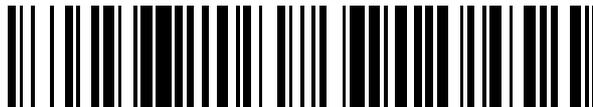


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 651**

51 Int. Cl.:

A61K 39/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2011 E 11730036 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2536429**

54 Título: **Péptidos para vacunas contra la alergia al abedul**

30 Prioridad:

15.02.2010 GB 201002559

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

09.06.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAFNER, RODERICK PETER;
LAIDLER, PAUL;
LAYTON, GUY y
LARCHE, MARK**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

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

ES 2 573 651 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 para vacunas contra la alergia al abedul

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para prevenir o tratar alergia al abedul.

10 **Antecedentes de la invención**

10 El reconocimiento de antígeno por linfocitos T requiere células presentadoras de antígeno (APC) que presenten los fragmentos de antígeno (péptidos) sobre su superficie celular en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos T usan sus receptores de linfocitos T específicos de antígeno (TCR) para reconocer los fragmentos de antígeno presentados por la APC. Tal reconocimiento actúa de desencadenante del sistema inmunitario para generar un intervalo de respuestas para erradicar el antígeno que ha sido reconocido.

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

20 La reticulación de moléculas de IgE unidas a la superficie por alérgeno produce la desgranulación de estas células efectoras causando la liberación de mediadores inflamatorios tales como histamina, 5-hidroxitriptamina y mediadores de lípido tales como los sulfidoleucotrienos. Además de los eventos dependientes de IgE, ciertas enfermedades alérgicas tales como el asma se caracterizan por eventos dependientes de IgE.

25 Las enfermedades alérgicas mediadas por IgE se tratan actualmente con agentes que proporcionan alivio sintomático o prevención. Ejemplos de tales agentes son antihistamínicos, agonistas de β_2 y glucocorticosteroides. Además, algunas enfermedades mediadas por IgE se tratan por procedimientos de desensibilización que implican la inyección periódica de componentes de alérgenos o extractos. Los tratamientos de desensibilización pueden inducir una respuesta de IgG que compite con IgE por el alérgeno, o pueden inducir linfocitos T supresores específicos que bloquean la síntesis de IgE dirigida contra alérgeno. Esta forma de tratamiento no siempre es eficaz y plantea el riesgo de provocar graves efectos secundarios, particularmente choque anafiláctico general. Esto puede ser letal a menos que se reconozca inmediatamente y se trate con adrenalina. Un tratamiento terapéutico que disminuiría o eliminaría la respuesta inmunitaria alérgica no deseada a un alérgeno particular, sin alterar la reactividad inmunitaria a otros antígenos extraños o desencadenar una respuesta alérgica en sí misma, sería de gran beneficio para individuos alérgicos.

30 Los alérgenos del polen son reconocidos como una causa importante de enfermedades alérgicas en seres humanos y animales, que incluyen asma, rinitis alérgica y dermatitis alérgica. Al menos el 10 % de la población de los EE.UU. padece alergias al polen diversas veces y a grados variables. Las proteínas presentes en el polen de los árboles, en particular de árboles del orden Fagales, por ejemplo, abedul, aliso, avellano, carpe y roble, son particularmente importantes. De estas especies, los alérgenos del polen del abedul son los iniciadores más frecuentes de respuestas alérgicas al polen de árboles (Jarolim et al: Allergy 1989; 44(6):385-95). Por ejemplo, aproximadamente el 25 % de los que padecen fiebre del heno son sensibles al polen del abedul. La fiebre del heno es el término común para una forma de alergia estacional caracterizada por estornudos, rinorrea y picazón en los ojos. La alergia al polen de los árboles es más problemática durante los meses de primavera, produciéndose la estación del polen del abedul normalmente alrededor de abril (en el hemisferio norte). Sin embargo, algunos tipos relacionados de árbol tales como aliso y avellano pueden liberar polen transmitido por el aire ya en enero (hemisferio norte). Éstos van seguidos por olmo, sauce y fresno en marzo, con roble a finales de abril y principios de mayo.

35 Se ha calculado que para adultos en los Estados Unidos, la fiebre del heno es la 5ª enfermedad crónica principal y una causa importante de absentismo laboral, produciendo casi 4 millones de días laborales perdidos cada año, produciendo un coste total superior a 700 millones de dólares en la productividad perdida total. Las alergias también son la afección crónica más frecuentemente informada en niños, limitando las actividades para más del 40 % de ellos. Cada año, las alergias explican más de 17 millones de visitas de pacientes ambulatorios a consultorios en los Estados Unidos; las alergias estacionales tales como la fiebre del heno explican más de la mitad de estas visitas por alergia.

40 Un tratamiento terapéutico o preventivo sería, por tanto, de gran beneficio para los seres humanos que padecen o están en riesgo de padecer alergia a los árboles.

D1 se refiere a una combinación de polipéptidos que previene múltiples sensibilidades a alérgenos del polen de abedul y pasto Timothy cuando se administra intranasalmente y que comprende un péptido derivado de Bet v 1 y dos péptidos derivados de alérgenos de pasto Timothy.

5 Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que ciertos fragmentos de péptido derivados de los principales alérgenos en los pólenes de especies de abedul son útiles en desensibilizar individuos a estos alérgenos. Los fragmentos de péptido derivados de Bet v2, Bet v1, Bet v3, Bet v4, Bet v6 y Bet v7 de abedul (nombre de la familia: *Betulaceae*) son particularmente útiles.

Los péptidos de la invención se seleccionaron como epítopes de linfocitos T que se unen a MHC clase II mediante el uso de análisis por ordenador para predecir interacciones péptido-MHC y ensayos de unión de MHC clase II. Epítopes adicionales se identificaron por homología.

Una dificultad asociada a los enfoques a la desensibilización basados en la inmunización con péptido se basa en cómo seleccionar un tamaño apropiado y región del alérgeno como base para el péptido que va a usarse para la inmunización. El tamaño del péptido de elección es crucial. Si el péptido es demasiado pequeño, la vacuna no sería eficaz en inducir una respuesta inmunológica. Si los péptidos son demasiado grandes, o si el antígeno completo se introduce en un individuo, hay riesgo de inducir reacciones adversas, tales como anafilaxis, que puede ser mortal.

Los polipéptidos de la invención se han seleccionado por retener especificidad de linfocitos T mientras que son de tamaño suficientemente pequeño para no poseer estructura terciaria significativa que les permitiera retener la conformación de un epítipo de unión a IgE de la molécula completa. Los polipéptidos de la invención, por tanto, no inducen reticulación significativa de moléculas de IgE específicas adyacentes sobre células tales como mastocitos y basófilos y, por consiguiente, no producen una significativa liberación de histamina.

Una ventaja de la invención es la capacidad de los péptidos para dirigirse ampliamente a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los receptores de linfocitos T (TCR) son altamente variables en su especificidad. La variabilidad se genera, como con moléculas de anticuerpo, mediante eventos de recombinación génica dentro de la célula. Los TCR reconocen antígeno en forma de péptidos cortos unidos a moléculas codificadas por los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Estos productos génicos son las mismas moléculas que dan lugar a "tipos de tejido" usados en trasplante y también se denominan moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA), términos que pueden usarse indistintamente. Las moléculas de MHC individuales poseen ranuras de unión al péptido que, debido a su forma y carga, son solo capaces de unirse a grupo limitados de péptidos. Los péptidos unidos por una molécula de MHC pueden no necesariamente ser unidos por otras moléculas de MHC.

Cuando una molécula de proteína tal como un antígeno o alérgeno es captada por células presentadoras de antígeno tales como linfocitos B, células dendríticas, monocitos y macrófagos, la molécula es enzimáticamente degradada dentro de la célula. El proceso de degradación da lugar a fragmentos de péptido de la molécula que, si son del tamaño, carga y forma apropiados, pueden entonces unirse dentro de la ranura de unión al péptido de ciertas moléculas de MHC y expresarse posteriormente sobre la superficie de células presentadoras de antígeno. Si los complejos de péptido/MHC están presentes sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno en números suficientes, entonces pueden activar a los linfocitos T que poseen los receptores de linfocitos T de péptido/específicos de MHC apropiados.

Debido a la naturaleza polimórfica del MHC, individuos en una población no consanguínea tal como el hombre expresarán diferentes combinaciones de moléculas de MHC sobre sus superficies celulares. Como diferentes moléculas de MHC pueden unirse a diferentes péptidos de la misma molécula basándose en el tamaño, carga y forma del péptido, diferentes individuos mostrarán un repertorio diferente de péptidos unidos a sus moléculas de MHC. La identificación de epítopes de péptido de unión a MHC universales en una población no consanguínea tal como el hombre es más difícil que en animales consanguíneos (tal como ciertas cepas de ratones de laboratorio). Basándose en la expresión de MHC diferencial entre individuos y las diferencias inherentes en la unión a péptido y la presentación que esto genera, es poco probable que pueda identificarse un único péptido que sea de uso para la terapia de desensibilización en el hombre.

Los péptidos de la invención, sin embargo, proporcionan una amplia cobertura de eficacia sobre la población humana dirigiendo múltiples moléculas de MHC diferentes. Una vacuna formulada con un péptido de la invención tendría, por tanto, amplia utilidad. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición adecuada para su uso en prevenir o tratar alergia al polen del abedul que comprende:

- i) el polipéptido de SEQ ID NO: 74 (BIR12B; AKYMVIIQGEPRVIRGK) o una variante del mismo, y
- ii) el polipéptido de SEQ ID NO: 53 (Bir02J; PAARMFKAFILEGDKLVPK) o una variante del mismo, en la que dicha variante de un polipéptido es:

l) hasta 20 aminoácidos de longitud y comprende la secuencia de dicho polipéptido, o

II) hasta 20 aminoácidos de longitud y comprende una secuencia que tiene al menos el 85 % de homología con la secuencia de dicho polipéptido y que es reconocida por un linfocito T que reconoce dicho polipéptido; o
 III) 9 a 20 aminoácidos de longitud y comprende una secuencia de dicho polipéptido, o una secuencia que tiene al menos el 85 % de homología con al menos 9 aminoácidos contiguos, secuencia de al menos 9 aminoácidos contiguos o secuencia homóloga que es reconocida por un linfocito T que reconoce dicho polipéptido.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* de determinación si linfocitos T reconocen una composición como se ha definido anteriormente que comprende poner en contacto dichos linfocitos T con dicha composición y detectar si dichos linfocitos T se estimulan por dicha composición.

Descripción de las secuencias mencionadas en el presente documento

Las SEQ ID NOS: 1 a 80 proporcionan las secuencias de polipéptidos de la invención como se explican en las Tablas 1 a 8. Las SEQ ID NOS: 1 a 34 y 45 a 70 se corresponden con péptidos derivados de Bet v1. Las SEQ ID NOS: 71 a 76 se corresponden con péptidos derivados de Bet v2. Las SEQ ID NOS: 35, 36 y 77 se corresponden con péptidos derivados de Bet v3. Las SEQ ID NOS: 37 a 39, 78 y 79 se corresponden con péptidos derivados de Bet v4. Las SEQ ID NOS: 40 a 43 y 80 se corresponden con péptidos derivados de Bet v6. La SEQ ID NO: 44 se corresponde con un péptido derivado de Bet v7.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a péptidos que pueden usarse en tolerización. Tales péptidos pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente de las secuencias mostradas en cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80. También pueden usarse variantes de estos péptidos específicos. Las variantes pueden comprender, consistir en, o consistir esencialmente en secuencias que son fragmentos de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80 u homólogos de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80.

La invención también proporciona composiciones y formulaciones que comprenden los polipéptidos de la invención. Tal tolerización normalmente será a un epítipo (por ejemplo, un epítipo de linfocitos T de unión a MHC clase II) presente en cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80.

Especies de árboles

Las especies de árbol de la familia *Betulaceae*, comúnmente conocidas como abedul, son responsables de una alta proporción de alergia a los árboles en el mundo, particularmente alergias asociadas al polen de árboles, tales como la fiebre del heno. Otras especies de árboles importantes incluyen aliso, avellano, carpe y roble.

Los árboles de abedul, por ejemplo, abedul plateado (*Betula pendula*), toleran una amplia gama de hábitats, con pH del suelo de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7. Son nativos a la mayoría de Europa y partes de Asia, pero son comunes en todo el mundo, encontrándose en todo el mundo, encontrándose en las zonas templadas, boreales y árticas del hemisferio norte, especialmente en Canadá y otras partes de América del Norte. Los árboles de abedul normalmente florecen entre abril y mayo (hemisferio norte).

Fragmentos de péptido de alérgenos del polen del abedul

Los presentes inventores han identificado las regiones en ciertas proteínas de los alérgenos del polen del abedul que comprenden epítopos de linfocitos T de unión a MHC clase II. Los presentes inventores también han mostrado que regiones correspondientes a epítopos de linfocitos T de unión a MHC clase II dentro de los principales alérgenos del polen del abedul están altamente conservadas entre diferentes isoformas de dichos alérgenos. Basándose en esta información, péptidos derivados de las regiones relevantes de cada proteína son adecuados para prevenir o tratar alergia al abedul por tolerización a todas las isoformas de esa proteína.

Los péptidos de la invención se derivan directamente o por homología de los alérgenos de proteína Bet v2 (SEQ ID NOS: 71 a 76), Bet v1 (SEQ ID NOS: 1 a 34 y 45 a 70), Bet v3 (SEQ ID NOS: 35, 36 y 77), Bet v4 (SEQ ID NOS: 37 a 39, 78 y 79), Bet v6 (SEQ ID NOS: 40 a 43 y 80) y Bet v7 (SEQ ID NO: 44). Los términos "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento. Las proteínas anteriores también se denominan en el presente documento "los alérgenos". Las Tablas 1 a 7 explican las secuencias de los péptidos de la invención (SEQ ID NOS: 1 a 80), que indican la proteína parental de la que se deriva cada péptido. La composición de la invención comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 74 o una variante del mismo como se define en el presente documento y el polipéptido de SEQ ID NO: 53 o una variante del mismo como se define en el presente documento.

En otras palabras, la invención proporciona una composición para su uso en la prevención o tratamiento de alergia al abedul que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 74 o una variante del mismo como se define en el presente documento y el polipéptido de SEQ ID NO: 53 o una variante del mismo como se define en el presente documento.

La composición comprende polipéptidos que se derivan de más de un alérgeno. La composición comprende uno o más polipéptidos o variantes de los mismos derivados de Bet v 2 y uno o más polipéptidos o variantes de los mismos derivados de Bet v 1. Pueden incluirse opcionalmente polipéptidos adicionales que se derivan de Bet v 3, Bet v 4, Bet v 6 y/o Bet v 7. Por consiguiente, la composición comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 74 (que se deriva de Bet v 2) o una variante del mismo como se define en el presente documento y el polipéptido SEQ ID NO: 53 (que se deriva de Bet v 1) o una variante del mismo como se define en el presente documento. La composición puede comprender además:

- i) al menos uno de los polipéptidos de SEQ ID NO: 72, 71, 73, 75 y 76 (que se derivan de Bet v 2), o una variante de los mismos como se define en el presente documento; y/o
- ii) al menos uno de los polipéptidos de SEQ ID NOS: 1 a 34, 45 a 52 y 54 a 70 (que se derivan de Bet v 1), o una variante de los mismos; y/o
- iii) al menos uno de los polipéptidos de:

- (a) SEQ ID NOS: 35, 36 y 77 (que se derivan de Bet v 3), o una variante de los mismos como se define en el presente documento; y/o
- (b) SEQ ID NOS: 37 a 39, 78 y 79 (que derivada de Bet v 4), o una variante de los mismos como se define en el presente documento; y/o
- (c) SEQ ID NOS: 40 a 43 y 80 (que se derivan de Bet v 6), o una variante de los mismos como se define en el presente documento; y/o
- (d) SEQ ID NO: 44 (que se deriva de Bet v 7), o una variante de los mismos como se define en el presente documento.

Los grupos (i), (ii) y (iii) (a) a (d) se corresponden con péptidos derivados de diferentes alérgenos Bet, como se ha descrito anteriormente. La combinación de polipéptidos derivados de diferentes alérgenos Bet puede permitir una amplia cobertura de la alergia al polen del abedul observada en la población general proporcionando epítopes tolerizantes de más de un alérgeno del polen del abedul. La composición puede comprender además al menos un polipéptido adicional de SEQ ID NO: 72 (BIR11; FPQFKPQEITGIMK), SEQ ID NO: 71 (BIR10; GSVWAQSSSFPQFK), SEQ ID NO: 73 (BIR12A; PTGMFVAGAKYMVIQGR), SEQ ID NO: 75 (BIR13; IKYMQVIGGEAGAVIRGK), SEQ ID NO: 76 (BIR14; EAGAVIRGKKGSGGIT), SEQ ID NO: 48 (Bir01; FNYETETTSVIPAARK) SEQ ID NO: 54 (Bir04; PGTIKKISFPEGFPFKYV), SEQ ID NO: 67 (Bir09; ETLRAVESYLLAHS DAY), SEQ ID NO: 60 (BIR07; SNEIKIVATPDGGSILK) y SEQ ID NO: 63 (Bir07C; SNEIKIVATPEGG SILK), SEQ ID NO: 77 (BIR15; SLNTRLRRIFDLFDK) o SEQ ID NO: 78 (BIR16A; AERERIFKRFDANGEGK), o una variante de los mismos como se define en el presente documento. En una realización preferida, la composición comprende:

- (a) el polipéptido Bir12B (AKYMVIQGEPRVIRGK), o una variante del mismo como se define en el presente documento;
- (b) el polipéptido Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK), o una variante del mismo como se define en el presente documento; y
- (c) el polipéptido Bir01I (FNYETETTSVIPAARK) o una variante del mismo como se define en el presente documento.

En una realización particularmente preferida, la composición comprende el polipéptido Bir12B (AKYMVIQGEPRVIRGK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir01I (FNYETETTSVIPAARK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir04 (PGTIKKISFPEGFPFKYV) o una variante del mismo, el polipéptido Bir09 (ETLLRAVESYLLAHS DAY) o una variante del mismo, el polipéptido Bir07C (SNEIKIVATPEGG SILK) o una variante del mismo, y el polipéptido Bir16A (AERERIFKRFDANGEGK) o una variante del mismo, y opcionalmente ningún polipéptido adicional.

En otra realización particularmente preferida, la composición comprende el polipéptido Bir12B (AKYMVIQGEPRVIRGK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir01I (FNYETETTSVIPAARK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir04 (PGTIKKISFPEGFPFKYV) o una variante del mismo, el polipéptido Bir07C (SNEIKIVATPEGG SILK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir16A (AERERIFKRFDANGEGK) o una variante del mismo, y el polipéptido Bir09B (KEMGETLLRAVESYLLAHS) o una variante del mismo, y opcionalmente ningún polipéptido adicional.

En otra realización particularmente preferida, la composición comprende el polipéptido Bir12B (AKYMVIQGEPRVIRGK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir01I (FNYETETTSVIPAARK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir04 (PGTIKKISFPEGFPFKYV) o una variante del mismo, el polipéptido Bir07C (SNEIKIVATPEGG SILK) o una variante del mismo, y el polipéptido Bir16A (AERERIFKRFDANGEGK) o una variante del mismo, y opcionalmente ningún polipéptido adicional.

Variantes de los polipéptidos de SEQ ID NOS: 1 a 80 se mencionan en el presente documento. Una variante de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80 normalmente será funcional. Por funcional se indica que la variante es una que:

- (a) comprende o consiste en una secuencia que se une a la misma molécula de MHC clase II que el polipéptido correspondiente de SEQ ID NOS: 1 a 80; y/o
- (b) comprende o consiste en una secuencia que es reconocida por un linfocito T que reconoce el polipéptido correspondiente de SEQ ID NOS: 1 a 80; y/o
- 5 (c) es capaz de inducir una respuesta de fase tardía en un individuo con alergia al abedul; y/o
- (d) es capaz de tolerizar a un individuo al polipéptido correspondiente.

El reconocimiento por un linfocito T puede probarse midiendo la capacidad de un péptido o variante para inducir la proliferación de linfocitos T en una muestra de linfocitos T. La inducción de una respuesta de fase tardía también puede probarse de esta forma cuando la muestra de linfocitos T se toma de un individuo con alergia al abedul. Los métodos de prueba de la inducción de la proliferación de linfocitos T son muy conocidos en la técnica y un método tal se ejemplifica en el Ejemplo 8.

Las variantes de SEQ ID NOS: 1 a 80 pueden ser fragmentos derivados por truncación, por ejemplo, por eliminación de uno o más aminoácidos de los extremos N y/o C de un polipéptido. Los fragmentos también pueden generarse por una o más deleciones internas, a condición de que los aminoácidos del núcleo 9 que constituye el epítipo de linfocito T no estén sustancialmente bloqueados.

Por ejemplo, una variante de SEQ ID NO: 1 puede comprender un fragmento de SEQ ID NO: 1, es decir, una secuencia más corta. Esto puede incluir una deleción de uno, dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo N de SEQ ID NO: 1 o del extremo C de SEQ ID NO: 1. Tales deleciones pueden hacerse desde ambos extremos de SEQ ID NO: 1.

Una variante de SEQ ID NO: 1 puede incluir aminoácidos adicionales (por ejemplo, de la secuencia de la proteína parental de la que se deriva el péptido) que se extienden más allá del (de los) extremo(s) de SEQ ID NO: 1. Una variante de un polipéptido puede ser normalmente un polipéptido más largo de hasta 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos de longitud que comprende la secuencia de el polipéptido correspondiente de SEQ ID NOS: 1 a 80.

Una variante puede incluir una combinación de las deleciones y adiciones tratadas anteriormente. Por ejemplo, los aminoácidos pueden deleccionarse de un extremo de SEQ ID NO: 1, pero aminoácidos adicionales de la secuencia de proteínas parental de longitud completa pueden añadirse al otro extremo de SEQ ID NO: 1. La misma discusión de variantes anterior también se aplica a SEQ ID NOS: 2 a 80.

Una variante puede ser alternativamente un polipéptido de 9 a 20 aminoácidos de longitud que comprende una secuencia que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencias con la secuencia del polipéptido correspondiente de SEQ ID NOS: 1 a 80. Más preferentemente, una variante adecuada puede comprender al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 98 % de identidad de aminoácidos con el polipéptido correspondiente de SEQ ID NOS: 1 a 80.

Una variante puede ser un polipéptido de longitud 9 a 20 aminoácidos que comprende una secuencia de, o una secuencia que tiene, al menos el 85 % de identidad de secuencias con al menos 9 (por ejemplo, al menos 10, 11, 12 o 13) o más aminoácidos contiguos de la secuencia del polipéptido correspondiente de SEQ ID NOS: 1 a 80. Estos aminoácidos contiguos pueden normalmente comprender un epítipo de MHC clase II, por ejemplo, que se une a cualquiera de las moléculas de MHC mencionadas en el presente documento.

Un péptido de variante puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80 o un fragmento de la misma. Un péptido de variante puede comprender secuencia que tiene al menos el 85 % de identidad de secuencias con al menos 9 o más aminoácidos contiguos en cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80. Más preferentemente, una variante adecuada puede comprender al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 98 % de identidad de aminoácidos con al menos 9 aminoácidos contiguos de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80. Este nivel de identidad de aminoácidos puede observarse en cualquier sección del péptido, aunque es preferentemente la región de núcleo. El nivel de identidad de aminoácidos es superior a al menos 9 aminoácidos contiguos, pero puede ser al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15 o al menos 16 o 17 aminoácidos, dependiendo del tamaño de los péptidos de comparación. Por consiguiente, cualquiera de los niveles de identidad anteriormente especificados puede ser a través de la longitud entera de secuencia.

A propósito de secuencias de aminoácidos, "identidad de secuencias" se refiere a secuencias que tienen el valor establecido cuando se evalúan usando ClustalW (Thompson et al., 1994, arriba) con los siguientes parámetros:

Método de parámetros de alineamiento por pares: preciso, Matriz: PAM, Penalización por abertura de hueco: 10,00, Penalización por extensión de hueco: 0,10; Matriz de parámetros de múltiples alineamientos: PAM, Penalización por abertura de hueco: 10,00, % de identidad por retraso: 30, Penalizar huecos terminales: activo, Distancia de separación de huecos: 0, Matriz negativa: no, Penalización por extensión de hueco: 0,20, Penalizaciones por huecos específicos de residuo: activo, Penalizaciones por huecos hidrófilos: activo, Residuos hidrófilos: GPSNDQEKR. Identidad de secuencias en un residuo particular pretende incluir residuos idénticos que

se han derivatizado simplemente.

Un péptido de variante puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o más, o hasta 10 sustituciones de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80. Las variantes de sustitución implican preferentemente la sustitución de uno o más aminoácidos con el mismo número de aminoácidos y hacer sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, un aminoácido puede estar sustituido con un aminoácido alternativo que tiene propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20 aminoácidos principales que pueden usarse para seleccionar sustituyentes adecuados son las siguientes:

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

Variantes adicionales incluyen aquellas en las que, en lugar del aminoácido que existe de forma natural, el aminoácido que aparece en la secuencia es un análogo estructural del mismo. Los aminoácidos usados en las secuencias también pueden modificarse, por ejemplo, marcarse, siempre que la función del péptido no se vea significativamente adversamente afectada.

Si el péptido tiene una secuencia que varía de la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80 o un fragmento de la misma, las sustituciones pueden producirse a través de la longitud completa de la secuencia, dentro de la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80, o fuera de la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80. Por ejemplo, las variaciones descritas en el presente documento, tales como adiciones, deleciones, sustituciones y modificaciones, pueden producirse dentro de la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80. Un péptido de variante puede comprender o consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80 en la que se han hecho una, dos, tres, cuatro o más sustituciones de aminoácidos. Un péptido de variante puede comprender un fragmento de la proteína parental que es más grande que cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80. En esta realización, las variaciones descritas en el presente documento, tales como sustituciones y modificaciones, pueden producirse dentro y/o fuera de la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80. Por ejemplo, uno o más residuos positivamente cargados pueden añadirse en el extremo N y/o C de la secuencia nativa del péptido de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80.

Los péptidos de variante de la invención tienen hasta 20 o 9 a 20 aminoácidos de longitud, ambos incluidos. Preferentemente, pueden ser 13 a 17 aminoácidos de longitud. Los péptidos pueden tener la misma longitud que las secuencias de péptidos en una cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80.

Los péptidos pueden derivarse químicamente del alérgeno de polipéptido, por ejemplo, por escisión proteolítica o pueden derivarse en un sentido intelectual del alérgeno de polipéptido, por ejemplo, haciendo uso de la secuencia de aminoácidos del alérgeno de polipéptido y sintetizando péptidos basados en la secuencia. Los péptidos pueden sintetizarse usando métodos muy conocidos en la técnica.

El término "péptido" incluye no solo moléculas en las que residuos de aminoácidos se unen por enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino también moléculas en las que el enlace peptídico se invierte. Tales peptidomiméticos retro-inversos pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como aquellos descritos en Meziere et al (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Este enfoque implica preparar pseudopéptidos que contienen cambios que implican el esqueleto, y no la orientación de cadenas laterales. Meziere et al (1997) muestran que, al menos para respuestas de MHC clase II y de linfocitos T cooperadores, estos pseudopéptidos son útiles. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Similarmente, el enlace peptídico puede suministrarse completamente, siempre que se use un resto conector apropiado que retiene la separación entre los átomos de carbono de los residuos de aminoácidos; se prefiere particularmente si el resto conector tiene sustancialmente la misma distribución de carga y sustancialmente la misma planaridad que un enlace peptídico. También se apreciará que el péptido pueda bloquearse convenientemente en su extremo N o C para ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exoproteolítica. Por ejemplo, el grupo amino del extremo N de los péptidos puede protegerse haciéndolo reaccionar con un ácido carboxílico y el grupo carboxilo del extremo C del péptido puede protegerse haciéndolo reaccionar con una amina. Otros ejemplos de modificaciones

incluyen glucosilación y fosforilación. Otra posible modificación es que los hidrógenos sobre las aminas de cadena lateral de R o K puedan sustituirse con grupos metileno (-NH₂ → -NH(Me) o -N(Me)₂).

5 Análogos de péptidos según la invención también pueden incluir variantes de péptido que aumentan o disminuyen la semivida del péptido *in vivo*. Ejemplos de análogos capaces de aumentar la semivida de péptidos usados según la invención incluyen análogos peptoides de los péptidos, derivados de D-aminoácido de los péptidos, e híbridos de péptido-peptóide. Otra realización de los polipéptidos de variante usada según la invención comprende formas de D-aminoácido del polipéptido. La preparación de polipéptidos usando D-aminoácidos de vez de L-aminoácidos disminuye enormemente cualquier rotura no deseada de un agente tal por procesos metabólicos normales, 10 disminuyendo las cantidades de agente que necesitan administrarse, junto con la frecuencia de su administración.

Los péptidos proporcionados por la presente invención pueden derivarse de variantes de corte y empalme de las proteínas parentales codificadas por ARNm generado por corte y empalme alternativo de los transcritos primarios que codifican las cadenas parentales de proteína. Los péptidos también pueden derivarse de mutantes de aminoácido, variantes de glucosilación y otros derivados covalentes de las proteínas parentales que retienen al 15 menos una propiedad de unión al MHC de los alérgenos. Derivados a modo de ejemplo incluyen moléculas en las que los péptidos de la invención se modifican covalentemente por sustitución, medios químicos, enzimáticos, u otros medios apropiados, con un resto distinto de un aminoácido que existe de forma natural. Adicionalmente se incluyen variantes que existen de forma natural de las proteínas parentales encontradas en diferentes ácaros. Una variante tal puede codificarse por una variante alélica o representar una variante de corte y empalme alternativa.

Las variantes, como se ha descrito anteriormente, pueden prepararse durante la síntesis del péptido o por modificación postproducción, o cuando el péptido está en forma recombinante usando las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis al azar, o escisión enzimática y/o ligación de ácidos nucleicos. 25

En cualquiera de las realizaciones de la invención, ejemplos típicos de variantes como se describen en el presente documento puede ser del siguiente modo:

- 30 - una variante de Bir01I es Bir01F (FNYETEATSVIPAARK), Bir01G (FNYEIEATSVIPAARK) o Bir01H (FNYEIEATSVIPAARK); y/o
- una variante de Bir02J es Bir02E (PAARLFKAFILEGDTLIPK), Bir02G (PAARLFKAFILEGDNLIPK), Bir02I (PAARMFKAFILD) o Bir02D (PAARMFKAFILDGDKLVK); y/o
- una variante de Bir09 está seleccionada de Bir09A (GETLLRAVESYLLAHS), Bir09B (KEMGETLLRAVESYLLAHS) o Bir09C (KEKGETLLRAVESYLLAHS); y/o
- 35 - una variante de Bir16A es Bir16B (AERERIFKRFDAGGEGK).

Se entenderá que SEQ ID NOS: 1 a 80 son secuencias de polipéptidos que comprenden un epítipo de linfocito T que consiste en un núcleo de normalmente 9 aminoácidos, que son la secuencia mínima esencial requerida para la unión a MHC clase II. Sin embargo, los polipéptidos de SEQ ID NOS: 1 a 80 también pueden comprender residuos 40 adicionales que flanquean el núcleo. Los péptidos pueden, por tanto, comprender una región que contiene un epítipo de linfocito T, en el que algunos residuos pueden modificarse sin afectar la función del epítipo. Así, por ejemplo, las secuencias de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80 pueden alterarse para mejorar sus solubilidad, y por consiguiente una variante de cualquiera de SEQ ID NOS: 1 a 80 será preferentemente más soluble que el polipéptido correspondiente de SEQ ID NOS: 1 a 80 bajo condiciones equivalentes. Métodos de evaluación de la solubilidad de péptidos son muy conocidos en la técnica y un método tal se ejemplifica en el Ejemplo 9. 45

La solubilidad mejorada es ventajosa para la tolerización de sujetos a alérgenos de los que se derivan los péptidos de la invención, ya que la administración de agentes poco solubles a sujetos produce respuestas inflamatorias no tolerizantes no deseables. La solubilidad de los péptidos puede mejorarse alterando los residuos que flanquean la 50 región que contiene un epítipo de linfocito T. Un péptido de la divulgación puede manipularse para ser más soluble de forma que comprenda:

- i) extremo N a los residuos del péptido que flanquean un epítipo de linfocito T: uno a seis aminoácidos contiguos correspondientes a los uno a seis aminoácidos contiguos inmediatamente al extremo N a dichos residuos en la 55 secuencia de la proteína de la que se deriva el péptido; y/o
- ii) extremo C a los residuos del péptido que flanquean un epítipo de linfocito T: uno a seis aminoácidos contiguos correspondientes a los uno a seis aminoácidos contiguos inmediatamente al extremo C a dichos residuos en la secuencia de la proteína de la que se deriva el péptido; o
- iii) tanto extremo N como C a los residuos del péptido que flanquean un epítipo de linfocito T, al menos un 60 aminoácido seleccionado de arginina, lisina, histidina, glutamato y aspartato.

Opcionalmente, los péptidos pueden manipularse adicionalmente para ser más solubles de forma que:

- i) cualquier residuo de cisteína en la secuencia nativa del péptido se sustituya por serina o ácido 2-aminobutírico; 65 y/o
- ii) cualquier residuo hidrófobo en los hasta tres aminoácidos en el extremo N o C de la secuencia nativa del

péptido, que no están comprendidos en un epítope de linfocito T, se delecione; y/o

iii) cualesquiera dos aminoácidos consecutivos que comprenden la secuencia Asp-Gly en los hasta cuatro aminoácidos en el extremo N o extremo C de la secuencia nativa del péptido, que no están comprendidos en un epítope de linfocito T, se delecionen; y/o

5 iv) uno o más residuos positivamente cargados se añadan al extremo N y/o C de la secuencia nativa del péptido.

Preferentemente, los péptidos y variantes de la invención son capaces de causar la proliferación de linfocitos T en al menos el 20 % de las muestras de linfocitos T, en los que cada muestra se obtiene de diferentes individuos alérgicos al abedul en la población. Las composiciones de la invención son preferentemente capaces de inducir la proliferación de linfocitos T en el 30 % o más de muestras de linfocitos T obtenidas de un panel de individuos alérgicos al abedul. Más preferentemente, las composiciones son capaces de inducir la proliferación de linfocitos T en el 35 % o más, 40 % o más, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o 90 % o más de muestras obtenidas de individuos sensibilizados en un panel. El número de individuos en un panel de individuos alérgicos al abedul puede ser cualquier número superior a uno, por ejemplo, al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 80, o al menos 100 individuos.

Se prefiere si los péptidos, variantes y composiciones de la invención producen la proliferación de linfocitos T, pero no conducen a la liberación de histamina de basófilos enriquecidos o preparaciones de mastocitos de un individuo sensibilizado. Puede haber algo de liberación de histamina, pero preferentemente los péptidos, variantes y composiciones no producen cantidades significativas de histamina para ser liberadas. La significativa liberación de histamina puede considerarse que es la liberación del 20 % o más de la histamina leucocítica disponible total cuando una muestra de leucocitos de un individuo se estimula con una composición *in vitro*. Un péptido, variante o composición de la invención produce preferentemente la liberación de menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 % de la histamina leucocítica disponible total cuando una muestra de leucocitos de un individuo se estimula con una composición *in vitro*. Un individuo normal normalmente tiene un contenido de histamina leucocítica aproximada de $150 \text{ ng}/10^7$ células.

Péptidos adecuados o variantes capaces de unirse a TCR pueden derivarse empíricamente o seleccionarse según criterios conocidos. Dentro de un único péptido hay ciertos residuos que contribuyen a la unión dentro de la ranura de unión al antígeno de MHC y otros residuos que interaccionan con regiones hipervariables del receptor de linfocitos T (Allen et al (1987) Nature 327: 713-5).

Dentro de los residuos que contribuyen a la interacción del receptor de linfocitos T, se ha demostrado una jerarquía que se refiere a la dependencia de la activación de linfocitos T tras la sustitución de un residuo de péptido dado. Usando péptidos que han tenido uno o más residuos de contacto del receptor de linfocitos T sustituidos con un aminoácido diferente, varios grupos han demostrado profundos efectos en el proceso de activación de linfocitos T. Evavold & Allen (1991) Nature 252: 1308-10) demostraron la disociación de la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas. En este modelo *in vitro*, un clon de linfocito T específico para los residuos 64-76 de hemoglobina (en el contexto de I-E^k) se expuso a un análogo de péptido en el que se había hecho una sustitución conservativa de ácido aspártico por ácido glutámico. Esta sustitución no interfirió significativamente con la capacidad del análogo para unirse a I-E^k.

Tras la exposición *in vitro* de un clon de linfocito T a este análogo, no se detectó proliferación, aunque se mantuvo la secreción de IL-4, ya que era la capacidad del clon ayudar en las respuestas de linfocitos B. En un estudio posterior el mismo grupo demostró la separación de la citólisis mediada por linfocitos T de la producción de citocinas. En este caso, el primero permaneció sin alterar, mientras que el último se alteró. La eficacia de ligandos de péptido alterados *in vivo* se demostró inicialmente en un modelo murino de EAE (encefalomielitís alérgica experimental) por McDevitt y colaboradores (Smilek et al (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88 : 9633-9637). En este modelo, la EAE se induce por inmunización con el péptido encefalitogénico Ac1-11 de la MBP (proteína básica de mielina). La sustitución en la posición cuatro (lisina) con un residuo de alanina generó un péptido que se unió bien a su elemento de restricción (A α ^UA β ^H), pero que era no inmunogénico en la cepa PL/JxSJLF1 susceptible y que, además, previno la aparición de EAE cuando se administra tanto antes como después de la inmunización con el péptido encefalitogénico. Así, pueden identificarse residuos en péptidos que afectan la capacidad de los péptidos para inducir diversas funciones de linfocitos T.

Ventajosamente, pueden diseñarse péptidos para favorecer la proliferación de linfocitos T y la inducción de desensibilización. Metzler y Wraith han demostrado capacidad tolerogénica mejorada de péptidos en los que se han hecho sustituciones que aumentan la afinidad péptido-MHC (Metzler & Wraith (1993) Int Immunol ~ : 1159-65). Que un ligando de péptido alterado pueda producir anergia a largo plazo y profunda en linfocitos T clonados se demostró por Sloan-Lancaster et al (1993) Nature 363: 156-9.

Las composiciones de la invención son capaces de inducir una respuesta de fase tardía en un individuo que está sensibilizado a los alérgenos. El término "respuesta de fase tardía" incluye el significado que se expone en Allergy and Allergic Diseases (1997) A. B. Kay (Ed.), Blackwell Science, pp 1113-1130. La respuesta de fase tardía puede ser cualquier respuesta de fase tardía (LPR). Preferentemente, los péptidos son capaces de inducir una respuesta asmática tardía (LAR) o una respuesta rinitica tardía, o una respuesta de la piel de la fase tardía o una respuesta

ocular de fase tardía. Si un péptido particular puede dar lugar o no a una LPR puede determinarse usando métodos muy conocidos en la técnica; un método particularmente preferido es el descrito en Cromwell O, Durham SR, Shaw RJ, Mackay J y Kay AB. Provocation tests and measurements of mediators from mast cells and basophils in asthma and allergic rhinitis. En: Handbook of Experimental Immunology (4) Chapter 127, Editor: Weir DM, Blackwell Scientific Publications, 1986.

Así, preferentemente, los péptidos individuales y variantes de la invención son capaces de inducir una LPR en un individuo que se ha sensibilizado a los alérgenos. Si un individuo se ha sensibilizado o no a los alérgenos puede determinarse por procedimientos muy conocidos tales como la prueba de pinchazo de la piel con disoluciones de extractos de alérgeno, inducción de LPR cutáneas, historia clínica, exposición a alérgenos y prueba radioalergosorbente (RAST) para la medición de IgE específica de alérgeno. Si se espera que un individuo particular se beneficie o no del tratamiento puede determinarse por el médico basándose, por ejemplo, en tales pruebas.

Desensibilizar o tolerizar un individuo a los alérgenos significa la inhibición o disminución de las reacción de tejido alérgico inducidas por los alérgenos en individuos apropiadamente sensibilizados. Se ha mostrado que los linfocitos T pueden activarse selectivamente, y luego volverse insensibles. Además, la anergización o eliminación de estos linfocitos T conduce a desensibilización del paciente para un alérgeno particular. La desensibilización se manifiesta a sí misma como una reducción en la respuesta a un alérgeno o péptido derivado de alérgeno, o preferentemente una eliminación de una respuesta tal, en una segunda administración y administraciones adicionales del alérgeno o péptido derivado de alérgeno. La segunda administración puede hacerse después de transcurrir un periodo de tiempo adecuado para permitir que se produzca la desensibilización; esto es preferentemente cualquier periodo entre un día y varias semanas. Se prefiere un intervalo de aproximadamente dos semanas.

Aunque las composiciones de la invención son capaces de inducir una LPR en un individuo alérgico al abedul, debe apreciarse que cuando una composición se usa para tratar un paciente es preferible que se use una concentración suficientemente baja de la composición de forma que no se produzca LPR observable, pero la respuesta sea suficiente para desensibilizar parcialmente los linfocitos T de forma que pueda administrarse la siguiente dosis (preferentemente mayor), etc. De esta forma, la dosis se construye para dar desensibilización completa, pero frecuentemente sin inducir una LPR en el paciente. No obstante, la composición o péptido es capaz de hacer esto a una concentración mayor de la que se administra.

Las composiciones de la invención son preferentemente capaces de inducir una respuesta de fase tardía en el 50 % o más de un panel de individuos de la población alérgicos al abedul. Más preferentemente, las composiciones son capaces de inducir una LPR en el 55 % o más, el 60 % o más, el 65 % o más, el 70 % o más, el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, o el 90 % o más de individuos sensibilizados en un panel. Si las composiciones son capaces de inducir o no una LPR en un cierto porcentaje de un panel de sujetos puede determinarse por métodos que son muy conocidos en la técnica.

Los polipéptidos de la invención pueden estar presentes en una forma sustancialmente aislada. Pueden mezclarse con vehículos o diluyentes que no interferirán con su uso previsto y todavía se considerarán sustancialmente aislados. También pueden estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso generalmente comprenderán al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 %, 98 % o 99 %, de las proteínas o masa seca de la preparación.

45 *Formulación y composiciones*

Los péptidos de la invención pueden proporcionarse a un individuo tanto individualmente como en combinación. Cada molécula de la invención puede proporcionarse a un individuo en una forma aislada, sustancialmente aislada, purificada o sustancialmente purificada. Por ejemplo, un péptido de la invención puede proporcionarse a un individuo sustancialmente libre de los otros péptidos. Alternativamente, cuatro o más péptidos en la composición pueden acoplarse químicamente juntos, usando reactivos de acoplamiento de péptidos estándar, para proporcionar un único péptido que contiene los epítopes preferidos. Tales péptidos se cribarían para la liberación de histamina de basófilos para confirmar la ausencia de liberación de histamina según los péptidos individuales. En otra realización, cuatro o más péptidos en la composición pueden proporcionarse como parte de una única cadena de polipéptidos, es decir, por medios recombinantes de un polinucleótido codificante. Los cuatro o más péptidos pueden fusionarse contiguamente, o pueden separarse alternativamente por conectores apropiados.

Aunque puede ser posible que los péptidos o composiciones según la invención se presenten en forma bruta, es preferible presentarlos como una formulación farmacéutica. Así, según otro aspecto de la invención, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica para su uso en prevenir o tratar alergia al abedul por tolerización que comprende una composición según la invención junto con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente uno o varios de otros componentes terapéuticos. El (Los) vehículo(s) debe(n) ser 'aceptable(s)' en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de la misma. Normalmente, los vehículos para inyección, y la formulación final, son estériles y libres de pirógenos. Preferentemente, el vehículo o diluyente es tioglicerol o tianisol.

La formulación de una composición que comprende el péptido de la invención puede llevarse a cabo usando químicas de formulación farmacéutica estándar y metodologías, todas las cuales están fácilmente disponibles para el experto.

5 Por ejemplo, las composiciones que contienen una o más moléculas de la invención pueden combinarse con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH, y similares, pueden estar presentes en el excipiente o vehículo. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares son generalmente agentes farmacéuticos que no inducen una respuesta inmunitaria en el individuo que recibe la composición, y que pueden administrarse sin
10 excesiva toxicidad. Excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol, tioglicerol y etanol. Sales farmacéuticamente aceptables también pueden incluirse en su interior, por ejemplo, sales de ácido mineral tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Una discusión rigurosa de excipientes farmacéuticamente aceptables, vehículos y
15 sustancias auxiliares está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Tales composiciones pueden prepararse, envasarse o comercializarse en una forma adecuada para administración por bolo o para administración continua. Las composiciones inyectables pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en recipientes de multi-dosis que
20 contienen un conservante. Las composiciones incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, pastas, y formulaciones de liberación sostenida o biodegradables implantables. Tales composiciones pueden comprender además uno o más componentes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una realización de una composición para administración parenteral, el principio activo se proporciona en forma seca (para, por ejemplo, un polvo o
25 gránulos) para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma de una suspensión o disolución acuosa o aceitosa inyectable estéril. Esta suspensión o disolución puede formularse según la técnica conocida, y puede comprender, además del principio activo, componentes adicionales tales como los agentes dispersantes, agentes humectantes o agentes de
30 suspensión descritos en el presente documento. Tales formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, disolución de Ringer, solución isotónica de cloruro sódico y aceites no volátiles tales como mono- o di-glicéridos sintéticos.

35 Otras composiciones parenteralmente administrables que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposómica, o como un componente de un sistema de polímeros biodegradable. Composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero moderadamente soluble, o una sal moderadamente soluble.

40 Alternativamente, los péptidos de la presente invención pueden encapsularse, adsorberse a, o asociarse a, vehículos en partículas. Vehículos en partículas adecuados incluyen aquellos derivados de polímeros de poli(metacrilato de metilo), además de micropartículas de PLG derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolidas). Véase, por ejemplo, Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10:362-368. También pueden usarse otros sistemas en
45 partículas y polímeros, por ejemplo, polímeros tales como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, además de conjugados de estas moléculas.

La formulación de cualquiera de los péptidos mencionados en el presente documento dependerá de factores tales como la naturaleza de la sustancia y el método de administración. Cualquier sustancia tal puede administrarse en
50 una variedad de formas de dosificación. Puede administrarse por vía oral (por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas o aceitosas, polvos o gránulos dispersables), tópicamente, parenteralmente, subcutáneamente, por inhalación, intravenosamente, intramuscularmente, intraesternalmente, transdérmicamente, intradérmicamente, sublingualmente, intranasalmente, bucalmente o por técnicas de infusión. La sustancia también puede administrarse como supositorios. Un médico será capaz de determinar la vía de
55 administración requerida para cada individuo particular.

Las composiciones de formulaciones de la invención comprenderán una concentración adecuada de cada péptido por ser eficaz sin causar reacción adversa. Normalmente, la concentración de cada péptido en la composición estará en el intervalo de 0,03 a 200 nmol/ml, más preferentemente en el intervalo de 0,3 a 200 nmol/ml, 50 a 200 nmol/ml o
60 30 a 120 nmol/ml. La composición o formulaciones deben tener una pureza superior al 95 % o 98 % o una pureza de al menos el 99 %.

En un aspecto de la invención puede usarse un adyuvante en combinación con los polipéptidos de la invención. El adyuvante se administra preferentemente en una cantidad que es suficiente para aumentar el efecto de los
65 polipéptidos de la invención o viceversa. El adyuvante u otro agente terapéutico puede ser un agente que potencia los efectos de la molécula de la invención. Por ejemplo, el otro agente puede ser una molécula inmunomoduladora o

un adyuvante que potencia la respuesta al péptido o célula de la invención.

En una realización, por tanto, los péptidos o composiciones de la invención se usan para terapia en combinación con uno o varios de otros agentes terapéuticos. Los agentes pueden administrarse por separado, simultáneamente o secuencialmente. Pueden administrarse en las mismas composiciones o diferentes. Por consiguiente, en un método de la invención, el sujeto también puede tratarse con otro agente terapéutico.

Por tanto, puede formularse una composición que comprende una molécula de la invención y también una o varias de otras moléculas terapéuticas. Una composición de la invención puede usarse alternativamente simultáneamente, secuencialmente o por separado con una o varias de otras composiciones terapéuticas como parte de un tratamiento combinado.

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

Métodos terapéuticos e individuos que van a tratarse

La presente invención se refiere a péptidos que son capaces de desensibilizar o tolerizar a individuos humanos a los alérgenos descritos anteriormente y son, por tanto, útiles en la prevención o tratamiento de alergia al abedul. La invención proporciona composiciones y formulaciones para su uso en prevenir o tratar alergia al abedul por tolerización. También se desvela un método de tolerizar o desensibilizar a un individuo alérgico al abedul que comprende administrar, tanto individualmente como en combinación, los polipéptidos de la invención como se ha descrito anteriormente.

El individuo que va a tratarse o proveerse de la composición o formulación de la invención es preferentemente humano. Se apreciará que el individuo que va a tratarse puede ser conocido por estar sensibilizado a los alérgenos, en riesgo de ser sensibilizado o que se sospecha que está siendo sensibilizado. El individuo puede probarse para sensibilización usando técnicas muy conocidas en la técnica y como se describen en el presente documento. Alternativamente, el individuo puede tener una historia familiar de alergia al abedul. Puede no ser necesario probar un individuo para sensibilización al abedul debido a que el individuo puede mostrar síntomas de alergia cuando se expone al abedul. Por exposición se indica proximidad a, por ejemplo, a planta de abedul, o una sustancia o producto derivado de una planta de abedul, o una sustancia o producto que contiene o que comprende cualquiera de los anteriores. La sustancia o producto derivado de una planta de abedul normalmente es polen del abedul. Por proximidad se indica 10 metros o menos, 5 metros o menos, 2 metros o menos, 1 metro o menos, o 0 metros de los artículos descritos anteriormente. Los síntomas de alergia pueden incluir picazón en los ojos, rinorrea, dificultad al respirar, piel enrojecida con picazón o urticaria.

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

Preferentemente, el individuo que va a tratarse es una población que tiene frecuencias de alelo de MHC dentro del intervalo de frecuencias que son representativas de la población caucásica. Las frecuencias de alelo de la población de referencia para 11 familias de alelo DRB1 comunes se muestran en la Tabla 1 (Datos de HLA Facts Book, Parham and Barber).

Tabla 1

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

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

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

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

El individuo puede haber tenido alergia al abedul durante al menos 2 semanas, 1 mes, 6 meses, 1 año o 5 años. El individuo puede padecer una urticaria, congestión nasal, exudado nasal y/o tos producidos por la alergia. El individuo puede o puede no haber sido administrado con otras composiciones/compuestos que tratan alergia al abedul. El individuo puede vivir en una región geográfica que tiene:

5

- un clima templado, boreal o ártico, y/o:
- un pH de la tierra típico en el intervalo de aproximadamente 3,5, a aproximadamente 7,5.

10

El individuo normalmente padece alergia al polen del abedul en una estación particular. La estación normalmente se corresponde con la estación de florecimiento del abedul, que normalmente es la primavera, preferentemente a principios de la primavera (por ejemplo, de abril a mayor en el hemisferio norte). El individuo alérgico normalmente es alérgico al polen del abedul de cualquier árbol en el subgénero *Betula*, por ejemplo, *Betula pendula* o *Betula pubescens*.

15 *Inmunoterapia de combinación*

20

Como muchos individuos son alérgicos, o pueden requerir desensibilización a varios antígenos de polipéptido, la presente invención también proporciona medios de desensibilización de individuos que son alérgicos a múltiples antígenos. La "tolerancia" inducida en un individuo a un primer antígeno de polipéptido o alérgeno puede crear en el individuo un "entorno tolerogénico" en el que respuestas inmunitarias inapropiadas a otros antígenos pueden regularse por disminución con el fin de proporcionar tolerancia a otros antígenos.

25

Este hallazgo significa que individuos alérgicos a múltiples alérgenos pueden tratarse en un periodo de tiempo enormemente reducido, y que individuos gravemente alérgicos a algunos alérgenos (por ejemplo, cacahuetes), pero más levemente alérgicos a otros alérgenos (por ejemplo, caspa de gato), pueden beneficiarse de una terapia en la que la tolerancia al alérgeno más leve se establece y entonces este entorno tolerogénico se usa para proporcionar tolerancia al otro alérgeno más extremo. Además, los individuos que padecen un trastorno autoinmunitario que están adicionalmente sensibilizados (o de otro modo inmunes) a un antígeno o alérgeno sin relacionar pueden beneficiarse de una pauta de tratamiento en la que la tolerancia al antígeno o alérgeno no relacionado se establece primero y luego se usa este entorno tolerogénico para proporcionar tolerancia al autoantígeno asociado al trastorno autoinmunitario.

30

35

Por tanto, se proporciona un método para desensibilizar a un individuo alérgico al abedul al alérgeno del abedul como se ha descrito anteriormente y uno o más antígenos de polipéptido diferentes adicionales. El método implica, en una primera etapa, administrar al individuo una composición/formulación (composición primaria) según la invención como se describe en el presente documento y en la que la administración se lleva a cabo de un modo suficiente para generar un estado hiposensible contra el alérgeno del abedul. Una vez se ha establecido un estado hiposensible hacia el alérgeno del abedul, o se ha producido al menos un desplazamiento hacia desensibilización, el método implica la administración de una composición secundaria que comprende un segundo antígeno de polipéptido diferente al que el individuo va a sensibilizarse. La administración de la composición secundaria se lleva a cabo de tal forma que se aproveche el entorno tolerogénico establecido por el uso de la composición primaria, donde ahora es posible establecer tolerancia al segundo antígeno de polipéptido diferente. La composición secundaria se co-administra con cualquiera de la primera composición primaria o un fragmento mayor del alérgeno del abedul. Por "co-administrado" se indica tanto la administración simultánea como concurrente, por ejemplo, cuando las dos están presentes en la misma composición o se administran en composiciones separadas en casi el mismo tiempo pero en sitios diferentes, además de la administración de antígenos de polipéptido en composiciones separadas en momentos diferentes. Por ejemplo, la composición secundaria puede administrarse antes de o posterior a la administración de la primera composición en el mismo sitio o un sitio diferente. El momento exacto entre las administraciones puede oscilar de aproximadamente varios segundos separados a aproximadamente varios minutos separados, varias horas separadas, o incluso varios días separados. Además, pueden emplearse diferentes métodos de administración.

50

55

El segundo antígeno de polipéptido es preferentemente un alérgeno diferente al alérgeno del abedul. Alérgenos adecuados para su uso en los métodos de la invención pueden por supuesto obtenerse y/o producirse usando métodos conocidos. Clases de alérgenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alérgenos de los ácaros del polvo, pólenes, caspa de animal (especialmente caspa de gato), alérgenos del pasto, mohos, polvos, antibióticos, venenos de insectos picadores, y una variedad de alérgenos ambientales (incluyendo productos químicos y metales), de fármacos y alimentarios. Alérgenos de árboles comunes incluyen pólenes de algodón, madera, álamo, fresno, abedul, arce, roble, olmo, pacana, y árboles de nuez pecana; alérgenos de plantas comunes incluyen aquellos de artemisa, ambrosía, plátano inglés, acedera común y cenizo; alérgenos de contacto de plantas incluyen aquellos de roble venenoso, hiedra venenosa y ortigas; alérgenos de pasto común incluyen alérgenos de ballico, Timothy, Johnson, Bermuda, festuca y de hierba azulada; también pueden obtenerse alérgenos comunes de mohos u hongos tales como *Alternaria*, *Fusarium*, *Hormodendrum*, *Aspergillus*, *Micropolyspora*, *Mucor* y actinomicetos termófilos; pueden obtenerse alérgenos epidérmicos de polvos domésticos u orgánicos (normalmente de origen fúngico), o de fuentes de animal tales como plumas, y caspa de perro; alérgenos de alimentos comunes incluyen leche y queso (lácteos), huevo, trigo, frutos secos (por ejemplo, cacahuate), marisco (por ejemplo, moluscos),

65

guisante, judía y alérgenos del gluten; alérgenos ambientales comunes incluyen metales (níquel y oro), productos químicos (formaldehído, trinitrofenol y turpentina), alérgenos de látex, caucho, fibra (algodón o lana), yute, tinte para el pelo, cosméticos, detergentes y de perfume; alérgenos de fármaco comunes incluyen alérgenos de anestésicos locales y de salicilato; alérgenos de antibiótico incluyen alérgenos de penicilina, tetraciclina y sulfonamida; y alérgenos de insecto comunes incluyen veneno de abeja, avista y de hormiga, y alérgenos de cáliz de cucaracha. Alérgenos particularmente bien caracterizados incluyen, pero no se limitan a, el principal alérgeno del gato Fel d1, fosfolipasa de veneno de abeja A2 (PLA) (Akdis et al. (1996) J. Clin. Invest. 98:1676-1683)) y el alérgeno de pasto recombinante multi-epitópico rKBG8.3 (Cao et al. (1997) Immunology 90:46-51). Estos y otros alérgenos adecuados están comercialmente disponibles y/o pueden prepararse fácilmente como extractos siguiendo técnicas conocidas.

Preferentemente, el segundo alérgeno de polipéptido es un alérgeno del polen de árbol completo o fragmento de alérgeno seleccionado de la lista de secuencias de alérgenos y números de acceso de bases de datos (números de acceso de NCBI Entrez) a continuación. NCBI es el centro Nacional para Información Biotecnológica y es una división de los Institutos Nacionales Estadounidenses de Salud. El sitio web de NCBI, del que se puede buscar acceso a la base de datos, es www.ncbi.nlm.nih.gov/. Secuencias de alérgenos y números de acceso de base de datos (números de acceso de NCBI Entrez):

Olivo

Secuencias de olivo

416610 Ol e 1

EDIPQPPVSQFHJQGVYCDTCRAGFITELSEFIPGASLRLQCKDKENDVTFTE
 VGYTRAEGLYSMLVERDHKNEFCEITLISSGRKDCNEIPTEGWAKPSLKFKLNT
 VNGTTRTVNPLGFFKKEALPKCAQVYNKLGMYPPNM

Secuencias de alérgenos de árboles (principalmente abedul):

130975 Bet v 2

MSWQTYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDGSVWAQSSSFPQFKPQEITGIM
 KDFEEPGHLAPTGLHLGGIKYMWIQGEAGAVIRGKKGSGGITIKKTGQALVFGI
 YEVPVTPGQCNMVVERLGDYLIDQGL

1942360 Bet v 2

MSWQTYVDEHLMCDIDGQGEELAASAIVGHDGSVWAQSSSFPQFKPQEITGIM
 KDFEEPGHLAPTGLHLGGIKYMWIQGEAGAVIRGKKGSGGITIKKTGQALVFGI
 YEVPVTPGQCNMVVERLGDYLIDQGL

166953 Bet v 2

MSWQTYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDGSVWAQSSSFPQFKPQEITGIM
 KDFEEPGHLAPTGLHLGGIKYMWIQGEAGAVIRGKKGSGGITIKKTGQALVFGI
 YEVPVTPGQCNMVVERLGDYLIDQGL

541814 Bet v 2

MSWQTYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDGSVWAQSSSFPQFKPQEITGIM
 KDFEEPGHLAPTGLHLGGIKYMWIQGEAGAVIRGKKGSGGITIKKTGQALVFGI
 YEVPVTPGQCNMVVERLGDYLIDQGL

2488678 Bet v 2

MSWQTYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDGSVWAQSSSFPQFKPQEITGIM
KDFEEPGHLAPTGLHLGGIKYMVIQGEAGAVIRGKKGSGGITIKKTGQALVFGI
YEEPVTPGQCNMVVERLGDYLIDQGL

1829894 Bet v 2

MSWQTYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDGSVWAQSSSFPQFKPQEITGIM
KDFEEPGHLAPTGLHLGGIKYMVIQGEAGAVIRGKKGSGGITIKKTGQALVFGI
YEEPVTPGQCNMVVERLGDYLIDQGL

5

1168696 Bet v 3

MPCSTEAMEKAGHGHASTPRKRSLSNSSFRLRSESLNTRLRLRRIFDLFDKNSDGI
ITVDELSRALNLLGLETDLSELESTVKSFTREGNIGLQFEDFISLHQSLNDSYFAY
GGEDEDDNEEDMRKSILSQEADSFGGFKVFDEDDGDGYISARELQMVLGKLG
SEGSEIDRVEKMIVSVDSNRDGRVDFFEFKDMMRSVLRSS

10

809536 Bet v 4

MADDHPQDKAERERJFKRFDANGDGKISAAELGEALKTLGSITPDEVKHMMAE
IDTDGDGFISFQEFTDFGRANRGLLKDVAKIF

15 543675 Que a I - Quercus alba= árboles de roble (fragmento)
GVFTXESQETSVIAPAXLFKALFL

543509 Car b I - Carpinus betulus = árboles de carpe (fragmento)
GVFNIEAETPSVIPAAARLFKSYVLDGDKLIPKVAPQAIKX

20

543491 Aln g I - Alnus glutinosa = árboles de aliso (fragmento)
GVFNIEAETPSVIPAAARLFKAFILDGDKLLPKVAPEAVSSVENI

1204056 Rubisco

25

VQCMQVWPPLGLKKFETLSYLPPLSSEQLAKEVDYLLRKNLIPCLEFELEHG
YREHNRSPGYDGRYWTMWKLPFGCNDSSQVLKELEECKKAYPSAFIRIIGF
DDK

Secuencias de alérgenos de árboles adicionales (número de acceso de NCBI entrez):

30 131919; 128193; 585564; 1942360; 2554672; 2392209; 2414158; 1321728; 1321726; 1321724; 1321722;
1321720; 1321718; 1321716; 1321714; 1321712; 3015520; 2935416; 464576; 1705843; 1168701; 1168710;
1168709; 1168708; 1168707; 1168706; 1168705; 1168704; 1168703; 1168702; 1842188; 2564228; 2564226;
2564224; 2564222; 2564220; 2051993; 1813891; 1536889; 534910; 534900; 534898; 1340000; 1339998;
2149808; 66207; 2129477; 1076249; 1076247; 629480; 481805; 81443; 1361968; 1361967; 1361966;
35 1361965; 1361964; 1361963; 1361962; 1361961; 1361960; 1361959; 320546; 629483 ; 629482; 629481;
541804; 320545; 81444; 541814; 629484; 474911; 452742; 1834387; 298737; 298736; 1584322; 1584321;
584320; 1542873; 1542871; 1542869; 1542867; 1542865; 1542863; 1542861; 1542859; 1542857; 1483232;
1483230; 1483228; 558561; 551640; 488605; 452746; 452744; 452740; 452738; 452736; 452734; 452732;
452730; 452728; 450885; 17938; 17927; 17925; 17921; 297538; 510951; 289331; 289329; 166953.

40

Secuencias de cedro

Precursor de 493634 Cry j IB

MDSPCLVALLVFSFVIGSCFSDNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFSGST
 MGGKGGDLYTVTNSDDDPVNPPGTLRYGATRDRPLWIIFSGNMNIKMKMPMY
 IAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNNVIIHGLYLYGCSTSVLGNVLINESF
 GVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLTSTGVTISNNLFFN
 HHKVMSLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLVHVANN
 YDPWTIYAIGGSSNPTILSEGNSTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSCSNWVWQST
 QDVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGNATPHLTQAGVLTCSLSK
 RC

Precursor de 493632 Cry j IA

5

MDSPCLVALLVLSFVIGSCFSDNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFSGST
 MGGKGGDLYTVTNSDDDPVNPAPGTLRYGATRDRPLWIIFSGNMNIKMKMPM
 YIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNNVIIHGLHLYGCSTSVLGNVLINE
 SFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLSTGVTISNNLFF
 NHHKVMMLLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLVHVANN
 NYDPWTIYAIGGSSNPTILSEGNSTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSCSNWVWQS
 TQDVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGNATPQLTKNAGVLTCSLS
 KRC

Precursor de 1076242 Cry j II – Cedro japonés

MAMKLIAPMAFLAMQLIIMAAAEDQSAQIMLDSVVEKYLRNRSRSLRKVEHSR
 HDAINIFNVEKYGAVGDGKHDCTEAFSTAWQAACKNPSAMLLVPGSKKFVNN
 NLFNPGCQPHFTFKVDGIIAAYQNPASWKNNRWLQFAKLTGFTLMGKGVID
 GQGKQWWAGQCKWVNGREICNDRDRPTAIKFDSTGLIIQGLKLMNSPEFHLV
 FGNCEGVKIIIGISITAPRDSNPNTDGIDIFASKNFHLQKNTIGTGDDCVAIGTGSSNI
 VIEDLICGPGHGHSIGSLGRENSRAEVSYVHVNGAKFIDTQNGLRIKTWQGGSG
 MASHIYENVEMINSENPIINQFYCTSASACQNQRSVQIQDVTYKNIRGTSAT
 AAAIQLKCSDSMPCKDIKLSDISLKLTSKGKIASCLNDNANGYFSGHVIPACKNLS
 PSAKRKESKSHKHPKTVMVENMRAYDKGNRTRILLGSRPPNCTNKCHGCSPC
 KAKLVIVHRIMPQEYYPQRWICSCHGKIYHP

10

Proteína 1076241 Cry j II - Cedro japonés

MAMKFIAPMAFVAMQLIIMAAAEDQSAQIMLDSVVEKYLRNRSRSLRKVEHSRH
 DAINIFNVEKYGAVGDGKHDCTEAFSTAWQAACKKPSAMLLVPGNKKFVNN
 LFNPGCQPHFTFKVDGIIAAYQNPASWKNNRWLQFAKLTGFTLMGKGVIDG
 QGKQWWAGQCKWVNGREICNDRDRPTAIKFDSTGLIIQGLKLMNSPEFHLV
 GNCEGVKIIIGISITAPRDSNPNTDGIDIFASKNFHLQKNTIGTGDDCVAIGTGSSNI
 VIEDLICGPGHGHSIGSLGRENSRAEVSYVHVNGAKFIDTQNGLRIKTWQGGSG

MASHIYENVEMINSENPIINQFYCTASACQNQRSAVQIQDVITYKNIRGTSAT
 AAAIQLKCSDSMPCKDIKLSDISLKLTSKGKIASCLNDNANGYFSGHVIPACKNLS
 PSAKRKESKSHKHPKTVMVKNMGAYDKGNRTRILLGSRPPNCTNKCHGCSPC
 KAKLVIVHRIMPQEYYPQRWMC SRHGKIYHP

Precursor de 541803 Cry j I - Cedro japonés

MDSPCLVALLVLSFVIGSCFSDNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFGSST
 MGGKGGDLYTVTNSDDDPVNPPGTLRYGATRDRPLWIIFSGNMNIKLKMPMY
 IAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVS NVIIHGLHLYGCSTSVLGNVLINESF
 GVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLSTGTISNNLFFN
 HHKVMMLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLVHVANN
 YDPWTIYAIGGSSNPTILSEGNSTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSCSNWVWQST
 QDVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGNATPQLTKNAGVLTCSLSK

5 RC

Precursor de 541802 Cry j I - Cedro japonés

MDSPCLVALLVFSFVIGSCFSDNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFGSST
 MGGKGGDLYTVTNSDDDPVNPAPGTLRYGATRDRPLWIIFSGNMNIKLKMPM
 YIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVS NVIIHGLYLYGCSTSVLGNVLINE
 SFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLTSTGTISNNLF
 FNHHKVMMLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLVHVAN
 NNYDPWTIYAIGGSSNPTILSEGNSTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSCSNWVW
 QSTQDVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGNATPHLTQNAGVLTCS
 LSKRC

10 *Métodos de administración*

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse a un sujeto *in vivo* usando una
 15 variedad de vías y técnicas conocidas. Por ejemplo, una composición puede proporcionarse como una disolución
 inyectable, suspensión o emulsión y administrarse por inyección parenteral, subcutánea, epidérmica, intradérmica,
 intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intravenosa usando una aguja y jeringa convencionales, o usando un
 sistema de inyección de chorro de líquido, o usando un parche. Las composiciones también pueden administrarse
 20 tópicamente a la piel o tejido mucoso, tal como nasalmente, intratraquealmente, intestinal, rectalmente o
 vaginalmente, o proporcionarse como un espray finamente dividido adecuado para administración respiratoria o
 pulmonar. Otros modos de administración incluyen administración por vía oral, supositorios, administración
 sublingual, y técnicas transdérmicas de administración activa o pasiva.

Si un péptido de la invención va a administrarse, se prefiere administrar el péptido a un sitio en el cuerpo en el que
 25 tendrá la capacidad de ponerse en contacto con células presentadoras de antígeno adecuadas, y en el que él, o
 ellos, tendrán la oportunidad de ponerse en contacto con linfocitos T del individuo.

Pautas de administración

La administración de los péptidos (tal como la composición que contiene una pluralidad de péptidos) puede ser por
 30 cualquier método adecuado como se ha descrito anteriormente. Cantidades adecuadas del péptido pueden
 determinarse empíricamente, pero normalmente están en el intervalo dado más adelante. Una única administración
 de cada péptido puede ser suficiente para tener un efecto beneficioso para el paciente, pero se apreciará que puede
 ser beneficiosa si el péptido se administra más de una vez, en cuyo caso pautas de administración típicas pueden
 35 ser, por ejemplo, una vez o dos veces a la semana durante 2-4 semanas cada 6 meses, o una vez al día durante
 una semana cada cuatro a seis meses. Como se apreciará, cada péptido o combinación de péptidos puede

administrarse a un paciente individualmente o en combinación.

5 Dosificaciones para administración dependerán de varios factores que incluyen la naturaleza de la composición, la vía de administración y el programa y el momento exacto de la pauta de administración. Dosis adecuadas de una molécula de la invención pueden estar en el orden de hasta 15 µg, hasta 20 µg, hasta 25 µg, hasta 30 µg, hasta 50 µg, hasta 100 µg, hasta 500 µg o más por administración. Dosis adecuadas pueden ser inferiores a 15 µg, pero al menos 1 ng, o al menos 2 ng, o al menos 5 ng, o al menos 50 ng, o al menos 100 ng, o al menos 500 ng, o al menos 1 µg, o al menos 10 µg. Para algunas moléculas de la invención, la dosis usada puede ser superior, por ejemplo, hasta 1 mg, hasta 2 mg, hasta 3 mg, hasta 4 mg, hasta 5 mg o mayor. Tales dosis pueden proporcionarse en una formulación líquida, a una concentración adecuada para permitir un volumen apropiado para administración por la vía seleccionada.

Kits

15 La presente divulgación también se refiere a una combinación de componentes descrita en el presente documento adecuada para su uso en un tratamiento de la invención que están envasados en forma de un kit en un recipiente. Tales kits pueden comprender una serie de componentes para permitir un tratamiento de la invención. Por ejemplo, un kit puede comprender uno o más péptidos diferentes de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales adecuados para administración simultánea, o para administración secuencial o separada. El kit puede contener opcionalmente otro(s) reactivo(s) adecuado(s) o instrucciones y similares.

La invención se ilustra por los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

25 *Búsqueda de unión a MHC clase II*

30 El objetivo de este estudio es identificar un panel distinto de péptidos con fuertes afinidades por los ocho alotipos HLA-DRB1* de MHC clase II humanos más comunes. Con el fin de identificar péptidos de unión en los principales alérgenos del abedul Bet v1, Bet v2, Bet v3, Bet v4, Bet v6, se llevó a cabo un enfoque informático usando el algoritmo EpiMatrix comercialmente disponible (EpiVax Inc.) Éste es un análisis bioinformático de péptidos de una secuencia para la posibilidad de ser acomodados dentro de la ranura de unión de moléculas HLA-DR de MHC clase II.

35 EpiMatrix es un algoritmo basado en matriz que clasifica 9 secuencias de residuos de aminoácido, solapando 8 aminoácidos, de cualquier secuencia de polipéptidos por probabilidad estimada de unión a cada una de las moléculas de MHC seleccionadas. (De Groot et al., AIDS Research and Human Retroviruses 13:539-41 (1997). El procedimiento de desarrollo de motivos de matriz se publicó por Schafer et al, Vaccine 16:1880-4 (1998). En este ejemplo se evalúan las posibilidades de unión de HLA DR1, DR3, DR4, DR7, DR8, DR11, DR13 y DR15. Los supuestos ligandos de MHC se seleccionan puntuando cada marco 9-mero en una secuencia de proteínas. Esta puntuación se deriva comparando la secuencia del 9-mero con la matriz de secuencias de aminoácidos conocida por unirse a cada alelo de MHC. Estudios retrospectivos han demostrado que EpiMatrix predice con exactitud ligandos de MHC publicados (Jesdale et al., en Vaccines '97 (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997)). También se ha confirmado la predicción satisfactoria de péptidos que se unen a múltiples moléculas de MHC.

45 Los datos de EpiMatrix para cada alérgeno se muestran ya sea:

50 Como datos de péptidos 9-meros solapantes con la puntuación de unión (Z) para cada alelo y el número de 'éxitos' para los ocho alelos (puntuaciones Z de igual a o superior al 5 % superior de los ligantes predichos): o

55 Como un informe agrupado en el que los datos de analizar múltiples secuencias de la base de datos están 'agrupados' para dar una visión general de la unión para todas las variantes de la proteína. "Éxitos de EpiMatrix" se refiere al número de puntuaciones de unión Z predichas altas para los ocho alelos dentro de esa secuencia mientras la "Puntuación de agrupación de EpiMatrix" se deriva del número de éxitos normalizados para la longitud de la agrupación. La puntuación de agrupación es así el exceso o la falta en propiedades de unión de MHC agregado predicho con respecto a un patrón de péptido aleatorio. Una puntuación de agrupación superior a 10 se considera que indica amplias propiedades de unión de MHC.

60 Los análisis EpiMatrix se realizaron en las secuencias enteras de isoformas conocidas de Bet v1, enumeradas a continuación con sus números de acceso NCBI correspondientes:

| | | | |
|------------|---------|------------|---------|
| Bet v1 L | P43185; | Bet v1 E | P43178; |
| Bet v1 M/N | P43186; | Bet v1 D/H | P43177; |
| Betv1 K | P43184; | Bet v1 C | P43176; |
| Bet v1 J | P43183; | Bet v1 B | P45431; |

ES 2 573 651 T3

Bet v1 G P43180; Bet v1 A P15494;
Bet v1 F/I P43179;

Los análisis EpiMatrix también se realizaron en secuencias de Bet v1 conocidas adicionales indexadas por el número de acceso en la Tabla 2.

5 Estos análisis identificaron péptidos del núcleo (y sus secuencias flanqueantes) derivados de las secuencias anteriores que se predice que tienen buena unión a MHC clase II. Estas secuencias se muestran a continuación en las Tablas 1 y 2. Como se muestra, muchos de los péptidos identificados están altamente conservados entre diferentes isoformas de Bet v1.

10 En las Tablas 1 y 2:

“Residuos en la secuencia principal” da la localización del péptido dentro de las secuencias que se analizaron. El péptido de núcleo (aminoácidos centrales subrayados en negrita) define la secuencia de unión real que se identificó durante el análisis. Los flancos estabilizantes (extremo N y extremo C, no en negrita) se incluyeron para su uso con la secuencia de núcleo y normalmente se requieren para ayudar en la fabricación de los péptidos. “Número de éxitos” se refiere al número de afinidades de unión predichas altas para todos los tipos de MHC probados dentro de la secuencia. La “Puntuación de agrupación de EpiMatrix” se deriva del número de éxitos normalizados para la longitud de la agrupación. Puntuación de agrupación es así el exceso o la falta en propiedades de unión de MHC agregado predicho con respecto a un patrón de péptido aleatorio. Una puntuación superior a 10 se considera que indica amplias propiedades de unión de MHC.

Tabla 1 - Bet v1

| SECUENCIA DE ENTRADA | RESIDUOS EN LA SECUENCIA (Incl. FLANCOS) | SECUENCIA | Hidrofobia | ÉXITOS DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | PUNTUACIÓN DE AGRUPACIÓN DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | Péptido ID NO | SEQ ID NO |
|----------------------|--|----------------------|------------|------------------------------------|--|---------------|-----------|
| P43185 | 13-28 | VIPAARMFKAFILDGD | 0,78 | 6 | 11,3 | P1 | 1 |
| P15494 | 100 - 114 | SNEIKIVATPDGGS | 0,03 | 7 | 15,57 | P2 | 2 |
| P43176 | 100-114 | CNEIKIVATPDGGS | 0,25 | 7 | 15,57 | P3 | 3 |
| P43177 | 100 - 114 | SNEIKIVATPDGGS | 0,23 | 7 | 15,57 | P4 | 4 |
| P43178 | 100 - 116 | SNEIKIVATPDGGS | 0,02 | 10 | 20,13 | P5 | 5 |
| P43179 | 100 - 116 | SNEIKIVATPDGGS | 0,02 | 10 | 20,13 | P6 | |
| P43180 | 100 - 114 | SNEIKIVATPDGGS | 0,23 | 7 | 15,57 | P7 | |
| P43183 | 100 - 116 | SNEIKIVATPDGGS | 0,02 | 10 | 20,13 | P8 | |
| P43184 | 100 - 114 | CNEIKIVATPDGGS | 0,25 | 7 | 15,57 | P9 | |
| P43185 | 100 - 114 | SNEIKIVATPDGGS | 0,23 | 7 | 15,57 | P10 | |
| P43186 | 100 - 114 | CNEIKIVATPDGGS | 0,25 | 7 | 15,57 | P11 | |
| P45431 | 100 - 114 | CNEIKIVATPDGGS | 0,25 | 7 | 15,57 | P12 | |
| P43178 | 112 - 126 | GSILKINNKYHTKGD | -1,08 | 6 | 12,34 | P13 | |
| P43179 | 112 - 126 | GSILKINNKYHTKGD | -1,08 | 6 | 12,34 | P14 | |
| P43183 | 112 - 126 | GSILKINNKYHTKGD | -1,08 | 6 | 12,34 | P15 | |
| P15494 | 142 - 160 | ETLLRAVESYLLAHS DAYN | -0,09 | 8 | 12,06 | P16 | 6 |
| P43176 | 142 - 160 | EALLRAVESYLLAHS DAYN | 0,04 | 8 | 12,06 | P17 | 7 |
| P43177 | 142 - 160 | ETLLRAVESYLLAHS DAYN | -0,09 | 8 | 12,06 | P18 | |
| P43178 | 142 - 160 | ETLLRAVESYLLAHS DAYN | -0,09 | 8 | 12,06 | P19 | |
| P43179 | 142 - 160 | ETLLRAVESYLLAHS DAYN | -0,09 | 8 | 12,06 | P20 | |
| P43180 | 142 - 160 | ETLLRAVESYLLAHS DAYN | -0,09 | 8 | 12,06 | P21 | |
| P43183 | 142 - 160 | ETLLRAVESYLLAHS DAYN | -0,09 | 8 | 12,06 | P22 | |
| P43184 | 142 - 160 | EALLRAVESYLLAHS DAYN | 0,04 | 8 | 12,06 | P23 | |
| P43185 | 142 - 160 | ETLLRAVESYLLAHS DAYN | -0,09 | 8 | 12,06 | P24 | |
| P43186 | 142 - 160 | EALLRAVESYLLAHS DAYN | 0,04 | 8 | 12,06 | P25 | |
| P45431 | 142 - 160 | EALLRAVESYLLAHS DAYN | 0,04 | 8 | 12,06 | P26 | |

Tabla 1A

Análisis EpiMatrix de la secuencia de Bet v1: P15494: región de unión a alelos HLA DR múltiple predicha: FNYETETTSVIPAAARLKFALDGDNL (4-31).

| Inicio de marco | Secuencia de AA | Parada de marco | Puntuación Z de DRB1*01 01 | Puntuación Z de DRB1*03 01 | Puntuación Z de DRB1*04 01 | Puntuación Z de DRB1*07 01 | Puntuación Z de DRB1*08 01 | Puntuación Z de DRB1*11 01 | Puntuación Z de DRB1*13 01 | Puntuación Z de DRB1*15 01 | Éxitos |
|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------|
| 4 | FNYETETS | 12 | .96 | 1,29 | 1,58 | -.42 | -.10 | .93 | -.21 | .27 | 0 |
| 5 | NYETETTSV | 13 | .32 | -.86 | .59 | .81 | -1,32 | -.80 | -.75 | .22 | 0 |
| 6 | YETETTSVI | 14 | 2,15 | 1,37 | 2,25 | 1,72 | 1,09 | 1,15 | -.03 | .70 | 3 |
| 7 | ETETTSVIP | 15 | -.11 | -1,34 | .48 | .58 | -.89 | -.60 | -.84 | -.03 | 0 |
| 8 | TETTSVIPA | 16 | .16 | -1,10 | .97 | .51 | -.86 | -.69 | -.48 | .04 | 0 |
| 9 | ETTSVIPAA | 17 | -.04 | .16 | .64 | -.18 | -.89 | .43 | -.39 | -.17 | 0 |
| 10 | TTSVIPAAAR | 18 | .64 | .66 | -.12 | -.56 | .14 | .47 | .50 | -.43 | 0 |
| 11 | TSVIPAAARL | 19 | 1,52 | -.44 | .23 | .47 | -.63 | .28 | -.96 | -.33 | 0 |
| 12 | SVIPAAARLF | 20 | .69 | -.06 | -.07 | 1,07 | -.44 | .25 | 1,05 | -.20 | 0 |
| 13 | VIPAAARLFK | 21 | .67 | 2,00 | .65 | .50 | 1,21 | 1,32 | 1,98 | 1,21 | 2 |
| 14 | IPAAARLFKA | 22 | .55 | 1,17 | .00 | -.28 | .32 | .16 | 1,27 | 1,60 | 0 |
| 15 | PAARLFKAF | 23 | -1,29 | -1,65 | -1,57 | .28 | -.29 | -.88 | -.32 | -.58 | 0 |
| 16 | AARLFKAFI | 24 | 1,13 | 1,39 | -.25 | -.68 | 1,25 | 1,50 | 1,32 | -.06 | 0 |
| 17 | ARLFKAFIL | 25 | 2,12 | .89 | .25 | 1,84 | 1,11 | .18 | 1,54 | | 3 |
| 18 | RLFKAFILD | 26 | -1,54 | -.90 | -1,35 | -.86 | 1,38 | -1,29 | -.38 | -.67 | 0 |
| 19 | LFKAFILDG | 27 | .86 | 1,13 | 1,48 | .68 | .94 | .39 | 1,14 | 1,37 | 0 |
| 20 | FKAFILDGD | 28 | -.17 | .58 | .09 | -.43 | 1,90 | .24 | .30 | .96 | 1 |
| 21 | KAFILDGDN | 29 | -.49 | -1,35 | -.67 | -.69 | -.59 | -.02 | -2,05 | .29 | 0 |
| 22 | AFILDGDNL | 30 | 1,32 | -.28 | -.21 | .67 | -.85 | -.69 | -.80 | .30 | 0 |
| 23 | FILDGDNLF | 31 | -.02 | 2,27 | 1,73 | 1,07 | .47 | -.09 | -.22 | .74 | 2 |

Tabla 2 - Bet v.1

| SECUENCIA DE ENTRADA | RESIDUOS EN LA SECUENCIA (Incl FLANCOS) | SECUENCIA | Hidrofobia | ÉXITOS DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | PUNTUACIÓN DE AGRUPACIÓN DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | Péptido ID NO | SEQ ID NO |
|----------------------|---|-----------------------|------------|------------------------------------|--|---------------|-----------|
| CAA04829 | 1-16 | GVFNYEIGATSVIPAA | 0.84 | 7 | 11,23 | P27 | 8 |
| 2122374C | 14-34 | IAPARLFKSFVLDADNLIPKV | 0.62 | 9 | 13,67 | P28 | 9 |
| ABC41588 | 97 - 111 | CNEIKLVATPDGGST | -0.15 | 7 | 15,45 | P29 | 10 |
| ABC41605 | 97 - 111 | SKEIKIAAAPDGGSI | 0.01 | 6 | 13,05 | P30 | 11 |
| ABC41615 | 97 - 111 | SNEIKVATPDGGCI | 0.25 | 7 | 15,57 | P31 | 12 |
| ABC41617 | 97 - 111 | CNEIKLVATPDGGSI | 0.20 | 7 | 15,45 | P32 | 13 |
| ABC41596 | 97 - 113 | CNEIKVAAAPGGGSILK | 0.54 | 9 | 17,42 | P33 | 14 |
| ABC41602 | 97 - 113 | CNEIKVPAPGGGSILK | 0.34 | 9 | 16,98 | P34 | 15 |
| ABC41609 | 97 - 113 | SYEIKVAAAPGGGSILK | 0.48 | 9 | 17,42 | P35 | 16 |
| IQMR_A | 99 - 113 | SNEIKVATPDGGSI | 0.11 | 5 | 10,32 | P36 | 17 |
| CAA96546 | 100 - 114 | CNEIKVAAAPDGGSI | 0.41 | 7 | 14,59 | P37 | 18 |
| CAA96547 | 100 - 114 | SNEIKVATPDGRSI | -0.25 | 7 | 15,57 | P38 | 19 |
| CAA07324 | 100 - 114 | SNEIKLVATPDGGSI | -0.02 | 7 | 15,45 | P39 | 20 |
| CAA07327 | 100 - 114 | CNEIKVATPDGGCV | 0.45 | 7 | 15,57 | P40 | 21 |
| CAA07318 | 100 - 114 | SNEIKVTPDGGCV | 0.06 | 7 | 15,57 | P41 | 22 |
| AAD26561 | 100 - 114 | SNEIKVATPDGGPI | -0.03 | 7 | 15,57 | P42 | 23 |
| ABC41589 | 109 - 125 | GSILKIRNKYHTKGDHE | -1.41 | 9 | 15,34 | P43 | 24 |
| ABC41609 | 139 - 150 | AGLFKAVENYLV | 0.82 | 5 | 10,95 | P44 | 25 |
| ABC41583 | 139 - 150 | ETLLRAVESYLL | 0.58 | 6 | 13,44 | P45 | 26 |
| ABC41589 | 139 - 150 | EALLRAVESYLL | 0.78 | 6 | 13,44 | P46 | 27 |
| ABC41602 | 139 - 150 | EALFRAMESYLL | 0.70 | 7 | 16,84 | P47 | 28 |
| CAA96544 | 139 - 156 | EKAVGLLKAVESYLLAHS | 0.43 | 7 | 12,97 | P48 | 29 |
| CAA07319 | 141 - 160 | GETLLRAVEGYLLAHS DAYN | -0.09 | 8 | 11,13 | P49 | 30 |
| AAD26561 | 142 - 156 | ETLLRAVESYPLAHS | -0.05 | 6 | 13,44 | P50 | 31 |
| 2122374C | 142 - 160 | AGLFKAVENYLV AHPNAYN | 0.02 | 10 | 15,5 | P51 | 32 |
| CAA96539 | 142 - 160 | ETLLRAVERYLLAHS DAYN | -0.29 | 10 | 18,69 | P52 | 33 |
| 2122374A | 142 - 160 | EALFRAMESYLLAHS DAYN | -0.02 | 9 | 15,46 | P53 | 34 |

Ejemplo 2

5 Se realizaron análisis EpiMatrix como antes en la secuencia entera de una isoforma conocida de Bet v 3 (nº de acceso de NCBI: P43187). Estos análisis identificaron un péptido de núcleo (y su secuencia flanqueante) derivado de la secuencia anterior que se predice que tiene buena unión a MHC clase II. La secuencia se muestra a continuación en la Tabla 3. Los encabezados y notas para la Tabla 3 son como con la Tabla 1 anterior.

Tabla 3 - Bet v 3

| SECUENCIA DE ENTRADA | RESIDUOS EN LA SECUENCIA (Incl. FLANCOS) | SECUENCIA | Hidrofobia | ÉXITOS DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | PUNTUACIÓN DE AGRUPACIÓN DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | Péptido ID NO | SEQ ID NO |
|----------------------|--|------------------|------------|------------------------------------|--|---------------|-----------|
| P43187 | 188 - 205 | VDFEFKDMRMSVLRSS | 0.16 | 10 | 14.02 | P54 | 35 |

ES 2 573 651 T3

También se predijo que una secuencia en los residuos 80 a 94 de P43187, TVKSFTREGNIGLQF (Péptido ID NO. P55, SEQ ID NO: 36) tenía buena unión de MHC clase II. Análisis informático adicional de las secuencias del alérgeno del abedul de Bet v 3 se muestra aquí:

Tabla 3A
Análisis EpiMatrix de la secuencia de Bet v3: G11168696_SPP43187: región de unión a alelos HLA DR múltiple predicha SLNTRLRRLRRIFDLFDK (35-50).

| Inicio de marco | secuencia | Fin | Puntuación Z de DRB1*01 01 | Puntuación Z de DRB1*0 301 | Puntuación Z de DRB1*0 401 | Puntuación Z de DRB1*07 01 | Puntuación Z de DRB1*08 01 | Puntuación Z de DRB1*101 | Puntuación Z de DRB1*13 01 | Puntuación Z de DRB1*15 01 | Éxitos |
|-----------------|-------------|-----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|--------|
| 35 | SLNTRLRRLRR | 43 | ,28 | ,97 | -,38 | ,38 | ,64 | ,53 | 1,73 | ,68 | 1 |
| 36 | LNTLRLRRI | 44 | 1,30 | ,87 | -,15 | ,46 | ,82 | 1,35 | 1,41 | ,17 | 0 |
| 37 | NTRLRRLRRIF | 45 | -,24 | ,12 | -,52 | ,43 | 1,21 | 1,13 | 1,42 | -,47 | 0 |
| 38 | TLRLRRIFD | 46 | ,47 | ,40 | -,46 | ,42 | - | ,66 | ,49 | -,34 | 1 |
| 39 | LRLRRIFDL | 47 | 1,09 | ,83 | ,08 | | 1,68 | ,31 | 1,94 | | 4 |
| 40 | RLRRIFDLF | 48 | -,83 | -,86 | -,40 | -,38 | -,94 | -,34 | -,63 | -,87 | 0 |
| 41 | LRRIFDLFD | 49 | ,84 | ,60 | 1,39 | ,46 | 1,41 | ,88 | ,39 | 1,55 | 0 |
| 42 | RRIFDLFDK | 50 | -,31 | ,38 | -,31 | -,58 | ,85 | ,33 | 1,05 | 1,61 | 0 |

Ejemplo 3

5 Se realizaron análisis EpiMatrix como antes en la secuencia entera de isoformas conocidas de Bet v 4 (nº de acceso de NCBI: Q39419, CAA73147). Estos análisis identificaron péptido de núcleo (y sus secuencias flanqueantes) derivados de las secuencias anteriores que se predice que tienen buena unión a MHC clase II. Estas secuencias se muestran a continuación en la Tabla 4. Los encabezados y notas para la Tabla 4 son como con la Tabla 1 anterior.

Tabla 4 - Bet v 4

| SECUENCIA DE ENTRADA | RESIDUOS EN LA SECUENCIA (Incl. FLANCOS) | SECUENCIA | Hidrofobia | ÉXITOS DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | PUNTUACIÓN DE AGRUPACIÓN DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | Péptido ID NO | SEQ ID NO |
|----------------------|--|-------------------|------------|------------------------------------|--|---------------|-----------|
| Q39419 | 10 - 27 | AERERIFKRFDANGDKI | -1,19 | 8 | 13,83 | P56 | 37 |
| Q39419 | 67 - 81 | FTDFGRANRGLLKDV | -0,38 | 7 | 13,49 | P57 | 38 |
| CAA73147 | 67 - 81 | FTDFARANRGLLKDV | -0,23 | 7 | 13,53 | P58 | 39 |

Ejemplo 4

5 Se realizaron análisis EpiMatrix como antes en la secuencia entera de una isoforma conocida de Bet v 6 (nº de acceso de NCBI: 065002). Estos análisis identificaron péptido de núcleo (y sus secuencias flanqueantes) derivados de las secuencias anteriores que se predice que tienen buena unión a MHC clase II. Estas secuencias se muestran a continuación en la Tabla 5. Los encabezados y notas para la Tabla 5 son como con la Tabla 1 anterior.

Tabla 5 - Bet v 6

| SECUENCIA DE ENTRADA | RESIDUOS EN LA SECUENCIA (Incl FLANCOS) | SECUENCIA | Hidrofobia | ÉXITOS DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | PUNTUACIÓN DE AGRUPACIÓN DE EpiMatrix (Excl FLANCOS) | Péptido ID NO | SEQ.ID NO |
|----------------------|---|-------------------------|------------|------------------------------------|--|---------------|-----------|
| 065002 | 43 - 63 | PVKGKLVKFKGLGVTLLHGD | 0,04 | 9 | 14,09 | P59 | 40 |
| 065002 | 67 - 90 | HESLVKAFKQVDWISTVGHQLQA | 0,52 | 11 | 15,54 | P60 | 41 |
| 065002 | 149 - 170 | YVSSNFFAGYFLPTLAQPGLTS | 0,46 | 10 | 12,92 | P61 | 42 |
| 065002 | 258 - 274 | PINVILAINHSVFKGD | 0,83 | 7 | 10,54 | P62 | 43 |

Ejemplo 5

5 Se realizaron análisis EpiMatrix como antes en la secuencia entera de una isoforma conocida de Bet v 7 (nº de acceso de NCBI: CAC84116). Estos análisis identificaron un péptido de núcleo (y su secuencia flanqueante) derivado de la secuencia anterior que se predice que tiene buena unión a MHC clase II. Esta secuencia se muestra a continuación en la Tabla 6. Los encabezados y notas para la Tabla 6 son como con la Tabla 1 anterior.

Tabla 6 - Bet.v.7

| SECUENCIA DE ENTRADA | RESIDUOS EN LA SECUENCIA (Incl. FLANCOS) | SECUENCIA | Hidrofobia | ÉXITOS DE EpiMatrix (Excl. FLANCOS) | PUNTUACIÓN DE AGRUPACIÓN DE EpiMatrix (Excl. FLANCOS) | Péptido ID | SEQ ID |
|----------------------|--|---------------|------------|-------------------------------------|---|------------|--------|
| CAC84116 | 34 - 48 | AENFRALCTGKGN | -0.77 | 5 | 10.46 | P63 | 44 |

Ejemplo 5A

Se muestra aquí análisis informático adicional de otras secuencias de alérgeno del abedul de Bet v 2:

Tabla 6A

| Análisis EpiMatrix de la secuencia de Bet.v2: G11942360_PDB1CQA; región de unión a alelos HLA DR múltiple predicha: SVWAQSSFPQFKPQEITGIMK (33-54). | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------|-----|----------------------------------|---------------------------|------|---------------------------|-------|----------------------------------|----------------------------------|-------|----------------------------------|----------------------------------|--------|
| Inicio de marco | secuencia | fin | Puntuación Z de DRB1*01 01 | Puntuación Z de DRB1*0 | 301 | Puntuación Z de DRB1*0 | 401 | Puntuación Z de DRB1*07 01 | Puntuación Z de DRB1*08 01 | 101 | Puntuación Z de DRB1*13 01 | Puntuación Z de DRB1*15 01 | Éxitos |
| 33 | SVWAQSSSF | 41 | ,75 | 1,04 | ,40 | 1,04 | 1,04 | 1,19 | -,29 | -,22 | -,17 | ,71 | 0 |
| 34 | VWAQSSFP | 42 | ,90 | 1,31 | ,82 | 1,31 | 1,31 | ,46 | -,02 | ,21 | ,64 | 1,01 | 0 |
| 35 | WAQSSFPQ | 43 | 1,70 | 2,24 | ,36 | 2,24 | 2,24 | 1,23 | 1,23 | 1,44 | ,12 | 1,53 | 3 |
| 36 | AQSSFPQF | 44 | -,65 | -,28 | ,38 | -,28 | -,28 | -,01 | -,126 | -,18 | -,18 | -,56 | 0 |
| 37 | QSSFPQFK | 45 | -,31 | ,24 | ,01 | ,24 | ,24 | ,04 | -,101 | ,00 | -,152 | -,51 | 0 |
| 38 | SSFPQFKP | 46 | -,45 | -,150 | -,73 | -,150 | -,150 | -,102 | -,04 | -,76 | -,02 | ,21 | 0 |
| 39 | SFPQFKPQ | 47 | -,10 | -,57 | -,27 | -,57 | -,57 | ,24 | -,52 | -,64 | -,122 | -,98 | 0 |
| 40 | SFPQFKPQE | 48 | -,23 | -,75 | 1,11 | -,75 | -,75 | -,169 | 1,34 | ,47 | 1,32 | -,32 | 0 |
| 41 | FPQFKPQEI | 49 | 1,55 | ,67 | ,73 | ,67 | ,67 | ,99 | ,88 | ,49 | ,09 | 2,02 | 1 |
| 42 | PQFKPQEIT | 50 | -,26 | -,85 | ,27 | -,85 | -,85 | ,12 | 1,00 | ,28 | ,59 | -,60 | 0 |
| 43 | QFKPQEITG | 51 | -,128 | -,84 | -,42 | -,84 | -,84 | -,60 | -,27 | -,113 | ,23 | ,00 | 0 |
| 44 | FKPQEITGI | 52 | 1,94 | 1,69 | 1,68 | 1,69 | 1,69 | 1,76 | ,07 | ,45 | 1,37 | 1,43 | 4 |
| 45 | KPQEITGIM | 53 | ,15 | ,32 | ,15 | ,32 | ,32 | ,12 | -,39 | ,10 | -,15 | -,26 | 0 |
| 46 | PQEITGIMK | 54 | -,06 | -,06 | -,11 | -,06 | -,06 | -,24 | -,155 | -,85 | -,148 | -,15 | 0 |

Tabla 6B

| Análisis EpiMatrix de la secuencia de Bet v2: G11942360_PDB1CQA: región de unión a alelos HLA DR múltiple predicha: IKYMWIQGEAGAVIRGKKGSGG (72-93). | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------|-----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------|--|--|
| Inicio de marco | secuencia | fin | Puntuación Z de DRB1*01 01 | Puntuación Z de DRB1*0 301 | Puntuación Z de DRB1*0 401 | Puntuación Z de DRB1*07 01 | Puntuación Z de DRB1*08 01 | Puntuación Z de DRB1*1 101 | Puntuación Z de DRB1*13 01 | Puntuación Z de DRB1*15 01 | Éxitos | | |
| 72 | IKYMWIQGE | 80 | 1,21 | 1,60 | 1,25 | ,49 | 1,87 | 1,30 | -,52 | ,97 | 1 | | |
| 73 | KYMWIQGEA | 81 | ,45 | ,63 | -,35 | ,37 | ,56 | 1,73 | ,28 | ,53 | 1 | | |
| 74 | YMWIQGEAG | 82 | 1,68 | ,22 | 1,47 | ,98 | ,61 | 1,06 | -,37 | ,26 | 1 | | |
| 75 | MVIQGEAGA | 83 | 1,49 | 2,23 | 1,51 | -,42 | 1,07 | 1,87 | 2,27 | ,85 | 3 | | |
| 76 | VIQGEAGAV | 84 | 1,12 | 1,46 | -,18 | 1,12 | -,11 | ,16 | -,07 | 2,02 | 1 | | |
| 77 | IQGEAGAVI | 85 | | 1,64 | 1,28 | ,54 | ,46 | ,67 | ,50 | ,86 | 1 | | |
| 78 | QGEAGAVIR | 86 | ,56 | ,61 | -,43 | -,01 | -,68 | -,108 | ,29 | ,12 | 0 | | |
| 79 | GEAGAVIRG | 87 | ,02 | ,36 | ,41 | -,45 | -,52 | -,138 | -,79 | ,28 | 0 | | |
| 80 | EAGAVIRGK | 88 | -,12 | -,55 | ,17 | -,08 | -,44 | ,08 | -,23 | -,21 | 0 | | |
| 81 | AGAVIRGKK | 89 | -,65 | ,95 | -,14 | ,00 | ,75 | 1,71 | ,58 | ,53 | 1 | | |
| 82 | GAVIRGKKG | 90 | ,82 | -,139 | -,20 | -,20 | -,70 | -,26 | -,31 | ,08 | 0 | | |
| 83 | AVIRGKKGS | 91 | -,08 | ,16 | -,55 | -,21 | 1,97 | 1,49 | 1,43 | 1,07 | 1 | | |
| 84 | VIRGKKGSG | 92 | ,10 | -,64 | -,64 | -,90 | 1,35 | 1,18 | ,92 | 1,79 | 2 | | |
| 85 | IRGKKGSGG | 93 | 1,18 | 1,05 | ,64 | ,02 | 2,09 | ,95 | 1,11 | 1,83 | 2 | | |

Ejemplo 6

Basándose en los análisis realizados en los Ejemplos 1 a 5A, se diseñaron los siguientes péptidos mostrados en la Tabla 7 para cribar en ensayos posteriores. El proceso de diseño implicó la modificación de secuencias nativas para potenciar la solubilidad y otras características fisicoquímicas. Por ejemplo, para Bir12A, los residuos en 62-77R parental indican que la secuencia de péptidos de Bir12A se corresponde con los residuos 62 a 77 de la secuencia parental, con un residuo R adicional añadido al extremo C para mejorar la solubilidad. Similarmente, para Bir01F, G, H y I, los residuos en 4-18K parental indican que estas secuencias de péptidos se corresponden con los residuos 4 a 18 de la secuencia parental, con un residuo K adicional añadido al extremo C para mejorar la solubilidad.

Tabla 7

| Péptido | Secuencia | Residuos | SEQ. ID. NO |
|---------|---------------------|--------------------------------|-------------|
| BIR01F | FNYETEATSVIPAARK | 4-18K (P43185) Bet v1 | 45 |
| Bir01G | FNYEIEATSVIPAARK | 4-18K (P43179) Bet v1 | 46 |
| BIR01H | FNYEIETTSVIPAARK | 4-18K (P43177) Bet v1 | 47 |
| BIR01I | FNYETETTSVIPAARK | 4-18K (P15494) Bet v1 | 48 |
| BIR02D | PAARMFKAFILDGDKLVPK | 15-33 (P43185) Bet v1 | 49 |
| BIR02E | PAARLFKAFILEGDTLIPK | 15-33 (P43184) Bet v1 | 50 |
| Bir02G | PAARLFKAFILEGDNLIPK | 15-33 (P41380) Bet v1 | 51 |
| BIR02I | PAARMFKAFILD | 15-26 (P41385) Bet v1 | 52 |
| BIR02J | PAARMFKAFILEGDKLVPK | Variante D a E de BIR02D | 53 |
| BIR04 | PGTIKKISFPEGFPFKYV | 51-68 (P43185) Bet v1 | 54 |
| BIR05 | SPFKYVKERVDEVDHA | 63-78 (P43186) Bet v1 | 55 |
| BIR05A | FPFKYVKDRVDEVDHT | 63-78 (P43185) Bet v1 | 56 |
| BIR06 | ANFKYSYSMIEGGALGD | 78-94(P43186) Bet v1 | 57 |
| BIR06B | TNFKYSYSVIEGGPVG | 78-94 (P43183) Bet v1 | 58 |
| BIR06D | TNFKYNYSVIEGGPIG | 78-93 (P) Bet v1 | 59 |
| BIR07 | SNEIKIVATPDGGSILK | 100-116 Bet v1 | 60 |
| BIR07A | SNEIKIVATPNGGSILK | 100-116 Bet v1 | 61 |
| BIR07B | SNEIKIVATPQGGSSILK | 100-116 Bet v1 | 62 |
| BIR07C | SNEIKIVATPEGGSILK | 100-116 Bet v1 | 63 |
| BIR07D | SNEIKIVATPGGGSSILK | 100-116 Bet v1 | 64 |
| BIR08 | GSILKINNKYHTKGD | 112-126 Bet v1 | 65 |
| BIR08A | SILKISNKYHTKGD | 113-125 (P43186) Bet v1 | 66 |
| BIR09 | ETLLRAVESYLLAHS DAY | 142-159 Bet v1 | 67 |
| BIR09A | GETLLRAVESYLLAHS | 141-156 Bet v1 | 68 |
| BIR09B | KEMGETLLRAVESYLLAHS | 138-156 Bet v1 | 69 |
| BIR09C | KEKGETLLRAVESYLLAHS | Variante M a K de antes | 70 |
| BIR10 | GSVWAQSSFPQFK | 33-45 (P25816) Bet v 2 | 71 |
| BIR11 | FPQFKPQEITGIMK | 41-54 (AAB44348) Bet v2 | 72 |
| BIR12A | PTGMFVAGAKYMVIQGR | 62-77R (P35079) Phl p12 | 73 |
| BIR12B | AKYMVIQGEPRVIRGK | 70-86 (P35079) Phl p12 | 74 |
| BIR13 | GIKYMVIQGEAGAVIRGK | 71-88 (AAB44348) Bet v2 | 75 |
| BIR14 | EAGAVIRGKKGSSGIT | 80-95 (P25816) Bet v2 | 76 |
| BIR15 | SLNTRLRRLRIFDLFDK | 35-50 Bet v3 | 77 |
| BIR16A | AERERIFKRFDANGEGK | 10-26 Variante D a E de Bet v4 | 78 |
| BIR16B | AERERIFKRFDAGGEGK | Variante N a G a de antes | 79 |
| BIR17 | VKGKLVKFKGLGVTLHGH | 44-62 Bet v6 | 80 |

Ejemplo 715 **Análisis de unión *in vitro***

Los péptidos identificados por ser posible unión a MHC clase II se cribaron previamente para solubilidad en un medio ácido acuoso y los péptidos se prueban en un ensayo de unión de MHC clase II *in vitro*.

20 **Métodos**

El ensayo empleado es un ensayo de unión a MHC clase II competitivo, en el que cada péptido se analiza para su capacidad para desplazar un ligante de control conocido de cada uno de los alotipos de MHC clase II humanos

investigados. Los alotipos y los péptidos de control usados en este estudio normalmente son aquellos mostrados a continuación:

Péptidos de control usados en los ensayos de unión in vitro

5

| Alotipo | Péptido de control | Secuencia |
|------------|---|-----------------|
| Drub1*0301 | Myco. tuberculosis/leprae hsp 65 2-16 | AKTIAYDEEARRGLE |
| DRB1*1101 | Hemaglutinina de la gripe 307-319 | PKYVKQNTLKLAT |
| DRB1*1501 | Proteína básica de mielina humana 85-99 | ENPWHFFKNNTPR |

Se analizan cada uno de los péptidos de las Tablas 1 a 7 en el ensayo de competición y se criban para la unión relativa en comparación con los péptidos de control. Debido a la naturaleza del ensayo competitivo, los datos para cada péptido se determinan como una relación de su propia CI_{50} con la del péptido de control. Así, un péptido que tiene un valor de CI_{50} que es paridad al péptido de control tiene una afinidad de unión idéntica, mientras que los péptidos con una relación inferior a uno tienen una mayor afinidad y aquellos con una relación superior a uno tienen una menor afinidad.

La solubilidad en disolución acuosa es un criterio esencial para que un péptido sea un agente terapéutico eficaz. Por tanto, como consecuencia del cribado de solubilidad se eliminarán péptidos muy hidrófobos con una alta frecuencia de residuos de aminoácidos hidrófobos grandes de múltiples registros de unión. Esto es una característica de ligantes de HLA-DRB1* promiscuos. Se identifican los péptidos que se unen a uno o más de los alotipos de MHC clase II. Se esperaría que tales péptidos tuvieran la capacidad de unirse a alotipos similares que no se han probado mediante la homología de estructuras de MHC.

15

Ejemplo 8

Los siguientes métodos se aplican a los mismos péptidos que en el Ejemplo 7.

25 *Ensayo de proliferación celular*

El ensayo de proliferación celular se realiza en PBMC (140×10^6 células requeridas para todos los parámetros que van a probarse). La proliferación se mide por la incorporación del compuesto radiomarcado 3H-timidina. En más detalle, se distribuyen 100 μ l de la concentración de antígeno o péptido apropiado en los pocillos apropiados de placas de 96 pocillos. Las placas se disponen entonces en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO_2 establecida a 37 °C durante un máximo de 4 horas. Las PBMC aisladas como se ha descrito anteriormente se preparan a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio completo a temperatura ambiente. Entonces se distribuyen 100 μ l de disolución de células en cada uno de los pocillos de las placas de 96 pocillos que contienen antígeno/péptido. Las placas se incuban entonces durante 6 a 8 días. Los cultivos se pulsan con disolución de timidina tritiada añadiendo 10 μ l de disolución madre de timidina tritiada (1,85 MBq/ml en medio RPMI libre de suero) a cada pocillo. Las placas se devuelven entonces a la estufa de incubación durante entre 8 y 16 horas. Los cultivos se recogen entonces usando un recolector de células Canberra Packard FilterMate 196. Las esteras de filtro secas se cuentan usando un contador de centelleo beta apropiado.

40 Los recuentos de pocillos que contienen péptido se comparan estadísticamente con pocillos que contienen medio solo (12 pocillos por grupo). Se usa la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Se usa la misma prueba estadística para todos los sujetos. Una diferencia estadísticamente significativa entre pocillos de solo medio y pocillos estimulados con péptido se considera una estimulación positiva de PBMC por el péptido.

45 *Ensayo de liberación de citocinas*

Se fabricaron los 36 péptidos a pequeña escala (aproximadamente 10 mg de tamaño de lote, no GMP). La pureza de cada péptido fue de al menos el 95 % por HPLC. Se prepararon placas de cultivo de 96 pocillos que contenían péptidos y controles (el control negativo fue medio de cultivo y los controles positivos fueron enterotoxina B estafilocócica (SEB) 25 ng/ml y extracto de polen del alérgeno del abedul completo 100 μ g/ml) por adelantado y se guardaron a -20 °C antes del día del ensayo. Los péptidos se añadieron a pocillos en un volumen de 100 μ l que contenía péptidos a una concentración de 200 μ g/ml, de forma que la posterior adición de 100 μ l de células creara una concentración de ensayo final de 100 μ g/ml.

55 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre heparinizada por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Entonces se añadió una alícuota de 100 μ l de una suspensión de PBMC a 5×10^6 célula/ml a cada pocillo y las placas se dispusieron en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO_2 a 37 °C durante 5 días. Tras la estimulación, los sobrenadantes de cultivo (100 μ l) se recogieron para probar por ensayo de perlas múltiple.

60

Los ensayos de perlas de citocina múltiple (IL-10, IL-13, interferón gamma (IFN-g)) se realizaron sobre sobrenadantes de cultivo descongelados según las instrucciones del fabricante. Las mediciones individuales se realizaron para cada muestra de sobrenadante de cultivo. Después de completarse el ensayo múltiple, se determinaron niveles de citocina individuales por interpolación de la curva patrón generada en el ensayo. Se tomó un resultado positivo que es superior a 100 pg/ml para los ensayos de IL-13 y IFN-g o >4 veces el fondo para los ensayos de IL-10. Se calculó el número de respondedores de los 47 sujetos alérgicos al abedul probados para cada péptido para las tres citocinas. Los resultados para IL-13 o IFN-g se resumen en la Tabla 9.

Tabla 8

| % de respondedores indica la proporción de sujetos en la que cada péptido indujo IL-3 o IFN-g por encima de un nivel umbral de 100 pg/ml | | | |
|--|--------------------|---------|--------------------|
| Péptido | % de respondedores | Péptido | % de respondedores |
| Bir02J | 48 | Bir15 | 27 |
| Bir01I | 42 | Bir16B | 27 |
| Bit01F | 38 | Bit01H | 25 |
| Bir12B | 38 | Bir06D | 25 |
| Bit01 g | 33 | Bir07B | 25 |
| Bir04 | 33 | Bir07D | 25 |
| Bir09 | 33 | Bir10 | 25 |
| Bir02E | 31 | Bir14 | 25 |
| Bir02G | 31 | Bir17 | 25 |
| Bir02I | 31 | Bir05A | 23 |
| Bir07 | 31 | Bir06 | 23 |
| Bir07C | 31 | Bir07A | 23 |
| Bir09A | 31 | Bir13 | 23 |
| Bir09B | 31 | Bir06B | 19 |
| Bir11 | 31 | Bir08A | 19 |
| Bir16A | 31 | Bir05 | 17 |
| Bir02D | 29 | Bir08 | 17 |
| Bir09C | 27 | Bir12A | 17 |

Los péptidos que inducen respuesta positiva en una alta proporción de sujetos son deseables para inclusión en una vacuna. Como se muestra, los péptidos que mejor funcionaron fueron Bir02J (principal de la serie 02), Bir 01I (principal de la serie 01) y Bir12B. El núcleo de cualquier vacuna debería contener idealmente estos péptidos. Los segundos péptidos que mejor funcionaron fueron Bir04 y Bir09 (principal de la serie 09) que puede añadirse a la mezcla de núcleo de Bir02J, Bir01I y Bir12B. Los terceros péptidos que mejor funcionaron fueron Bir07, Bir07C, Bir11 y Bir16A. Péptidos adicionales de este grupo pueden añadirse a la mezcla de vacuna para aumentar adicionalmente la cobertura. Bir15 fue el cuarto péptido que mejor funcionó y también puede añadirse a la mezcla de vacuna. En términos de otros péptidos en las diversas series, Bir01F, 01G o 01H, en ese orden de preferencia, son variantes útiles de Bir01I; Bir02E, 02G, 02I o finalmente 02D son variantes útiles de Bir02J; Bir09A, 09B o finalmente 09C son variantes útiles de Bir09; y Bir16B es una variante útil de Bir16A. Una posible mezcla preferida incluiría, por tanto, Bir02J, Bir01I, Bir12B, Bir04, Bir09, Bir07C y Bir16A. Bir11 y/o Bir15 también pueden incluirse, o alternativamente sustituirse por Bir07C y/o Bir16A.

En términos de liberación de IL-10, Bir01I, enumerado anteriormente como uno de los 3 péptidos principales para la producción de IL-13 o IFN-g, indujo respuestas de IL-10 en el 49 % de los individuos. Bir02I también indujo producción de IL-10 en una alta proporción de individuos (43 %). La inclusión de un fuerte péptido inductor de IL-10 puede ayudar en la inducción de tolerancia tras la vacunación.

Ejemplo 9- Cribado de solubilidad

A) Introducción

Tabla 9-1: Péptidos de abedul que van a incluirse en la prueba de solubilidad

| Péptido | Secuencia | Mw (Da) | Longitud (a.a.) | Punto isoeléctrico teórico (pI) |
|---------|---------------------|---------|-----------------|---------------------------------|
| BIR01I | FNYETETTSVIPAARK | 1825,92 | 16 | 6,14 |
| BIR02I | PAARMFKAFILD | 1378,74 | 12 | 9,18 |
| BIR02J | PAARMFKAFILEGDKLVPK | 2130,26 | 19 | 9,72 |
| BIR04 | PGTIKKISFPEGFPFKYV | 2054,12 | 18 | 9,56 |
| BIR07C | SNEIKIVATPEGGSILK | 1754,98 | 17 | 5,86 |
| BIR09 | ETLLRAVESYLLAHS DAY | 2050,04 | 18 | 4,65 |

| Péptido | Secuencia | Mw (Da) | Longitud (a.a.) | Punto isoelectrico teórico (pI) |
|---------|---------------------|---------|-----------------|---------------------------------|
| BIR09B | KEMGETLLRAVESYLLAHS | 2146,11 | 19 | 5,50 |
| BIR12B | AKYMVIIQGEPRVIRGK | 1901,07 | 17 | 10,28 |
| BIR16A | AERERIFKRFDANGEGK | 2022,04 | 17 | 8,63 |

B)

Prueba de solubilidad

5

Se preparó una serie de matrices que contenían trehalosa 260 mM y que englobaban un intervalo de pH de 3,0 a 7,0 más una disolución modificada con HCl 2 mM como se indica en el Apéndice 2. La solubilidad de cada uno de los nueve péptidos se evaluó en cada una de las matrices según el Apéndice 1. Si la solubilidad se logró inicialmente, pero el péptido precipitó en la disolución posteriormente, entonces se añadió una cantidad adicional de la matriz relevante para intentar y probar la solubilidad del péptido a aprox. 200 µM.

10

Detalles de los péptidos de referencia de abedul usados se indican en la Tabla 9-2. Todos los péptidos se fabricaron por Bachem AG, Bubendorf, Suiza.

15

Tabla 9-2. Detalles de péptidos de abedul

| Péptido | Lote nº. | MW (Da) | Pureza de péptidos (%) | Contenido de péptidos (%) |
|---------|----------|---------|------------------------|---------------------------|
| BIR1I | 1028882 | 1827,03 | 99,2 | 87,1 |
| BIRQ2I | 1028883 | 1379,69 | 99,1 | 86,2 |
| BIR02J | 1028884 | 2131,61 | 97,4 | 84,1 |
| BIR04 | 1028885 | 2055,45 | 98,1 | 88,3 |
| BIR07C | 1029310 | 1756,03 | 97,9 | 89,8 |
| BIR09 | 1028886 | 2051,28 | 97,5 | 86,9 |
| BIR09B | 1029311 | 2147,48 | 97,3 | 89,4 |
| BIR12B | 1028887 | 1902,30 | 97,3 | 85,9 |
| BIR16A | 1028888 | 2023,24 | 98,4 | 88,1 |

C) Resultados

Los resultados del cribado de solubilidad se presentan en las Tablas 9-3 a 9-8 a continuación:

20

Tabla 3: HCl 2 mM y trehalosa dihidratado 260 mM, pH 2,65

| Péptido | Ácido clorhídrico 2 mM | | Peso de péptido "tal cual" (mg) | Volumen requerido (µl) | Solubilidad [mg por ml "tal cual"] | Solubilidad [mg por ml] | Solubilidad [µmol por ml] |
|---------|---|---|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | Comentarios | Solubilidad después de 24 horas | | | | | |
| BIR1I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 0,975 | 50 | 19,50 | 16,849 | 9,222 |
| BIR02I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,175 | 50 | 23,50 | 20,075 | 14,550 |
| BIR02I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,180 | 50 | 23,60 | 19,332 | 9,069 |
| BIR04 | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,025 | 50 | 20,50 | 17,758 | 8,639 |
| BIR07C | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,148 | 100 | 11,48 | 10,093 | 5,747 |
| BIR09 | Residuo en el filtro completamente disuelto | Completamente disuelto - residuo en el filtro | 1,147 | 1250 | 0,92 | 0,777 | 0,379 |
| BIR09B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,220 | 100 | 12,20 | 10,612 | 4,942 |
| BIR12B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,022 | 100 | 10,32 | 8,542 | 4,490 |
| BIR16A | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,243 | 50 | 24,86 | 21,551 | 10,652 |

Tabla 4^a Citrato de sodio 10mM y trehalosa dihidratada 260mM, pH 3,01

| Péptido | Tampón citrato pH 3,0 | | Peso de péptido "tal cual" (mg) | Volumen requerido (µl) | Solubilidad [mg por ml "tal cual"] | Solubilidad [mg por ml] | Solubilidad [µmol por ml] |
|---------|--|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | Comentarios | Solubilidad después de 24 horas | | | | | |
| BIR1I | Completamente disuelto | Completament e disuelto | 1,071 | 650 | 1,65 | 1,424 | 0,779 |
| BIR02I | Completamente disuelto | Completament e disuelto | 1,112 | 1100 | 1,01 | 0,864 | 0,626 |
| BIR02J | Completamente disuelto en 100 µl, se redissuelve en 3 ml después de 24 h | Se separa precipitado, se redissuelve | 1,150 | 3000 | 0,38 | 0,314 | 0,147 |
| BIR04 | Completamente disuelto | Completament e disuelto | 1,129 | 50 | 22,58 | 19,559 | 9,516 |
| BIR07C | Completamente disuelto | Completament e disuelto | 1,108 | 850 | 1,30 | 1,146 | 0,653 |
| BIR09 | Sin disolver en 1,5 ml, diluido en 3 ml, todavía sin disolver | Sin disolver | 1,111 | 3000 | 0,37 | 0,314 | 0,153 |
| BIR09B | Completamente disuelto | Completament e disuelto | 1,162 | 100 | 11,62 | 10,108 | 4,707 |
| BIR12B | Completamente disuelto | Completament e disuelto | 1,094 | 200 | 5,47 | 4,572 | 2,403 |
| BIR16A | Completamente disuelto | Completament e disuelto | 1,076 | 150 | 7,17 | 6,219 | 3,074 |

Tabla 4^b Citrato de sodio 10mM y trehalosa dihidratada 260 mM, pH 3,99

| Péptido | Tampón citrato pH 4,0 | | Peso de péptido "tal cual" (mg) | Volumen requerido (µl) | Solubilidad [mg por ml "tal cual"] | Solubilidad [mg por ml] | Solubilidad [µmol por ml] |
|---------|---|---|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | Comentarios | Solubilidad después de 24 horas | | | | | |
| BIR1I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,026 | 450 | 2,28 | 1,970 | 1,078 |
| BIR02I | Disolución turbia con material suspenso Formación de espuma con vórtex | Sin disolver | 1,051 | 3000 | 0,35 | 0,299 | 0,217 |
| BIR02J | Completamente disuelto en 50 µl, se redissuelve en 3 ml después de 24 h | Se separa precipitado, se redissuelve | 1,155 | 3000 | 0,39 | 0,315 | 0,148 |
| BIR04 | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,018 | 50 | 20,36 | 17,636 | 8,580 |
| BIR07C | Disolución transparente con material suspenso Formación de espuma con vórtex | Disolución transparente con material suspenso | 1,126 | 3000 | 0,38 | 0,330 | 0,188 |
| BIR09 | Disolución turbia con material sin disolver | Disolución turbia con material sin disolver | 1,074 | 3000 | 0,36 | 0,303 | 0,148 |
| BIR09B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,140 | 100 | 11,40 | 9,916 | 4,618 |
| BIR12B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,032 | 100 | 10,32 | 8,626 | 4,534 |
| BIR16A | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,123 | 150 | 7,49 | 6,490 | 3,208 |

Tabla 5: Citrato de sodio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM, pH 5,02

| Péptido | Tampón citrato pH 5,0 | | Peso de péptido "tal cual" (mg) | Volumen requerido (µl) | Solubilidad [mg por ml "tal cual"] | Solubilidad [mg por ml] | Solubilidad [µmol por ml] |
|---------|---|---|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | Comentarios | Estabilidad después de 24 horas | | | | | |
| BIR1I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,036 | 450 | 2,30 | 1,989 | 1,089 |
| BIR02I | Disolución turbia con | Completamente disuelto | 1,085 | 3000 | 0,36 | 0,309 | 0,224 |
| BIR02J | Completamente disuelto en 150 µl, se redisuelve en 3 ml después de 24 h | Se separa precipitado, se redisuelve | 1,029 | 3000 | 0,34 | 0,281 | 0,132 |
| BIR04 | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,076 | 50 | 21,52 | 18,641 | 9,069 |
| BIR07C | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,167 | 1350 | 0,86 | 0,760 | 0,433 |
| BIR09 | Disolución transparente con material suspenso | Disolución transparente con material suspenso | 1,115 | 3000 | 0,37 | 0,315 | 0,154 |
| BIR09B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,275 | 100 | 12,75 | 11,091 | 5,165 |
| BIR12B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,167 | 200 | 5,84 | 4,877 | 2,564 |
| BIR16A | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,158 | 50 | 23,16 | 20,077 | 9,923 |

Tabla 6: Citrato de sodio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM, pH 6,01

| Péptido | Tampón citrato pH 6,0 | | Peso de péptido "tal cual" (mg) | Volumen requerido (µl) | Solubilidad [mg por ml "tal cual"] | Solubilidad [mg por ml] | Solubilidad [µmol por ml] |
|---------|---|--|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| | Comentarios | Solubilidad después de 24 horas | | | | | |
| BIR1I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,117 | 150 | 7,45 | 6,434 | 3,522 |
| BIR02I | Disolución turbia con material suspenso | Disolución turbia con material suspenso | 1,143 | 3000 | 0,38 | 0,325 | 0,236 |
| BIR02J | Completamente disuelto en 100 µl, se redisuelve en 3 ml después de 24 h | Se separa precipitado, se redisuelve | 1,172 | 3000 | 0,39 | 0,320 | 0,150 |
| BIR04 | Completamente disuelto. Evidencia de residuo en el filtro | Completamente disuelto. Residuo en el filtro | 1,011 | 100 | 10,11 | 8,758 | 4,261 |
| BIR07C | Completamente disuelto en 350 µl, se redisuelve en 3 ml después de 24 h | Se separa precipitado, se redisuelve | 1,045 | 3000 | 0,35 | 0,306 | 0,174 |
| BIR09 | Completamente disuelto | completamente disuelto | 1,084 | 1050 | 1,03 | 0,875 | 0,426 |
| BIR09B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,230 | 250 | 4,92 | 4,280 | 1,993 |
| BIR12B | Completamente disuelto. Evidencia de residuo en el filtro | Completamente disuelto. Residuo en el filtro | 1,026 | 450 | 2,28 | 1,906 | 1,002 |
| BIR16A | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,293 | 50 | 25,86 | 22,418 | 11,080 |

Tabla 7. Dihidrogenofosfato de potasio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM, pH 6,03

| Tampón fosfato pH 6,0 | | | Peso de péptido "tal cual" (mg) | Volumen requerido (µl) | Solubilidad [mg por ml "tal cual"] | Solubilidad [mg por ml] | Solubilidad [µmol por ml] |
|-----------------------|---|---|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Péptido | Comentarios | Solubilidad después de 24 horas | | | | | |
| BIR1I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,107 | 50 | 22,14 | 19,130 | 10,470 |
| RIR02I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,145 | 100 | 11,45 | 9,781 | 7,089 |
| BIR02I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,112 | 100 | 11,12 | 9,109 | 4,273 |
| BIR04 | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 0,986 | 100 | 9,86 | 8,541 | 4,155 |
| BIR07C | Completamente disuelto en 250 µl, se redisuelve en 3 ml después de 24 h | Se separa precipitado, se redisuelve | 1,245 | 3000 | 0,42 | 0,365 | 0,208 |
| BIR09 | Disolución transparente con material suspenso | Disolución transparente con material suspenso | 1,037 | 3000 | 0,35 | 0,293 | 0,143 |
| BIR09B | Completamente disuelto en 100 µl, se redisuelve en 3 ml después de 24 h | Se separa precipitado, se redisuelve | 1,086 | 3000 | 0,36 | 0,315 | 0,147 |
| BIR12B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,192 | 50 | 23,84 | 19,926 | 10,174 |
| BIR16A | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,077 | 50 | 21,54 | 18,673 | 9,229 |

Tabla 8: Dihidrogenofosfato de potasio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM, pH 7,03

| Tampón fosfato pH 7,0 | | | Peso de péptido "tal cual" (mg) | Volumen requerido (µl) | solubilidad [mg por ml "tal cual"] | Solubilidad [mg por ml] | Solubilidad [µmol por ml] |
|-----------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Péptido | Comentarios | Solubilidad después de 24 horas | | | | | |
| BIR1I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,039 | 50 | 20,78 | 17,955 | 9,827 |
| BIR02I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,190 | 100 | 11,90 | 10,165 | 7,368 |
| BIR02I | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,231 | 100 | 12,31 | 10,084 | 4,730 |
| BIR04 | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,075 | 50 | 21,50 | 18,624 | 9,061 |
| DIR07C | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,005 | 150 | 6,70 | 5,890 | 3,354 |
| BIR09 | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,138 | 750 | 1,52 | 1,286 | 0,627 |
| BIR09B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,085 | 50 | 21,70 | 18,876 | 8,790 |
| BIR12B | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,031 | 50 | 20,62 | 17,234 | 9,060 |
| BIR16A | Completamente disuelto | Completamente disuelto | 1,099 | 50 | 21,98 | 19,055 | 9,418 |

5 Ejemplo 9 - Anexo 1

ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD DE PÉPTIDOS

Metodología de solubilidad

10

Se prepararon los vehículos de formulación y se realizó la medición de pH.

- Pesada de péptidos.

15

- Se requirió aproximadamente 1 mg para cada evaluación.
- Se dispensaron materiales en recipientes adecuados para la posterior evaluación de la solubilidad, es

decir, viales para HPLC de vidrio transparente (con tapón roscado).

- Evaluación de la solubilidad (para cada matriz).
 - Se añadieron alícuotas de matriz (50 a 100- μ L) según se requiriera.
 - La solubilidad del péptido se interpretó por inspección visual.
 - Se registró la descripción de las características de la muestra tras la adición de cada alícuota del disolvente.
 - Repetir la evaluación visual de solubilidad después de 24 horas.
- Si un péptido se separó por precipitación de la disolución después de 24 horas, se añadió tampón adicional para producir una concentración final de aprox. 0,2 mM (200 nmoles por ml deben ser equivalentes a aproximadamente 0,35 mg/ml).
- Cálculo de las solubilidades de péptidos (evaluación inicial).
 - Basándose en la cantidad absoluta de polvo pesado.
 - Determinación de la concentración molar a la que la solubilidad se logró usando masas moleculares de péptidos y contenido de péptido y valores de pureza.

20 *Cálculos*

$$\text{Solubilidad mg / ml "tal cual"} = \frac{\text{peso (mg)}}{\text{dilución } (\mu\text{l})} \times 1000$$

$$\text{Solubilidad mg / ml} = \frac{\text{peso (mg)}}{\text{dilución } (\mu\text{l})} \times 1000 \times \% \text{ de contenido} \times \% \text{ de pureza}$$

25

$$\text{Solubilidad } \mu\text{mol / ml} = \frac{\text{peso (mg)}}{\text{dilución } (\mu\text{l})} \times 1000 \times \% \text{ de contenido} \times \% \text{ de pureza} \times \frac{1}{\text{Peso molecular}} \times 1000$$

Ejemplo 9 - Anexo 2

30 TAMPONES PARA SOLUBILIDAD INICIAL Y CRIBADO DE LA ESTABILIDAD

Cada matriz se preparó a una concentración de 10 mM del agente de tamponamiento. Cada tampón contuvo trehalosa dihidratada 260 mM (FW 378,3).

35 *Preparación de matriz*

El procedimiento indicado es para la preparación de 100 ml de cada tampón, pero pueden prepararse volúmenes alternativos ajustando las cantidades.

- Se prepararon disoluciones madre 0,1 M de citrato de sodio y dihidrogenofosfato de potasio.
 - Se transfirió el peso de trehalosa dihidratada equivalente a 260 mM a un recipiente de mezcla apropiado que contenía 70-80 ml de agua desionizada destilada y se dejó que se disolviera.
 - Se añadieron 10 ml de la disolución madre tampón apropiada 0,1 M al recipiente de mezcla y se agitó.
 - El pH de la matriz se ajustó al valor deseado añadiendo ácido clorhídrico 2 mM o hidróxido sódico 0,1 M según se requiriera.
 - Las disoluciones se diluyeron finalmente a 100 g de peso y se volvió a evaluar el pH.
- Los tampones para la solubilidad inicial y el cribado de la estabilidad, mostrados como sal tampón o modificador del pH / pH:

- 50 HCl 2 mM y trehalosa dihidratada 260 mM / pH 2,65
- Citrato de sodio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM / pH 3,01
- Citrato de sodio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM / pH 3,99
- Citrato de sodio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM / pH 5,02
- Citrato de sodio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM / pH 6,01
- 55 Dihidrogenofosfato de potasio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM / pH 6,03
- Dihidrogenofosfato de potasio 10 mM y trehalosa dihidratada 260 mM / pH 7,03

Ejemplo 10 - Ensayo de liberación de histamina

El fin de este ensayo era identificar composiciones que fueran capaces de activar los basófilos de la sangre (como sustituto de mastocitos de tejido) produciendo liberación de histamina que puede producir reacciones alérgicas durante la terapia. Una composición que comprende una mezcla de péptidos que inducen liberación de histamina puede considerarse frecuentemente inadecuada para su uso como vacuna.

La liberación de histamina requiere la reticulación de moléculas de IgE específicas adyacentes sobre la superficie del basófilo. Los péptidos que se evaluaron fueron pequeños (11 a 18 aminoácidos de longitud) y no deben, por tanto, poseer estructura terciaria significativa que les permita retener la conformación de un epítoto de unión a IgE de la molécula completa. Además, los monómeros de péptido en disolución, aunque están unidos por IgE, no deben ser capaces de reticular moléculas de IgE adyacentes.

Se evaluó la liberación de histamina de sangre completa periférica fresca de sujetos alérgicos al abedul. Se usaron basófilos de sangre periférica como sustituto de mastocitos de tejido que no fueron prácticos para el ensayo. Se incubó sangre *in vitro* con mezclas de péptidos identificadas como adecuadas basándose en los resultados de los Ejemplos 1 a 9 anteriores. Específicamente, se ensayaron las siguientes mezclas:

- Mezcla 1 - BIR01I, BIR02J, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C
- Mezcla 2 - BIR01I, BIR02J, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C, BIR09
- Mezcla 3 - BIR01I, BIR02J, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C, BIR09B
- Mezcla 4 - BIR01I, BIR02I, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C
- Mezcla 5 - BIR01I, BIR02I, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C, BIR09
- Mezcla 6 - BIR01I, BIR02I, BIR04, BIR12B, BIR16A, BIR07C, BIR09B

Se midió la liberación de histamina en respuesta a extracto de alérgeno del abedul completo en cada sujeto para confirmar la sensibilización a basófilos. Se incluyó un control positivo, que representa liberación de histamina total, generado por congelación/descongelación de las células dos veces, en cada ensayo. Se generó un control negativo para la liberación de histamina espontánea incubando células en tampón solo.

El ensayo se realizó usando el kit Immunotech Histamine Release Immunoassay según las instrucciones del fabricante. Tras la exposición *in vitro* de basófilos de la sangre a mezclas de péptido, alérgeno completo o tampón en pocillos de placa de microtitulación, los sobrenadantes se eliminaron y la histamina en las muestras se convirtió en acilhistamina. Se probaron muestras aciladas por un ELISA de acilhistamina competitivo.

Se ensayaron mezclas de péptido para su capacidad para inducir la liberación de histamina durante un intervalo de 5 log10 (1 a 10.000 ng/ml). El intervalo de concentración ensayado se seleccionó basándose en dosis *in vivo* teóricas de péptido que pueden lograrse durante la terapia. Por ejemplo, una dosis de 31 µg (aproximadamente 3 nmol/equivalente de péptido) de cada péptido que entra en un volumen de sangre de 5 litros, produciría una concentración en sangre de 6 ng/ml, en el extremo inferior del intervalo de dosis del ensayo de liberación de histamina. Se usó el extracto de alérgeno del abedul completo durante el mismo intervalo de concentración.

Se realizaron mediciones individuales para cada dilución. Después de completarse el ELISA, se determinaron niveles de histamina individuales por interpolación de la curva patrón generada en el ensayo de ELISA. Los resultados de muestras se ajustaron para permitir la dilución. Si dos o más diluciones consecutivas de una preparación de péptido/alérgeno provocaron >15 % de la liberación de histamina total observada en el control positivo congelado-descongelado (>15 % de control positivo), o si un único valor de >15 % de control positivo se logró a la mayor concentración probada (10 µg/ml para péptidos), esto se consideró una "liberación de histamina positiva".

Se completaron un total de 40 ensayos de liberación de histamina durante el estudio. De estos 5 ensayos se rechazaron debido a que dejaron de cumplir controles de QC apropiados, por ejemplo, debido a niveles inaceptablemente altos (>15 % de control positivo) de liberación espontánea en el medio más pocillos de control negativo de tampón.

Las mezclas probadas mostraron todas buenas propiedades de liberación de histamina. Los hallazgos del estudio se resumen del siguiente modo: (WA = alérgeno completo)

| Mezcla | Conc. de péptido: µg/ml | % promedio de liberación de histamina | Mezcla | Conc. de péptido: µg/ml | % promedio de liberación de histamina |
|--------|-------------------------|---------------------------------------|--------|-------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 10 | 1 % | 5 | 10 | 2 % |
| 1 | 1 | 2 % | 5 | 1 | 2 % |
| 1 | 0,1 | 3 % | 5 | 0,1 | 2 % |
| 1 | 0,01 | 3 % | 5 | 0,01 | 2 % |

ES 2 573 651 T3

| Mezcla | Conc. de péptido: µg/ml | % promedio de liberación de histamina | Mezcla | Conc. de péptido: µg/ml | % promedio de liberación de histamina |
|--------|----------------------------|--|--------|----------------------------|---|
| 1 | 0,001 | 2 % | 5 | 0,001 | 2 % |
| 2 | 10 | 2 % | 6 | 10 | 3 % |
| 2 | 1 | 2 % | 6 | 1 | 2 % |
| 2 | 0,1 | 3 % | 6 | 0,1 | 1 % |
| 2 | 0,01 | 3 % | 6 | 0,01 | 1 % |
| 2 | 0,001 | 2 % | 6 | 0,001 | 2 % |
| 3 | 10 | 4 % | WA | 10 | 65 % |
| 3 | 1 | 2 % | WA | 1 | 38 % |
| 3 | 0,1 | 3 % | WA | 0,1 | 38 % |
| 3 | 0,01 | 2 % | WA | 0,01 | 42 % |
| 3 | 0,001 | 2 % | WA | 0,001 | 43 % |
| 4 | 10 | 2 % | | | |
| 4 | 1 | 2 % | | | |
| 4 | 0,1 | 2 % | | | |
| 4 | 0,01 | 1 % | | | |
| 4 | 0,001 | 1 % | | | |

REIVINDICACIONES

1. Una composición adecuada para su uso en prevenir o tratar alergia al polen del abedul que comprende:

- 5 i) el polipéptido de SEQ ID NO: 74 (BIR12B; AKYMVIQGEPRVIRGK), o una variante del mismo, y
 ii) el polipéptido de SEQ ID NO: 53 (Bir02J; PAARMFKAFILEGDKLVPK), o una variante del mismo,
 en la que dicha variante de un polipéptido es:
- 10 I) hasta 20 aminoácidos de longitud y comprende la secuencia de dicho polipéptido, o
 II) hasta 20 aminoácidos de longitud y comprende una secuencia que tiene al menos el 85 % de homología
 con la secuencia de dicho polipéptido y que es reconocida por un linfocito T que reconoce dicho polipéptido;
 o
 III) 9 a 20 aminoácidos de longitud y comprende una secuencia de al menos 9 aminoácidos contiguos de la
 secuencia de dicho polipéptido, o una secuencia que tiene al menos el 85 % de homología con dicho al
 15 menos 9 aminoácidos contiguos, cuya secuencia de al menos 9 aminoácidos contiguos o secuencia
 homóloga es reconocida por un linfocito T que reconoce dicho polipéptido.

2. Una composición según la reivindicación 1, que comprende además al menos un polipéptido adicional de SEQ ID
 NO: 72 (BIR11; FPQFKPQEITGIMK), SEQ ID NO: 71 (BIR10; GSVWAQSSSFPQFK), SEQ ID NO: 73 (BIR12A;
 20 PTGMFVAGAKYMVIQGR), SEQ ID NO: 75 (BIR13; IKYMVIQGEAGAVIRGK), SEQ ID NO: 76 (BIR14;
 EAGAVIRGKKGSGGIT), SEQ ID NO: 48 (Bir011; FNYETETTSVIPAAARK), SEQ ID NO: 54 (Bir04;
 PGTIKKISFPEGFPFKYV), SEQ ID NO: 67 (Bir09; ETLRAVESYLLAHS DAY), SEQ ID NO: 60 (BIR07;
 SNEIKIVATPDGGSILK), SEQ ID NO: 63 (Bir07C; SNEIKIVATPEGGSILK), SEQ ID NO: 77 (BIR15;
 SLNTRLRLRRIFDLFDK) o SEQ ID NO: 78 (BIR16A; AERERIFKRFDANGEGK), o una variante de los mismos,
 25 en la que dicha variante de un polipéptido es una variante según al menos una de las partes I), II) y III) de la
 reivindicación 1.

3. Una composición según la reivindicación 1 o 2 que comprende:

- 30 (a) el polipéptido Bir12B (AKYMVIQGEPRVIRGK), o una variante del mismo;
 (b) el polipéptido Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK), o una variante del mismo; y
 (c) el polipéptido Bir011 (FNYETETTSVIPAAARK) o una variante del mismo,

en la que dicha variante de un polipéptido es una variante según al menos una de las partes I), II) y III) de la
 35 reivindicación 1.

4. Una composición según la reivindicación 3, que comprende el polipéptido Bir12B (AKYMVIQGEPRVIRGK) o
 una variante del mismo, el polipéptido Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK) o una variante del mismo, el polipéptido
 40 Bir011 (FNYETETTSVIPAAARK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir04 (PGTIKKISFPEGFPFKYV) o una
 variante del mismo, el polipéptido Bir09 (ETLRAVESYLLAHS DAY) o una variante del mismo, el polipéptido Bir07C
 (SNEIKIVATPEGGSILK) o una variante del mismo, y el polipéptido Bir16A (AERERIFKRFDANGEGK) o una variante
 del mismo,
 en la que dicha variante de un polipéptido es una variante según al menos una de las partes I), II) y III) de la
 45 reivindicación 1.

5. Una composición según la reivindicación 3, que comprende el polipéptido Bir12B (AKYMVIQGEPRVIRGK) o
 una variante del mismo, el polipéptido Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK) o una variante del mismo, el polipéptido
 50 Bir011 (FNYETETTSVIPAAARK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir04 (PGTIKKISFPEGFPFKYV) o una
 variante del mismo, el polipéptido Bir07C (SNEIKIVATPEGGSILK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir16A
 (AERERIFKRFDANGEGK) o una variante del mismo, y el polipéptido Bir09B (KEMGETLRAVESYLLAHS) o una
 variante del mismo,
 en la que dicha variante de un polipéptido es una variante según al menos una de las partes I), II) y III) de la
 reivindicación 1.

6. Una composición según la reivindicación 3, que comprende el polipéptido Bir12B (AKYMVIQGEPRVIRGK) o
 una variante del mismo, el polipéptido Bir02J (PAARMFKAFILEGDKLVPK) o una variante del mismo, el polipéptido
 55 Bir011 (FNYETETTSVIPAAARK) o una variante del mismo, el polipéptido Bir04 (PGTIKKISFPEGFPFKYV) o una
 variante del mismo, el polipéptido Bir07C (SNEIKIVATPEGGSILK) o una variante del mismo, y el polipéptido Bir16A
 (AERERIFKRFDANGEGK) o una variante del mismo,
 60 en la que dicha variante de un polipéptido es una variante según al menos una de las partes I), II) y III) de la
 reivindicación 1.

7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la variante de un
 polipéptido tiene 1 a 4 deleciones de aminoácido del extremo N-terminal o extremo C-terminal de la secuencia de
 65 dicho polipéptido.

8. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la variante de un polipéptido tiene 1 a 5 sustituciones de aminoácidos conservativas en la secuencia de dicho polipéptido.

9. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que:

- 5
- dicha variante de Bir01I es Bir01F (FNYETEATSVIPAARK), Bir01G (FNYEIEATSVIPAARK) o Bir01H (FNYEIEETTSVIPAARK); y/o
 - dicha variante de Bir02J es Bir02E (PAARLFKAFILEGDTLIPK), Bir02G (PAARLFKAFILEGDNLIPK), Bir02I (PAARMFKAFILD) o Bir02D (PAARMFKAFILDGDKLVPK); y/o
 - 10 - dicha variante de Bir09 es Bir09A (GETLLRAVESYLLAHS), Bir09B (KEMGETLLRAVESYLLAHS) o Bir09C (KEKGETLLRAVESYLLAHS); y/o
 - dicha variante de Bir16A es Bir16B (AERERIFKRFDAGGEGK).

10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o más de los polipéptidos tienen una o más modificaciones seleccionadas de las siguientes:

- 15
- (i) acetilación del N-terminal;
 - (ii) amidación del C-terminal;
 - 20 (iii) uno o más hidrógenos sobre las aminas de cadena lateral de arginina y/o lisina sustituidos por un grupo metileno;
 - (iv) glucosilación; y
 - (v) fosforilación.

11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una disolución que comprende cada polipéptido a una concentración en el intervalo de 0,03 a 200 nmol/ml, 0,3 a 200 nmol/ml, 50 a 200 nmol/ml o 30 a 120 nmol/ml.

12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una composición farmacéutica que comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

13. La composición según la reivindicación 12, que se formula para administración oral, administración nasal, administración tópica, administración subcutánea, administración sublingual, administración intradérmica, administración por bucal, administración epidérmica, o para administración por inhalación, por inyección, o por un parche.

14. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en un método para prevenir o tratar alergia al polen del abedul.

15. Un método *in vitro* de determinar si linfocitos T reconocen una composición como se define en la reivindicación 1 que comprende poner en contacto dichos linfocitos T con dicha composición y detectar si dichos linfocitos T se estimulan por dicha composición.

16. El método *in vitro* según la reivindicación 15, que se lleva a cabo para determinar si un individuo tiene, o está en riesgo de tener, una alergia al polen del abedul.