys Lys Phe
 1 5 10

60

<210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 10 <400> 69
 His Val Thr Ile Ser Asn Cys Lys Phe Thr Gln Gln
 1 5 10

 <210> 70
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 20 <400> 70
 Ile Ser Asn Cys Lys Phe Thr Gln Gln Ser Lys Ala
 1 5 10

 <210> 71
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 71
 Cys Lys Phe Thr Gln Gln Ser Lys Ala Ile Leu Leu
 1 5 10

 35 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 72
 Thr Gln Gln Ser Lys Ala Ile Leu Leu Gly Ala Asp
 1 5 10

 45 <210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 73
 Ser Lys Ala Ile Leu Leu Gly Ala Asp Asp Thr His
 1 5 10

 55 <210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 74
Ile Leu Leu Gly Ala Asp Asp Thr His Val Gln Asp
 1 5 10

5

<210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

15

<400> 75
Gly Ala Asp Asp Thr His Val Gln Asp Lys Gly Met
 1 5 10

<210> 76
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

25

<400> 76
Asp Thr His Val Gln Asp Lys Gly Met Leu Ala Thr
 1 5 10

<210> 77
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

35

<400> 77
Val Gln Asp Lys Gly Met Leu Ala Thr Val Ala Phe
 1 5 10

40

<210> 78
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 78
Lys Gly Met Leu Ala Thr Val Ala Phe Asn Met Phe
 1 5 10

50

<210> 79
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 79
Leu Ala Thr Val Ala Phe Asn Met Phe Thr Asp Asn
 1 5 10

60

<210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 10 <400> 80
Val Ala Phe Asn Met Phe Thr Asp Asn Val Asp Gln
1 5 10

 <210> 81
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 20 <400> 81
Asn Met Phe Thr Asp Asn Val Asp Gln Arg Met Pro
1 5 10

 <210> 82
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 82
Thr Asp Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg
1 5 10

 35 <210> 83
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 83
Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg Phe Gly Phe
1 5 10

 45 <210> 84
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 84
Arg Met Pro Arg Cys Arg Phe Gly Phe Phe Gln Val
 55 **1 5 10**

 <210> 85
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 85
 5 Arg Cys Arg Phe Gly Phe Phe Gln Val Val Asn Asn
 1 5 10

<210> 86
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

15 <400> 86
 Phe Gly Phe Phe Gln Val Val Asn Asn Asn Tyr Asp
 1 5 10

<210> 87
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

25 <400> 87
 Phe Gln Val Val Asn Asn Asn Tyr Asp Arg Trp Gly
 1 5 10

<210> 88
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

35 <400> 88
 Val Asn Asn Asn Tyr Asp Arg Trp Gly Thr Tyr Ala
 1 5 10

40 <210> 89
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 89
 Asn Tyr Asp Arg Trp Gly Thr Tyr Ala Ile Gly Gly
 1 5 10

50 <210> 90
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 90
 60 Arg Trp Gly Thr Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser Ala
 1 5 10

<210> 91
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 10 <400> 91
Thr Tyr Ala Ile Gly Gly Ser Ser Ala Pro Thr Ile
1 5 10

 <210> 92
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 20 <400> 92
Ile Gly Gly Ser Ser Ala Pro Thr Ile Leu Cys Gln
1 5 10

 <210> 93
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 30 <400> 93
Ser Ser Ala Pro Thr Ile Leu Cys Gln Gly Asn Arg
1 5 10

 35 <210> 94
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 94
Pro Thr Ile Leu Cys Gln Gly Asn Arg Phe Leu Ala
1 5 10

 45 <210> 95
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 95
Leu Cys Gln Gly Asn Arg Phe Leu Ala Pro Asp Asp
 55 **1 5 10**

 <210> 96
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 96
 5 Gly Asn Arg Phe Leu Ala Pro Asp Asp Gln Ile Lys
 1 5 10

 <210> 97
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 15 <400> 97
 Phe Leu Ala Pro Asp Asp Gln Ile Lys Lys Asn Val
 1 5 10

 <210> 98
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 25 <400> 98
 Pro Asp Asp Gln Ile Lys Lys Asn Val Leu Ala Arg
 1 5 10

 <210> 99
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 99
 Gln Ile Lys Lys Asn Val Leu Ala Arg Thr Gly Thr
 1 5 10

 40 <210> 100
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 100
 Lys Asn Val Leu Ala Arg Thr Gly Thr Gly Ala Ala
 1 5 10

 50 <210> 101
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

 <400> 101
 60 Leu Ala Arg Thr Gly Thr Gly Ala Ala Glu Ser Met
 1 5 10

<210> 102
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 <400> 102
 Thr Gly Thr Gly Ala Ala Glu Ser Met Ala Trp Asn
 1 5 10
 <210> 103
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 20 <400> 103
 Gly Ala Ala Glu Ser Met Ala Trp Asn Trp Arg Ser
 1 5 10
 <210> 104
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 30 <400> 104
 Glu Ser Met Ala Trp Asn Trp Arg Ser Asp Lys Asp
 1 5 10
 <210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 40 <400> 105
 Ala Trp Asn Trp Arg Ser Asp Lys Asp Leu Leu Glu
 1 5 10
 45 <210> 106
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 <400> 106
 Trp Arg Ser Asp Lys Asp Leu Leu Glu Asn Gly Ala
 1 5 10
 55 <210> 107
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>

<223> Fragmento de Amb a 1

<400> 107
Asp Lys Asp Leu Leu Glu Asn Gly Ala Ile Phe Val
1 5 10

5 <210> 108
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 108
Leu Leu Glu Asn Gly Ala Ile Phe Val Thr Ser Gly
1 5 10

15 <210> 109
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

25 <400> 109
Asn Gly Ala Ile Phe Val Thr Ser Gly Ser Asp Pro
1 5 10

30 <210> 110
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 110
Ile Phe Val Thr Ser Gly Ser Asp Pro Val Leu Thr
1 5 10

40 <210> 111
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 111
Thr Ser Gly Ser Asp Pro Val Leu Thr Pro Val Gln
1 5 10

50 <210> 112
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 112
Ser Asp Pro Val Leu Thr Pro Val Gln Ser Ala Gly
1 5 10

60

<210> 113
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 <400> 113
 Val Leu Thr Pro Val Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro
 1 5 10
 <210> 114
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 20 <400> 114
 Pro Val Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro Ala Glu Pro
 1 5 10
 <210> 115
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 30 <400> 115
 Ser Ala Gly Met Ile Pro Ala Glu Pro Gly Glu Ala
 1 5 10
 <210> 116
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 40 <400> 116
 Met Ile Pro Ala Glu Pro Gly Glu Ala Ala Ile Lys
 1 5 10
 45 <210> 117
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 <400> 117
 Ala Glu Pro Gly Glu Ala Ala Ile Lys Leu Thr Ser
 1 5 10
 55 <210> 118
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>

<223> Fragmento de Amb a 1

<400> 118
Gly Glu Ala Ala Ile Lys Leu Thr Ser Ser Ala Gly
 1 5 10

5 <210> 119
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 119
Ala Ile Lys Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 120
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

25 <400> 120
Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Arg Pro
 1 5 10

30 <210> 121
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 121
Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Arg Pro Gly Ala Pro Cys
 1 5 10

40 <210> 122
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 122
Val Ala Phe Asn Met Phe Thr Asp Asn Val Asp Gln Arg Met Pro
 1 5 10 15

50 <210> 123
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 123
Val Asn Asn Asn Tyr Asp Arg Trp Gly Thr Tyr Ala Ile Gly Gly
 1 5 10 15

60

<210> 124
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 <400> 124
 10 Pro Asp Asp Gln Ile Lys Lys Asn Val Leu Ala Arg Thr Gly Thr
 1 5 10 15
 <210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 20 <400> 125
 Leu Ala Arg Thr Gly Thr Gly Ala Ala Glu Ser Met Ala Trp Asn
 1 5 10 15
 <210> 126
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 30 <400> 126
 Glu Gly Thr Leu Arg Phe Ala Ala Ala Gln Asn Arg Pro Leu Trp
 1 5 10 15
 <210> 127
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Fragmento de Amb a 1
 <400> 127
 Gln Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Lys Asn Asp Met Val Ile
 1 5 10 15
 45 <210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Fragmento de Amb a 1
 <400> 128
 Lys Asn Asp Met Val Ile Asn Leu Asn Gln Glu Leu Val Val Asn
 1 5 10 15
 55 <210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>

<223> Fragmento de Amb a 1

<400> 129

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

5

<210> 130

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Fragmento de Amb a 1

<400> 130

Lys Asn Ile Ile Ile His Asn Ile Asn Ile His Asp Val Lys Val Leu
 1 5 10 15

15

Pro Gly

<210> 131

<211> 18

<212> PRT

20

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento de Amb a 1

25

<400> 131

Asn Gly Ala Ile Phe Val Thr Ser Gly Ser Asp Pro Val Leu Thr Pro
 1 5 10 15

Val Gln

<210> 132

<211> 18

30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento de Amb a 1

35

<400> 132

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

Arg Pro

<210> 133

40

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45

<223> Fragmento de Amb a 1

<400> 133

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

Gly Gly

50

<210> 134

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento de Amb a 1

5

<400> 134

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

<210> 135

10

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> Fragmento de Amb a 1

<400> 135

Asn Val Ala Gly Ser Ser Gln Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser
1 5 10 15

Lys Ser

20

<210> 136

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Fragmento de Amb a 1

<400> 136

30

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

<210> 137

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Fragmento de Amb a 1

<400> 137

40

Gly Ser Ser Gln Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser
1 5 10 15

<210> 138

<211> 24

<212> PRT

45

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento de Amb a 1

50

<400> 138

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

Asp Pro Val Leu Thr Pro Val Gln
20

<210> 139

<211> 15

ES 2 561 588 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Fragmento de Amb a 1

<400> 139
 Ala Ile Lys Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Arg Pro
 1 5 10 15

10 <210> 140
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador

<400> 140
 gagagagacc atggccgaag gggcggaga aatcttacct tcag 44

20 <210> 141
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador

<400> 141
 30 gagagagact cgagtagca aggtgctcca ggacggcatg ag 42

<210> 142
 <211> 211
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena alfa de Amb a 1

40 <400> 142
 Pro Ile Leu Arg Gln Ala Ser Asp Gly Asp Thr Ile Asn Val Ala Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Gln Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser Phe Asp
 20 25 30

Gly Leu Val Asp Val Thr Leu Gly Ser Thr His Val Thr Ile Ser Asn
 35 40 45

ES 2 561 588 T3

Cys Lys Phe Thr Gln Gln Ser Lys Ala Ile Leu Leu Gly Ala Asp Asp
50 55 60

Thr His Val Gln Asp Lys Gly Met Leu Ala Thr Val Ala Phe Asn Met
65 70 75 80

Phe Thr Asp Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg Phe Gly Phe
85 90 95

Phe Gln Val Val Asn Asn Asn Tyr Asp Arg Trp Gly Thr Tyr Ala Ile
100 105 110

Gly Gly Ser Ser Ala Pro Thr Ile Leu Cys Gln Gly Asn Arg Phe Leu
115 120 125

Ala Pro Asp Asp Gln Ile Lys Lys Asn Val Leu Ala Arg Thr Gly Thr
130 135 140

Gly Ala Ala Glu Ser Met Ala Trp Asn Trp Arg Ser Asp Lys Asp Leu
145 150 155 160

Leu Glu Asn Gly Ala Ile Phe Val Thr Ser Gly Ser Asp Pro Val Leu
165 170 175

Thr Pro Val Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro Ala Glu Pro Gly Glu Ala
180 185 190

Ala Ile Lys Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Arg Pro Gly
195 200 205

Ala Pro Cys
210

<210> 143
<211> 224
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena alfa de Amb a 1

10 <400> 143
Val Leu Pro Gly Gly Met Ile Lys Ser Asn Asp Gly Pro Pro Ile Leu
1 5 10 15

Arg Gln Ala Ser Asp Gly Asp Thr Ile Asn Val Ala Gly Ser Ser Gln
20 25 30

Ile Trp Ile Asp His Cys Ser Leu Ser Lys Ser Phe Asp Gly Leu Val
35 40 45

Asp Val Thr Leu Gly Ser Thr His Val Thr Ile Ser Asn Cys Lys Phe
50 55 60

ES 2 561 588 T3

Thr Gln Gln Ser Lys Ala Ile Leu Leu Gly Ala Asp Asp Thr His Val
65 70 75 80

Gln Asp Lys Gly Met Leu Ala Thr Val Ala Phe Asn Met Phe Thr Asp
85 90 95

Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg Phe Gly Phe Phe Gln Val
100 105 110

Val Asn Asn Asn Tyr Asp Arg Trp Gly Thr Tyr Ala Ile Gly Gly Ser
115 120 125

Ser Ala Pro Thr Ile Leu Cys Gln Gly Asn Arg Phe Leu Ala Pro Asp
130 135 140

Asp Gln Ile Lys Lys Asn Val Leu Ala Arg Thr Gly Thr Gly Ala Ala
145 150 155 160

Glu Ser Met Ala Trp Asn Trp Arg Ser Asp Lys Asp Leu Leu Glu Asn
165 170 175

Gly Ala Ile Phe Val Thr Ser Gly Ser Asp Pro Val Leu Thr Pro Val
180 185 190

Gln Ser Ala Gly Met Ile Pro Ala Glu Pro Gly Glu Ala Ala Ile Lys
195 200 205

Leu Thr Ser Ser Ala Gly Val Leu Ser Cys Arg Pro Gly Ala Pro Cys
210 215 220

<210> 144
<211> 161
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cadena beta de Amb a 1

<400> 144
Ala Glu Gly Val Gly Glu Ile Leu Pro Ser Val Asn Glu Thr Arg Ser
1 5 10 15

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

Lys Ala Asp Trp Glu Asn Asn Arg Gln Ala Leu Ala Asp Cys Ala Gln
35 40 45

Gly Phe Ala Lys Gly Thr Tyr Gly Gly Lys Trp Gly Asp Val Tyr Thr
50 55 60

Val Thr Ser Asn Leu Asp Asp Asp Val Ala Asn Pro Lys Glu Gly Thr
65 70 75 80

ES 2 561 588 T3

Leu Arg Phe Ala Ala Ala Gln Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Lys
85 90 95

Asn Asp Met Val Ile Asn Leu Asn Gln Glu Leu Val Val Asn Ser Asp
100 105 110

Lys Thr Ile Asp Gly Arg Gly Val Lys Val Glu Ile Ile Asn Gly Gly
115 120 125

Leu Thr Leu Met Asn Val Lys Asn Ile Ile Ile His Asn Ile Asn Ile
130 135 140

His Asp Val Lys Val Leu Pro Gly Gly Met Ile Lys Ser Asn Asp Gly
145 150 155 160

Pro

- <210> 145
- <211> 148
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Cadena beta de Amb a 1

10

<400> 145
Ala Glu Gly Val Gly Glu Ile Leu Pro Ser Val Asn Glu Thr Arg Ser
1 5 10 15

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

Lys Ala Asp Trp Glu Asn Asn Arg Gln Ala Leu Ala Asp Cys Ala Gln
35 40 45

Gly Phe Ala Lys Gly Thr Tyr Gly Gly Lys Trp Gly Asp Val Tyr Thr
50 55 60

Val Thr Ser Asn Leu Asp Asp Asp Val Ala Asn Pro Lys Glu Gly Thr
65 70 75 80

Leu Arg Phe Ala Ala Ala Gln Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Lys
85 90 95

Asn Asp Met Val Ile Asn Leu Asn Gln Glu Leu Val Val Asn Ser Asp
100 105 110

Lys Thr Ile Asp Gly Arg Gly Val Lys Val Glu Ile Ile Asn Gly Gly
115 120 125

Leu Thr Leu Met Asn Val Lys Asn Ile Ile Ile His Asn Ile Asn Ile
130 135 140

His Asp Val Lys
145

15

REIVINDICACIONES

1. Formulación de vacuna que comprende un péptido que consiste en SEQ ID No. 52.
- 5 2. Formulación de vacuna según la reivindicación 1, que comprende los péptidos SEQ ID No. 52 y SEQ ID No. 137; SEQ ID No. 52 y SEQ ID No. 138; SEQ ID No. 52 y SEQ ID No. 139; SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 137 y SEQ ID No. 138; SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 138 y SEQ ID No. 139; SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 137 y SEQ ID No. 139; o SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 137, SEQ ID No. 138 y SEQ ID No. 139.
- 10 3. Formulación de vacuna según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la formulación comprende además al menos un adyuvante, excipiente y/o portador farmacéutico aceptable.
4. Péptido derivado del alérgeno de polen de ambrosía Amb a 1 y que consiste en una secuencia de aminoácido que consiste en SEQ ID No. 52 y variantes de la misma que difieren en un residuo de aminoácido.
- 15 5. Proteína de fusión que consiste en un péptido según la reivindicación 4 y al menos un segundo péptido derivado de un inmunógeno, caracterizada porque el inmunógeno es un alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Amb a 2, Amb a 3, Amb a 5, Amb a 6, Amb a 7, Amb a 8, Amb a 9, Amb a 10, Amb t 5, Art v 1, Art v 2, Art v 3, Art v 4, Art v 5, Art v 6, Hel a 1, Hel a 2, Hel a 3, Mer a 1, Che a 1, Che a 2, Che a 3, Sal k 1, Cat r 1, Pla 1 1, Hum j 1, Par j 1, Par j 2, Par j 3, Par o 1, Cyn d 1, Cyn d 7, Cyn d 12, Cyn d 15, Cyn d 22w, Cyn d 23, Cyn d 24, Dac g 1, Dac g 2, Dac g 3, Dac g 5, Fes p 4w, Hol 1 1, Lol p 1, Lol p 2, Lol p 3, Lol p 5, Lol p 11, Pha a 1, Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 11, Phl p 12, Phl p 13, Poa p 1, Poa p 5, Sor h 1, Pho d 2, Aln g 1, Bet v 1, Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Bet v 6, Bet v 7, Car b 1, Cas s 1, Cas s 5, Cas s 8, Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 10, Cor a 11, Que a 1, Fra e 1, Lig v 1, Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 4, Ole e 5, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8, Ole e 9, Ole e 10, Syr v 1, Cry j 1, Cry j 2, Cup a 1, Cup s 1, Cup s 3w, Jun a 1, Jun a 2, Jun a 3, Jun o 4, Jun s 1, Jun v 1, Pla a 1, Pla a 2, Pla a 3, Aca s 13, Blo t 1, Blo t 3, Blo t 4, Blo t 5, Blo t 6, Blo t 10, Blo t 11, Blo t 12, Blo t 13, Blo t 19, Der f 1, Der f 2, Der f 3, Der f 7, Der f 10, Der f 11, Der f 14, Der f 15, Der f 16, Der f 17, Der f 18w, Der m 1, Der p 1, Der p 2, Der p 3, Der p 4, Der p 5, Der p 6, Der p 7, Der p 8, Der p 9, Der p 10, Der p 11, Der p 14, Der p 20, Der p 21, Eur m 2, Eur m 14, Gly d 2, Lep d 1, Lep d 2, Lep d 5, Lep d 7, Lep d 10, Lep d 13, Tyr p 2, Tyr p 13, Bos d 2, Bos d 3, Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d 8, Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Equ c 4, Equ c 5, Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5w, Fel d 6w, Fel d 7w, Cav p 1, Cav p 2, Mus m 1, Rat n 1, Alt a 1, Alt a 3, Alt a 4, Alt a 5, Alt a 6, Alt a 7, Alt a 8, Alt a 10, Alt a 12, Alt a 13, Cla h 2, Cla h 5, Cla h 6, Cla h 7, Cla h 8, Cla h 9, Cla h 10, Cla h 12, Asp f 13, Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4, Asp f 5, Asp f 6, Asp f 8, Asp f 9, Asp f 10, Asp f 11, Asp f 12, Asp f 13, Asp f 15, Asp f 16, Asp f 17, Asp f 18, Asp f 22w, Asp f 23, Asp f 27, Asp f 28, Asp f 29, Asp n 14, Asp n 18, Asp n 25, Asp o 13, Asp o 21, Pen b 13, Pen b 26, Pen ch 13, Pen ch 18, Pen ch 20, Pen c 3, Pen c 13, Pen c 19, Pen c 22w, Pen c 24, Pen o 18, Fus c 1, Fus c 2, Tri r 2, Tri r 4, Tri t 1, Tri t 4, Cand a 1, Cand a 3, Cand b 2, Psi c 1, Psi c 2, Cop c 1, Cop c 2, Cop c 3, Cop c 5, Cop c 7, Rho m 1, Rho m 2, Mala f 2, Mala f 3, Mala f 4, Mala s 1, Mala s 5, Mala s 6, Mala s 7, Mala s 8, Mala s 9, Mala s 10, Mala s 11, Mala s 12, Mala s 13, Epi p 1, Aed a 1, Aed a 2, Api m 1, Api m 2, Api m 4, Api m 6, Api m 7, Bom p 1, Bom p 4, Bla g 1, Bla g 2, Bla g 4, Bla g 5, Bla g 6, Bla g 7, Bla g 8, Per a 1, Per a 3, Per a 6, Per a 7, Chi k 10, Chi t 1-9, Chi t 1.01, Chi t 1.02, Chi t 2.0101, Chi t 2.0102, Chi t 3, Chi t 4, Chi t 5, Chi t 6.01, Chi t 6.02, Chi t 7, Chi t 8, Chi t 9, Cte f 1, Cte f 2, Cte f 3, Tha p 1, Lep s 1, Dol m 1, Dol m 2, Dol m 5, Dol a 5, Pol a 1, Pol a 2, Pol a 5, Pol d 1, Pol d 4, Pol d 5, Pol e 1, Pol e 5, Pol f 5, Pol g 5, Pol m 5, Vesp c 1, Vesp c 5, Vesp m 1, Vesp m 5, Ves f 5, Ves g 5, Ves m 1, Ves m 2, Ves m 5, Ves p 5, Ves s 5, Ves vi 5, Ves v 1, Ves v 2, Ves v 5, Myr p 1, Myr p 2, Sol g 2, Sol g 4, Sol i 2, Sol i 3, Sol i 4, Sol s 2, Tria p 1, Gad c 1, Sal s 1, Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 7, Bos d 8, Gal d 1, Gal d 2, Gal d 3, Gal d 4, Gal d 5, Met e 1, Pen a 1, Pen i 1, Pen m 1, Pen m 2, Tod p 1, Hel as 1, Hal m 1, Ran e 1, Ran e 2, Bra j 1, Bra n 1, Bra o 3, Bra r 1, Bra r 2, Hor v 15, Hor v 16, Hor v 17, Hor v 21, Sec c 20, Tri a 18, Tri a 19, Tri a 25, Tri a 26, Zea m 14, Zea m 25, Ory s 1, Api g 1, Api g 4, Api g 5, Dau c 1, Dau c 4, Cor a 1.04, Cor a 2, Cor a 8, Fra a 3, Fra a 4, Mal d 1, Mal d 2, Mal d 3, Mal d 4, Pyr c 1, Pyr c 4, Pyr c 5, Pers a 1, Pru ar 1, Pru ar 3, Pru av 1, Pru av 2, Pru av 3, Pru av 4, Pru d 3, Pru du 4, Pru p 3, Pru p 4, Aspa o 1, Cro s 1, Cro s 2, Lac s 1, Vit v 1, Mus xp 1, Ana c 1, Ana c 2, Cit 1 3, Cit s 1, Cit s 2, Cit s 3, Lit c 1, Sin a 1, Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4, Vig r 1, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7, Ara h 8, Len c 1, Len c 2, Pis s 1, Pis s 2, Act c 1, Act c 2, Cap a 1w, Cap a 2, Lyc e 1, Lyc e 2, Lyc e 3, Sola t 1, Sola t 2, Sola t 3, Sola t 4, Ber e 1, Ber e 2, Jug n 1, Jug n 2, Jug r 1, Jug r 2, Jug r 3, Ana o 1, Ana o 2, Ana o 3, Ric c 1, Ses i 1, Ses i 2, Ses i 3, Ses i 4, Ses i 5, Ses i 6, Cuc m 1, Cuc m 2, Cuc m 3, Ziz m 1, Ani s 1, Ani s 2, Ani s 3, Ani s 4, Arg r, Asc s 1, Car p 1, Den n 1, Hev b 1, Hev b 2, Hev b 3, Hev b 4, Hev b 5, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 6.03, Hev b 7.01, Hev b 7.02, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10, Hev b 11, Hev b 12, Hev b 13, Hom s 1, Hom s 2, Hom s 3, Hom s 4, Hom s 5 y Trip s 1.
6. Proteína de fusión según la reivindicación 5, que comprende además al menos un péptido derivado del alérgeno de polen de ambrosía Amb a 1 y que consiste en una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 37, SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID

- No. 41, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 47, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 67, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 69, SEQ ID No. 77, SEQ ID No. 78, SEQ ID No. 79, SEQ ID No. 80, SEQ ID No. 81, SEQ ID No. 83, SEQ ID No. 86, SEQ ID No. 87, SEQ ID No. 88, SEQ ID No. 89, SEQ ID No. 90, SEQ ID No. 91, SEQ ID No. 93, SEQ ID No. 94, SEQ ID No. 96, SEQ ID No. 97, SEQ ID No. 98, SEQ ID No. 99, SEQ ID No. 100, SEQ ID No. 101, SEQ ID No. 102, SEQ ID No. 107, SEQ ID No. 108, SEQ ID No. 109, SEQ ID No. 110, SEQ ID No. 111, SEQ ID No. 112, SEQ ID No. 114, SEQ ID No. 115, SEQ ID No. 118, SEQ ID No. 119, SEQ ID No. 120, SEQ ID No. 121, SEQ ID No. 122, SEQ ID No. 123, SEQ ID No. 124, SEQ ID No. 125, SEQ ID No. 126, SEQ ID No. 127, SEQ ID No. 128, SEQ ID No. 129, SEQ ID No. 130, SEQ ID No. 131, SEQ ID No. 132, SEQ ID No. 133, SEQ ID No. 134, SEQ ID No. 135, SEQ ID No. 136, SEQ ID No. 137, SEQ ID No. 138 y SEQ ID No. 139.
- 5
7. Molécula de ácido nucleico que codifica para un péptido según la reivindicación 4 o una proteína de fusión según la reivindicación 5 ó 6.
- 15
8. Vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7.
9. Vector según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho vector comprende además un promotor operativamente unido a dicha molécula de ácido nucleico.
- 20
10. Formulación de vacuna que comprende al menos una proteína de fusión según la reivindicación 5 ó 6, que comprende preferiblemente además al menos un adyuvante, excipiente y/o portador farmacéutico aceptable.
- 25
11. Uso de al menos un péptido según la reivindicación 4 y/o de una proteína de fusión según la reivindicación 5 ó 6 para la fabricación de una formulación de vacuna, preferiblemente para prevenir o tratar una alergia al polen de ambrosía en un individuo, en particular una alergia provocada por Amb a 1, o una alergia que reacciona de manera cruzada con una alergia al polen de ambrosía.
- 30
12. Uso de al menos un péptido según la reivindicación 4 y/o al menos una proteína de fusión según la reivindicación 5 ó 6 para diagnosticar *in vitro* una alergia a ambrosía o la sensibilidad de un individuo a un alérgeno de polen de ambrosía, en particular a Amb a 1, o una alergia que reacciona de manera cruzada con una alergia al polen de ambrosía.
- 35
13. Péptido según la reivindicación 4 o proteína de fusión según la reivindicación 5 ó 6, para su uso en la prevención o el tratamiento de una alergia al polen de ambrosía en un individuo, en particular una alergia provocada por Amb a 1, o una alergia que reacciona de manera cruzada con una alergia al polen de ambrosía.

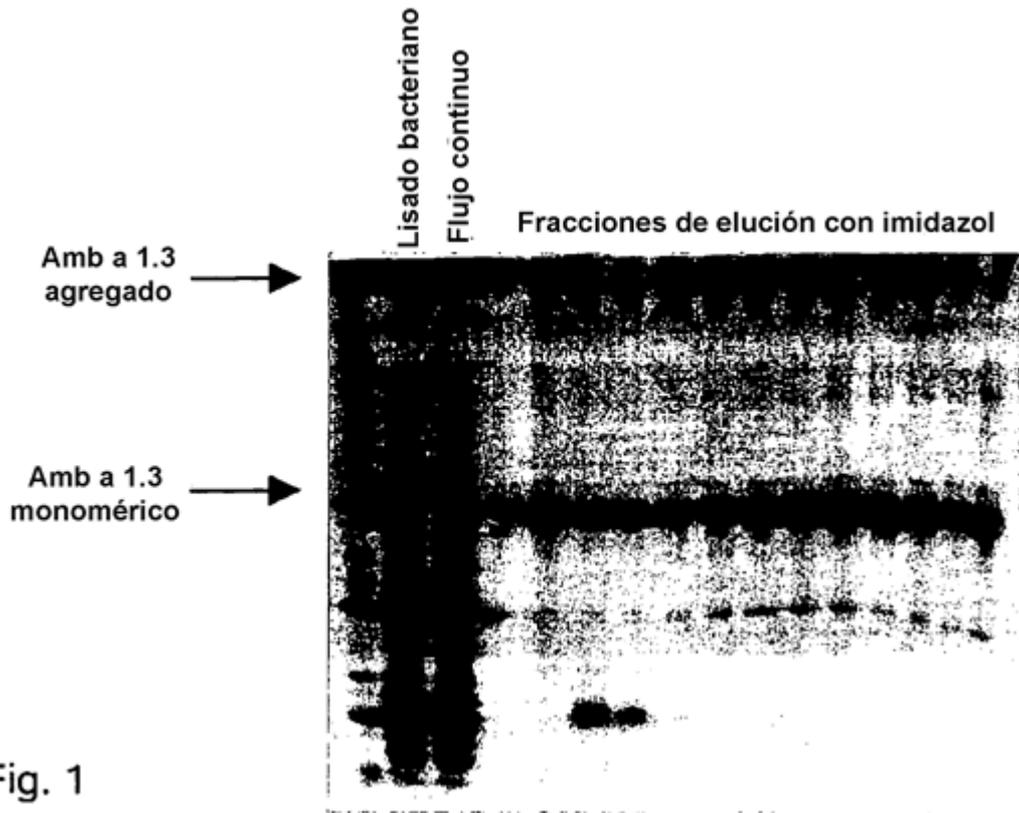


Fig. 1

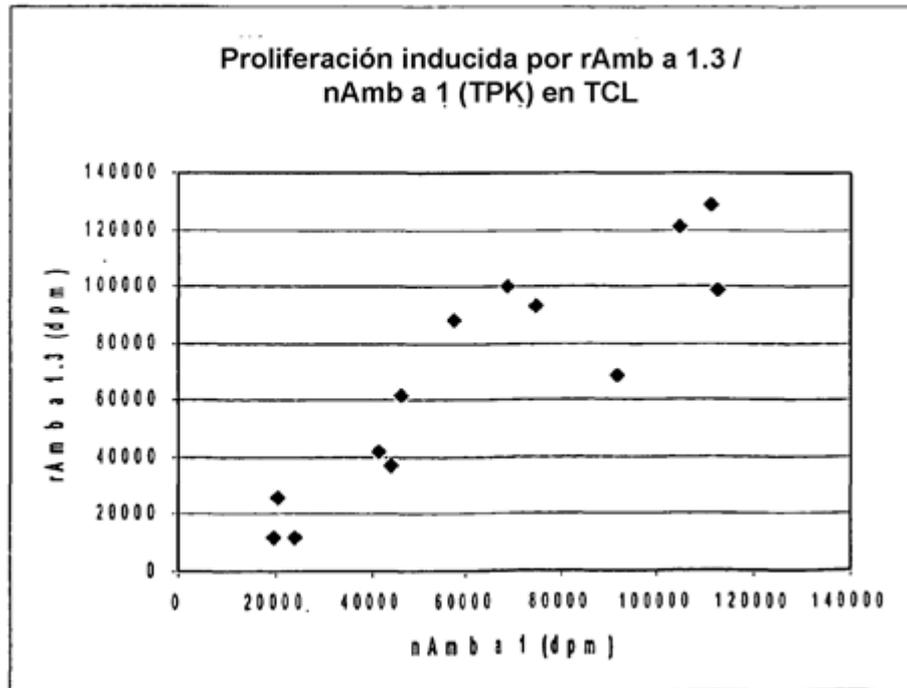


Fig. 3

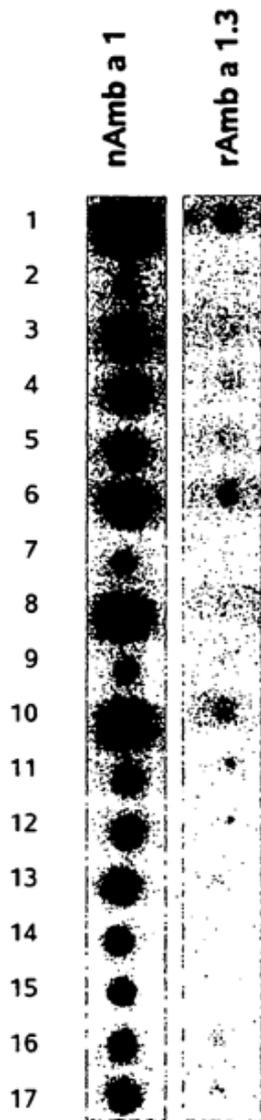


Fig. 2

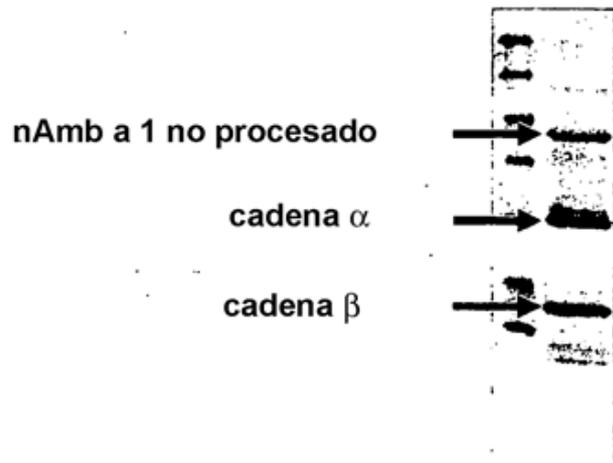


Fig. 10

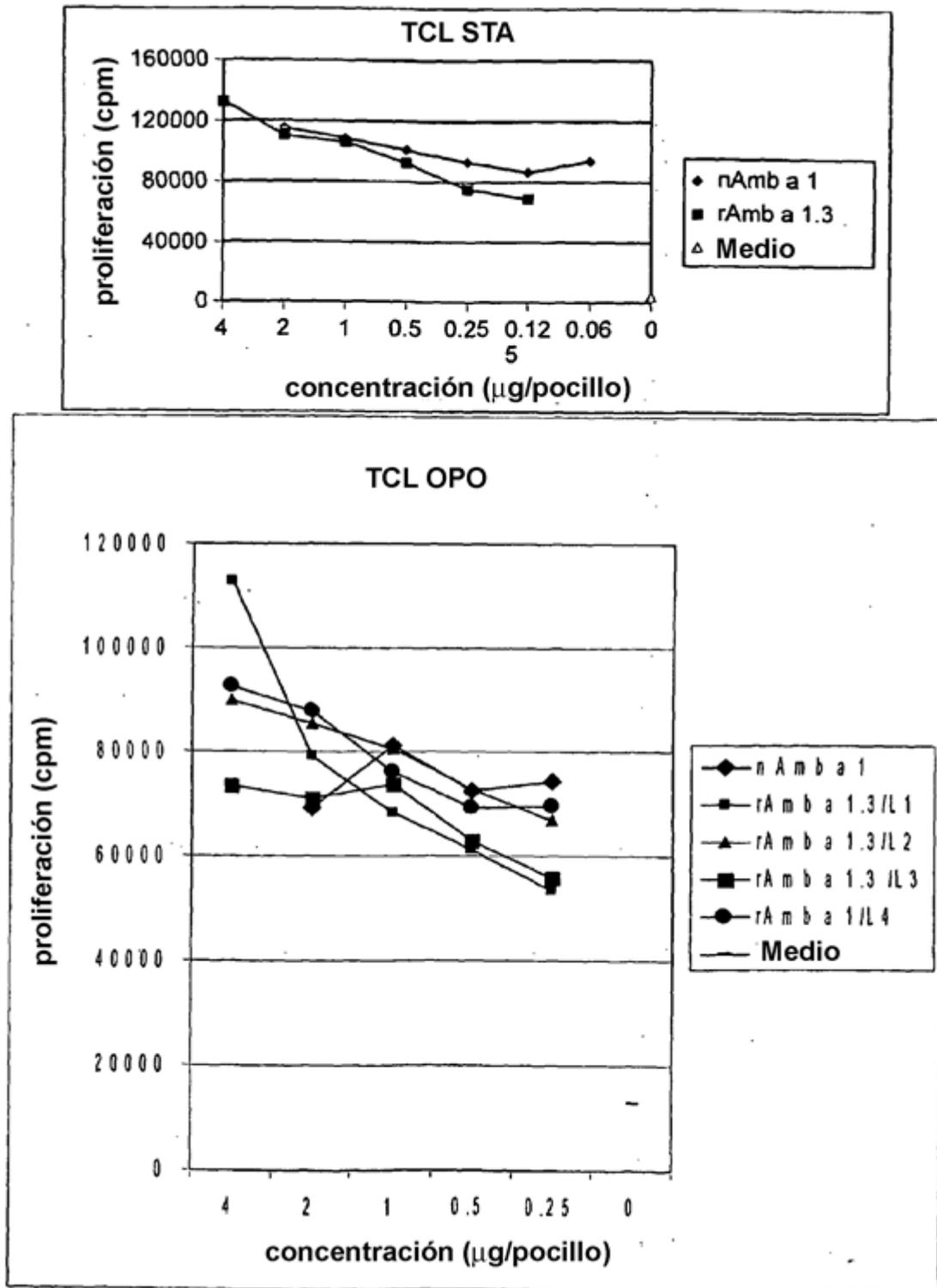


Fig. 4

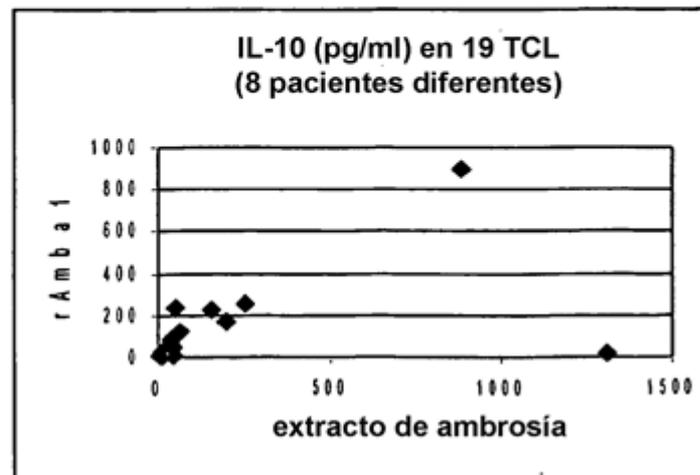
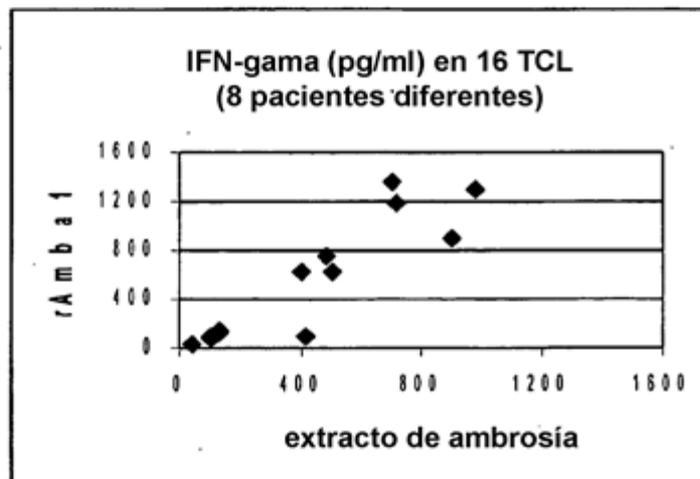
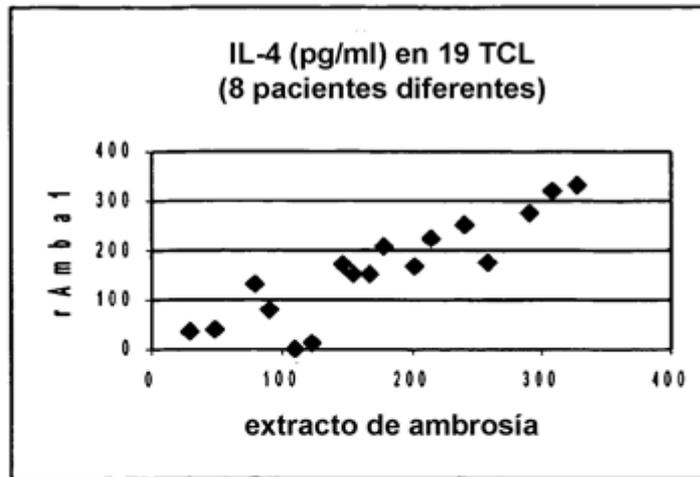


Fig. 5

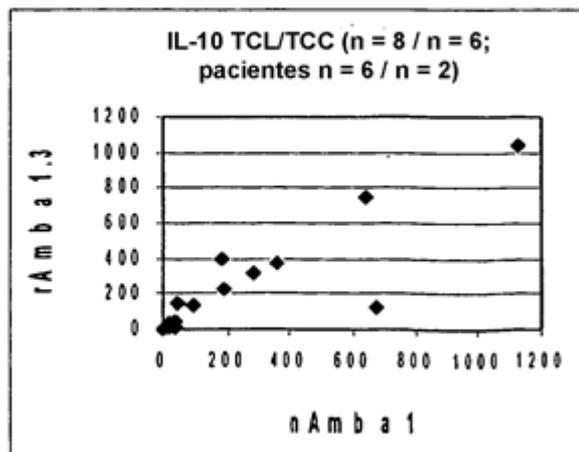
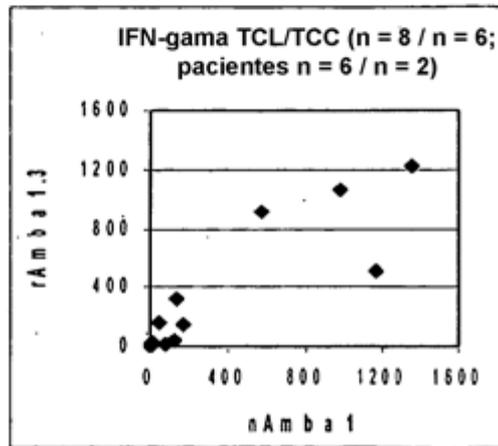
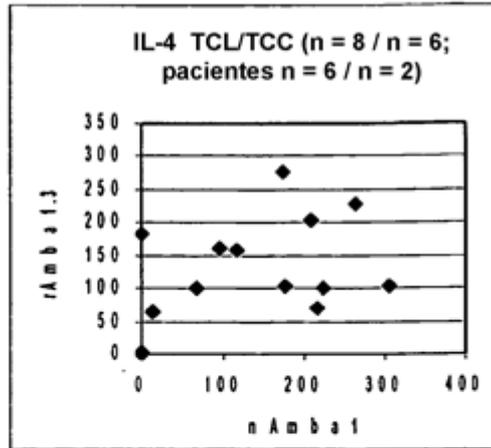


Fig. 6

TCL inducidas o bien con Amb a 1 natural o bien con rAmb a 1.3 reconocen epítomos de células T similares

Negrita: TCL inducidas con rAmb a 1.3
Sub: TCL inducidas con extracto de ambrosía

--- Epítomos de células T > 45% de prevalencia
▭ Epítomos de células T > 30%-45% de prevalencia

M G I K Q C C Y I L Y F T L A L V A L L Q P V R S A E G V G E I L P S V N E T R S L Q A C E A Y N I I D
 K C W R G K A D W E N N R Q A L A D C A Q G F A K G T Y G G K W G D V Y T V T S N L D D D V
 A N P K E G T L R F A A A Q N R P L W I I F **N D M V I N L N Q E L V V N S D K T I D G R G V K V E**
I N G G L T L M N V K N I I H N I N I H D V K V L P G **G M I K S N D G P P I L R** Q A S D G D T I N V A
G S S Q I W I D H C S L S K S F D G L V D V T L **G S T H V T I S N C K F T** Q Q S K A I L L G A D D T
 H V Q D K G M L A T V A F N M F T D N V D Q R M P R C R F G F F Q V V N N Y D R W G T Y A I
 G G S S A P T I L C Q G N R F L A P D D Q I K K N V L A R T G T G A A E S M A W N W R S **D K D L**
L E N G A I F V T I S G S D P V L T **P V Q S A G M I P A E P G E A A I K L T S S A G V L S C R** P G A P C

Fig. 7

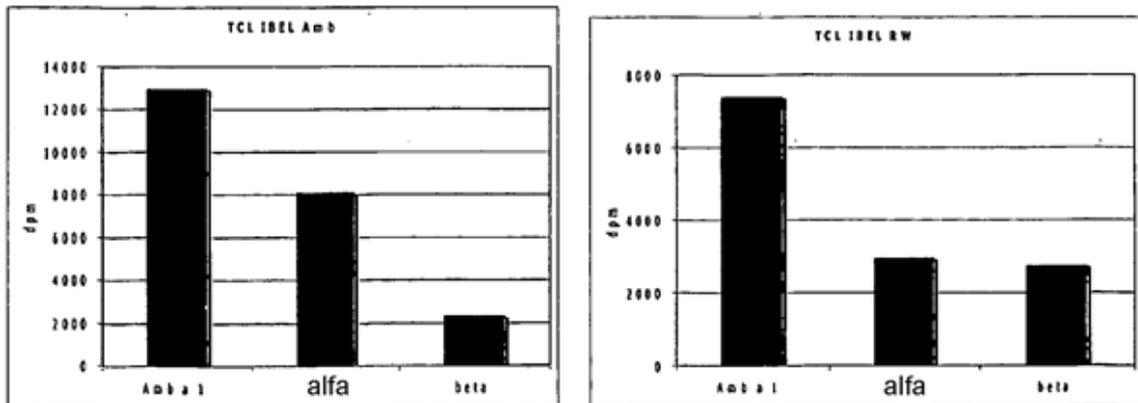


Fig. 21

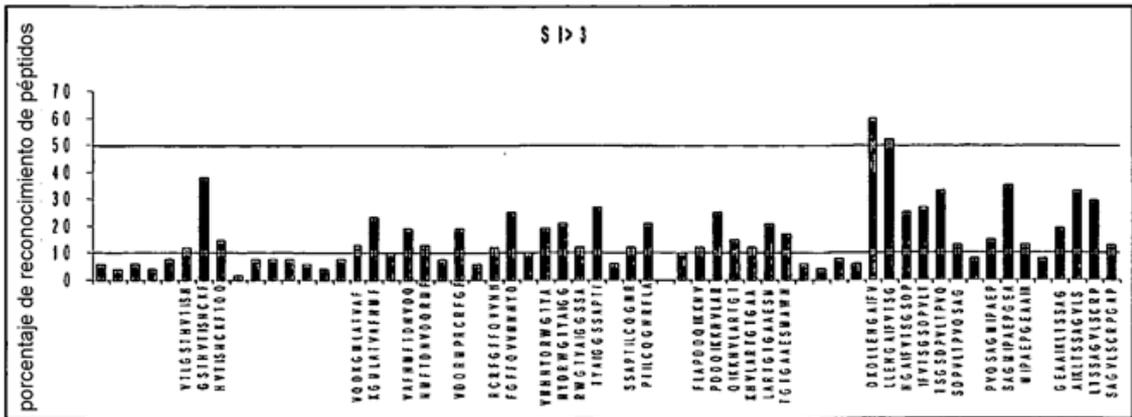
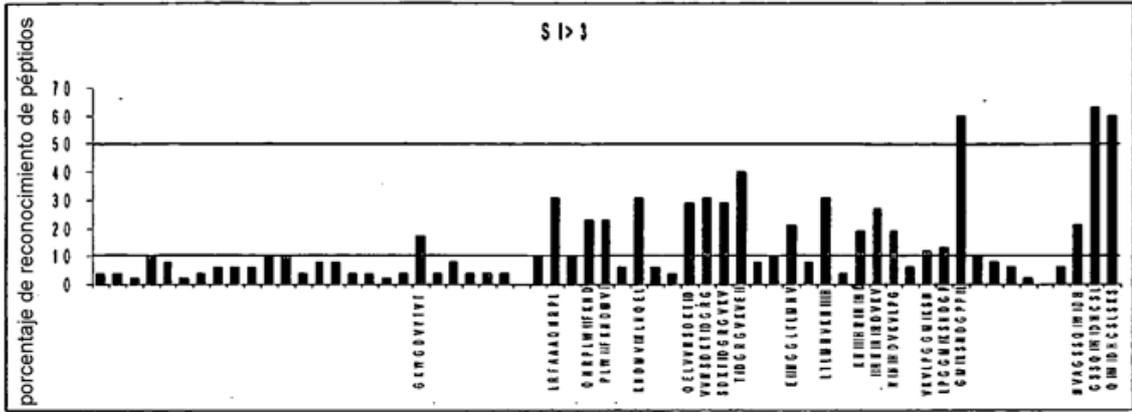


Fig. 8

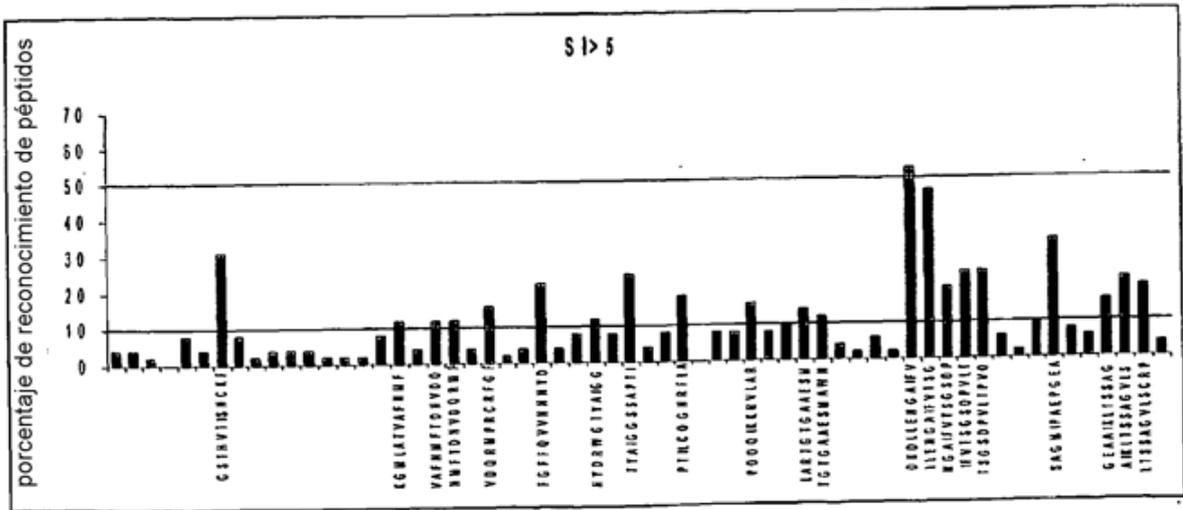
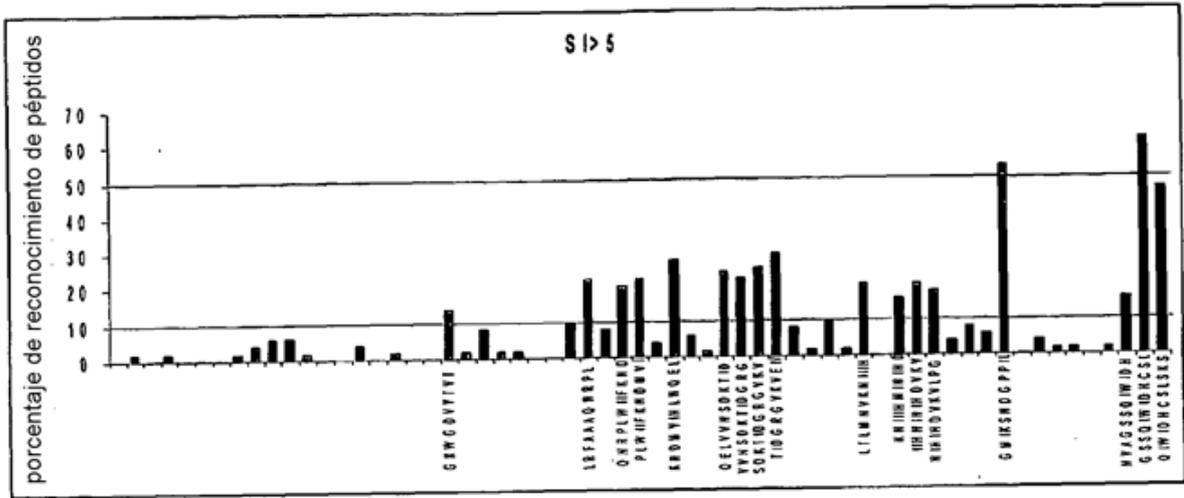


Fig. 8 cont.

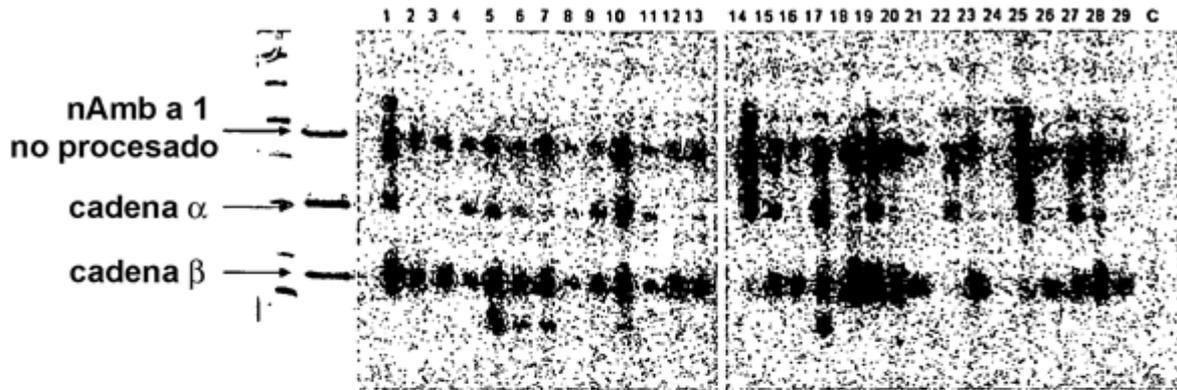


Fig. 9

nAmb a 1	TSGAYNIIDGxxRxKA...
Amb a 1.1	AEDLQEILP-VNETRR-LTTSGAYNIIDGCWRGKA...
Amb a 1.2	AEDVEEFLPSANETRRSLKACEAHNIIDKCWRCKA...
Amb a 1.3	AEGVGEILPSVNETR-SLQACEAYNIIDKCWRGKA...
Amb a 1.4	AEDLQQILPSANETR-SLTTCTGTNYNIIDGCWRGKA...
Amb a 2	GRLGEEVDILPSPNDTRRSL-GCEAHNIIDKCWRCKP...

Fig. 11

nAmb a 1	APRDGDDISIIGSSQ...
nAmb a 1	APSAGSAIDAIGSSQ...
Amb a 1.1	AGSDGDAISISGSSQ...
Amb a 1.2	QQSDGDAINVAGSSQ...
Amb a 1.3	QASDGDITINVAGSSQ...
Amb a 1.4	KGSDGDAIGISGGSQ...
Amb a 2	HQSDGDAIHVTGSSD...

Fig. 12

nAmb a 1	TSGAYNIIDGCxRGKAD...
Amb a 1.1	AEDLQEILP-VNETRR-LTTSGAYNIIDGCWRGKAD...
Amb a 1.2	AEDVEEFLPSANETRRSLKACEAHNIIDKCWRCKAD...
Amb a 1.3	AEGVGEILPSVNETR-SLQACEAYNIIDKCWRGKAD...
Amb a 1.4	AEDLQQILPSANETR-SLTTCTGTNYNIIDGCWRGKAD...
Amb a 2	GRLGEEVDILPSPNDTRRSL-GCEAHNIIDKCWRCKPD...

Fig. 13

Isoforma Amb a 1.1 (registro de GenBank M80558/M63116)

MGIKHCCYILYFTLALVTLLOPVRSAEDLQBILPVNETRRLTSGAYNIIDGCWRGKADWAENRKALADCAQGF
KGTVGKDCDIYTVTSELDDDVANPKEGTLRFGAAQNRPLWIIFERDMVIRLDKEMVNSDKTIDGRGAKVEII
AGFTLNGVKNVIIHNINMHDVKVNPGGLIKENDOPAAPRAGSDGDAISISGSSQIWIDHCSLSKSVDGLVDARLG
TRLTVSNSLFTQHQFVLLFGADENIEDRGMLATVAFNTFTDNVDQRMPRCRHGFFQVVNNNYDKWSYAIGS
ASPTILSQGNRFCAPDERSKKNVLGRHGEAAESMKWNRTNKDVLENGAIFVASGVDPVLTPEQSAGMIPAEPG
ESALSLTSSAGVLSQPGAPC

Isoforma Amb a 1.2 (registro de GenBank M80559/M62981)

MGIKHCCYILYFTLALVTLLOPVRSAKDVEEFLPSANETRRSLKACEAHNIIDKCWRCKADWANNRQALADCAQG
FAKGTYGGKHDVYTVTSDKDDDVANPKEGTLRFAAAQNRPLWIIFKRNMVIHLNQELVVNSDKTIDGRGVKNI
VNAGLTLMNVKNIIIHNINIHDIKVCPOCMIKENDOPPILRQQSDGDAINVAGSSQIWIDHCSLSKASDGLLDIT
LGSSHVTSNCKFTQHQFVLLLGADDTHYQDKGMLATVAFNMFTDNVDQRMPRCRFGFFQVVNNNYDRWGTYAIG
GSSAPTILSQGNRFPADDIIKKNVLARTGTGNAESMSWNRTDRDLLENGAIFLPSGSDPVLTPEQKAGMIPAE
PGEAVLRLTSSAGVLSCHQGAPC

Isoforma Amb a 1.3 (registro de GenBank C53240)

MGIKQCCYILYFTLALVALLOPVRSAEQVGEILPSVNETRSLQACEAYNIIDKCWRGKADWENNRQALADCAQGF
AKGTYGGKWGDVYTVTSNLDDDVANPKEGTLRFAAAQNRPLWIIFKNDMVINLNQELVVNSDKTIDGRGVKEI
NGGLTLMNVKNIIIHNINIHDVKVLPGGMIKBNDOPPILRQASDGDTINVAGSSQIWIDHCSLSKSFDGLVDVTL
GSTHVTISNCKFTQSKAILLGADDTHVDKGMLATVAFNMFTDNVDQRMPRCRFGFFQVVNNNYDRWGTYAIG
SSAPTILQGNRFLAPDDOIKKNVLARTGTGAESMAWNRSDKDLLENGAIFVTSGSDPVLTPQSAGMIPAE
PGEAAIKLTSSAGVLSCRPGAPC

Isoforma Amb a 1.4 (registro de GenBank M80562)

MGIKHCCYILYFTLALVTLLOPVRSAEDLQILPSANETRSLTCGTYNIIDGCWRGKADWAENRKALADCAQGF
AKGTIGGKDGDIYTVTSELDDDVANPKEGTLRFGAAQNRPLWIIFARDMVIRLDRELAINNDKTIDGRGAKVEI
NAGFAIYNVKNIIIHNIIMHDIVVNPGGLIKBHDGPPVPRKGSDGDAIGISGSQIWIDHCSLSKAVDGLIDAKH
GSTHFTVSNCLFTQHQYLLLPWDFDERGMLCTVAFNKFTDNVDQRMPNLRHGFVQVVNNNYERWGSYALQSAGP
TILSQGNRFLASDIKKEVVGRYGESAMSESINWNRSYMDVFENGAIFVPSCVDPVLTPEQNAGMIPAE
PGEAVL
RLTSSAGVLSCPGAPC

Isoforma Amb a 2 (registro de GenBank M80561)

MGIKHCCYILYFTLALVTLVQQRLOEEVDILPSPNDTRRSLQCEAHNIIDKCWRCKPDWAENRQALGNCAQGF
GKATHGGKWGDIYMVTSDQDDVVNPKEGTLRFGATQDRPLWIIFQRDMIIYLQEMVVTSDKTIDGRGAKVELV
YGGITLMNVKNVIIHNIDIHDVRVLPGGRIKBNGGPAIPRHQSDGDAIHVTGSSDIWIDHCTLSKSFDGLVDVNW
GSTGVTISNCKFTHHEKAVLLGASDTHPQDLKMHVTLAYNIFTNTVHERMPRCRFGFFQIVNNFYDRWDKYAIG
SSNPTILSQGNKFVAPDFIYKKNVCLRTGAOEPEWMTWNRTQNDVLENGAIFVASGSDPVLTAEQNAGMMQAE
GDMVPQLTMNAGVLTCSPGAPC

Fig. 14

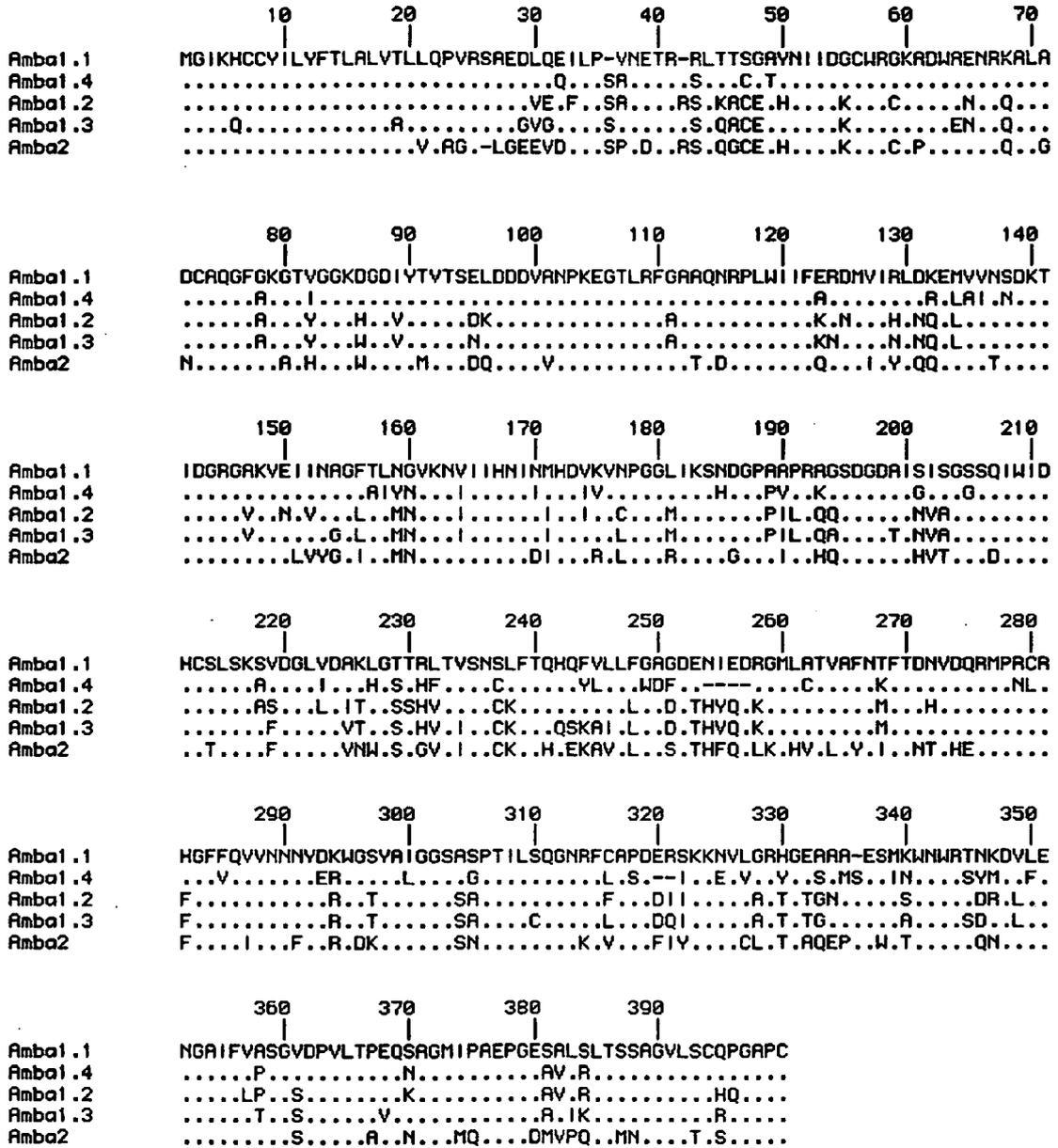


Fig. 15

a) Cadena alfa y beta supuesta procesada de manera natural de Amb a 1.3

MGIKQCCYILYFTLALVALLQPVRSAEGVGEILPSVNETRSLQACEAYNIIDKCWRGKADWENNRQALADCAQGF
AKGTYGGKWDVYTVTSLNDDD VANPK EGT LRF AAAQNR PLWII FKNDMVINLNQELVVNSDKTIDGRGVKVEI I
NGGLTLMNVKNI I IHNINI HDVKVLP GGM IKSNDG PPI LR QASD GDT INVAGSSQIWIDHCSLSKSF DGLVDVTL
GSTHVTI SNCKFTQOSKAI LLGADDTHVQDKGMLATVAFNMFTDNVDQRMPCR CRFGFQV VNNNYDRWGTYA IGG
SSAPTILCOGNRFLAPDDQIKKNVLAR TGTGAAESMAWNWR SDKDLLENGA I FVTSGSDPVLTPVQSAGMI PAEP
GEAAIKLTSSAGVLSRPGAPC

b) Cadena alfa y beta diseñada según procesamiento natural

MGIKQCCYILYFTLALVALLQPVRSAEGVGEILPSVNETRSLQACEAYNIIDKCWRGKADWENNRQALADCAQGF
AKGTYGGKWDVYTVTSLNDDD VANPK EGT LRF AAAQNR PLWII FKNDMVINLNQELVVNSDKTIDGRGVKVEI I
NGGLTLMNVKNI I IHNINI HDVKVLP GGM IKSNDG PPI LR QASD GDT INVAGSSQIWIDHCSLSKSF DGLVDVTL
GSTHVTI SNCKFTQOSKAI LLGADDTHVQDKGMLATVAFNMFTDNVDQRMPCR CRFGFQV VNNNYDRWGTYA IGG
SSAPTILCOGNRFLAPDDQIKKNVLAR TGTGAAESMAWNWR SDKDLLENGA I FVTSGSDPVLTPVQSAGMI PAEP
GEAAIKLTSSAGVLSRPGAPC

c) Cadenas alfa y beta modificadas (versión 1)

MGIKQCCYILYFTLALVALLQPVRSAEGVGEILPSVNETRSLQACEAYNIIDKCWRGKADWENNRQALADCAQGF
AKGTYGGKWDVYTVTSLNDDD VANPK EGT LRF AAAQNR PLWII FKNDMVINLNQELVVNSDKTIDGRGVKVEI I
NGGLTLMNVKNI I IHNINI HDVKVLP GGM IKSNDG PPI LR QASD GDT INVAGSSQIWIDHCSLSKSF DGLVDVTL
GSTHVTI SNCKFTQOSKAI LLGADDTHVQDKGMLATVAFNMFTDNVDQRMPCR CRFGFQV VNNNYDRWGTYA IGG
SSAPTILCOGNRFLAPDDQIKKNVLAR TGTGAAESMAWNWR SDKDLLENGA I FVTSGSDPVLTPVQSAGMI PAEP
GEAAIKLTSSAGVLSRPGAPC

d) Cadenas alfa y beta modificadas (versión 2)

MGIKQCCYILYFTLALVALLQPVRSAEGVGEILPSVNETRSLQACEAYNIIDKCWRGKADWENNRQALADCAQGF
AKGTYGGKWDVYTVTSLNDDD VANPK EGT LRF AAAQNR PLWII FKNDMVINLNQELVVNSDKTIDGRGVKVEI I
NGGLTLMNVKNI I IHNINI HDVKVLP GGM IKSNDG PPI LR QASD GDT INVAGSSQIWIDHCSLSKSF DGLVDVTL
GSTHVTI SNCKFTQOSKAI LLGADDTHVQDKGMLATVAFNMFTDNVDQRMPCR CRFGFQV VNNNYDRWGTYA IGG
SSAPTILCOGNRFLAPDDQIKKNVLAR TGTGAAESMAWNWR SDKDLLENGA I FVTSGSDPVLTPVQSAGMI PAEP
GEAAIKLTSSAGVLSRPGAPC

Fig. 16

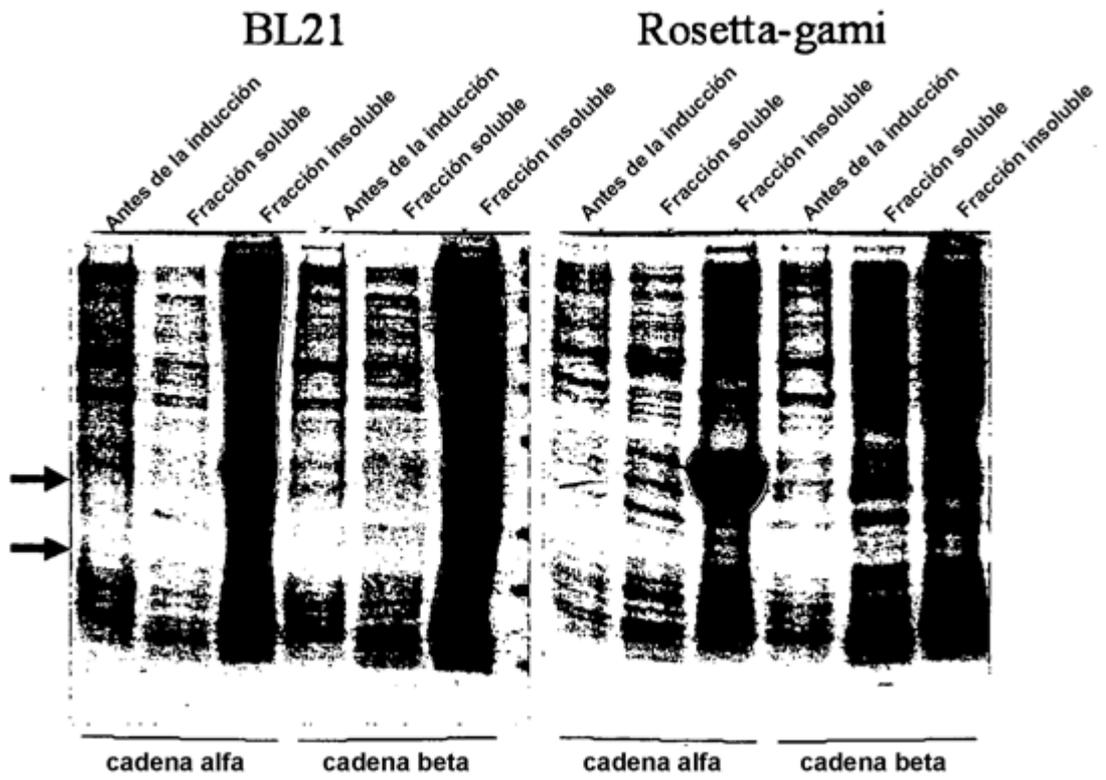


Fig. 17

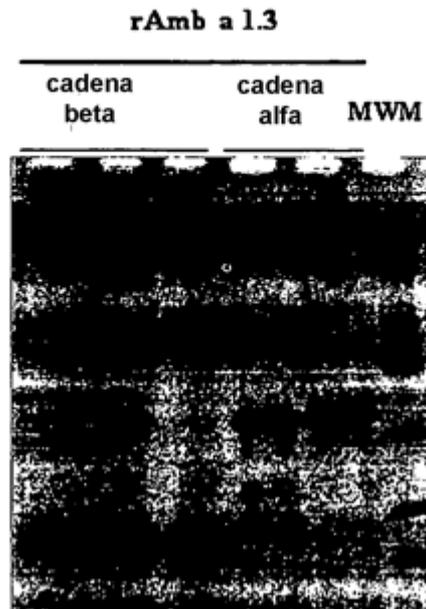


Fig. 18

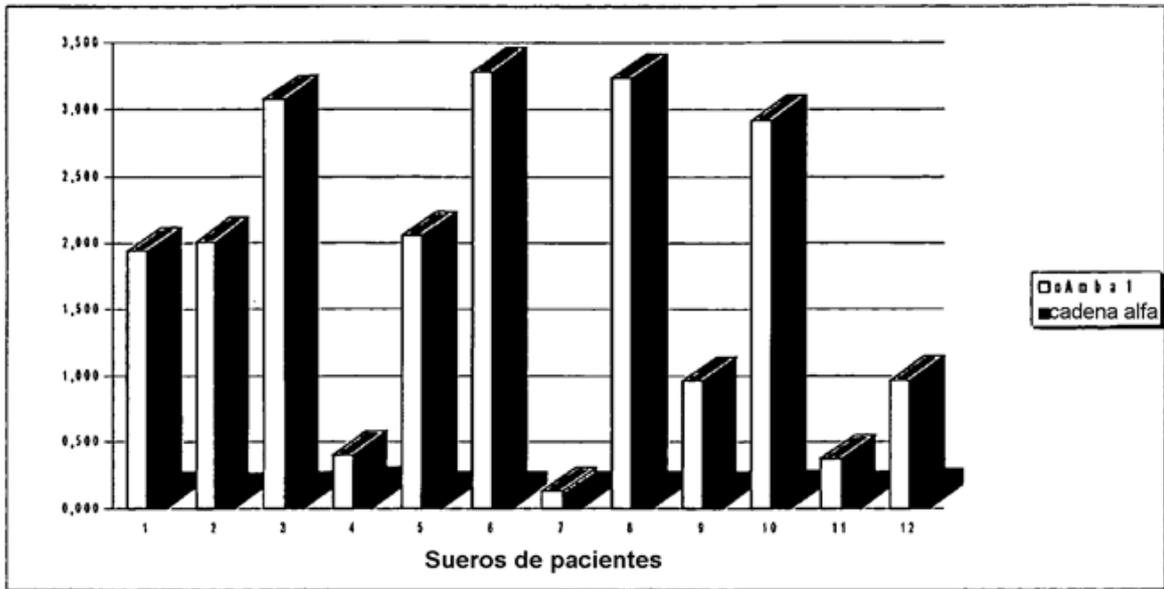


Fig. 19

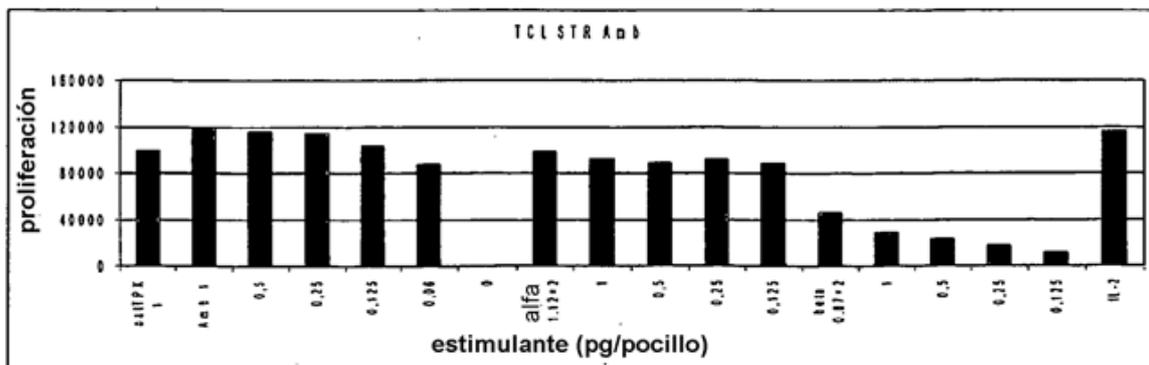


Fig. 20

*mgikqccyilyftlallvallqpvr*sAEGVGEILPSVNETRSLQACEAYN
IIDKCWRGKADWENNRQALADCAQGFAKGTYGGKWDVYTVTSNLDDDV
ANPKEGTLRFAAAQNRPLWIIFKNDMVINLNQELVVNSDKTIDGRGVKV
EIINGGLTLMNVKNIIIHNINIHDVKVLPGGMIKSNDGPPILRQASDGD
TINVAGSSQIWIDHCSLSKSF~~GLVDVTLG~~STHVTISNCKFTQQSKAIL
LGADDTHVQDKGMLATVAFNMFTDNVDQRMPCRFRGFFQVVNNNYDRWG
TYAIGGSSAPTILCQGNRFLAPDDQIKKNVLARTGTGAAESMAWNWRS
KDLENGAIFVTS~~GS~~DPVLTPVQSAGMIPAEPGEAAIKLTSSAGVLSCR
PGAPC

mg... *vrs* - Péptido señal
AEG...DVK - Cadena beta
VLP...APC - Cadena alfa

MGIKQCCYILYFTLALVALLQPVRSAEGVGEILPSVNETRSLQACEAYN
IIDKCWRGKADWENNRQALADCAQGFAKGTYGGKWDVYTVTSNDDDV
ANPKEGTLRFAAAQNRPLWIIFKNDMVIINLNQELVVNSDKTIDGRGVKV
eiinggltlm~~nv~~KNIIHNINIHDVKVLPGGMIKSNDGPPILRQASDGD
TINVAGSSQIWIDHCSLSKSF~~GLVDVTLG~~STHVTISNCKFTQQSKAIL
LGADDTHVQDKgmlatvafnmfTDNvdqrmprcrfgfQVVNNNYDRWG
TYAIGGSSAPTILCQGNRFLAPDDQIKKNVLARTGTGAAESMAWNWRS
KDLENGAIFVTS~~GS~~DPVLTPVQSAGMIPAEPGEAAIKLTSSAGVLSCR
PGAPC

 o péptidos en minúsculas positivos en el 10-20% de los pacientes
 o péptidos en cursiva positivos en el 21-30% de los pacientes
 péptidos positivos en el 31-40% de los pacientes
 péptidos en negrita positivos en >50% de los pacientes

Fig. 22