

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 562**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2009 PCT/IB2009/055508**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10067286**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2009 E 09793590 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2376108**

54 Título: **Vacuna de péptido CH3 de IgE**

30 Prioridad:

**09.12.2008 US 120989 P**

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

**06.07.2017**

73 Titular/es:

**Pfizer Vaccines LLC (100.0%)  
253 East, 42nd Street  
New York NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**BROWN, ALAN DANIEL;  
CHAMPION, BRIAN ROBERT;  
CHRISTY, CLARE;  
GERVAIS, DAVID PAUL;  
JONES, LYN HOWARD;  
KJERRSTROM, ANNE MARIA KRISTINA;  
PRYDE, DAVID CAMERON;  
ROBERTS, LEE RICHARD y  
WYATT, DAVID MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 622 562 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

Vacuna de péptido CH3 de IgE

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al suministro de inmunógenos novedosos que comprenden un péptido de IgE antigénico unido a un vehículo inmunogénico para la prevención, tratamiento o alivio de trastornos mediados por IgE. La invención se refiere además a procedimientos de producción de estos medicamentos, composiciones inmunogénicas y composición farmacéutica de los mismos y su uso en medicina.

**Antecedentes**

10 Durante las últimas décadas, las enfermedades alérgicas han aumentado hasta proporciones casi epidémicas y las estimaciones sugieren que el 20-30 % de la población total en muchos países occidentales está afectada. El papel clave desempeñado por la IgE en el inicio de las respuestas alérgicas está bien documentado. Tras la liberación de linfocitos B, la IgE se une al receptor de IgE de alta afinidad (FceRI) presente en mastocitos y basófilos. La reticulación posterior de moléculas de IgE adyacentes en estas células por alérgenos específicos da como resultado  
15 leucotrienos, prostaglandinas), así como de citocinas y quimiocinas clave. Por consiguiente, las respuestas locales agudas están seguidas por reclutamiento y activación de otras células inflamatorias (por ejemplo, eosinófilos, linfocitos T) amplificando de este modo la cascada alérgica. Las células dendríticas, por ejemplo, las presentes en sitios de inflamación alérgica (por ejemplo el pulmón), también pueden expresar FceRI y pueden usar este receptor para captar selectiva y eficazmente los alérgenos presentes en inmunocomplejos con IgE y procesar estos alérgenos selectivamente para su presentación a células T específicas de alérgeno, proporcionando de este modo  
20 un mecanismo para la activación persistente de células T y respuestas inflamatorias patológicas.

La mayoría de los regímenes de tratamiento actuales tienen como objetivo aliviar los síntomas más que tratar la causa de la enfermedad y se basan principalmente en el uso de antihistamínicos, antileucotrienos, cromoglicatos, beta-agonistas y en compuestos antiinflamatorios generales tales como corticosteroides. Aunque algunos de los  
25 pacientes afectados tienen su enfermedad relativamente bien controlada con estos fármacos, su frecuencia de administración (con frecuencia diariamente o incluso varias veces al día) conduce con frecuencia a una escasa conformidad del paciente y al posterior empeoramiento de la enfermedad. Además, en algunos casos tales como asma grave y dermatitis atópica grave, las terapias existentes son insuficientes para controlar la enfermedad.

Muy recientemente, un anticuerpo monoclonal (omalizumab, también denominado E25, comercializado con el nombre comercial Xolair®; Presta y col. *J Immunol*, 1 sep 1993;151 (5): 2623-32) obtuvo la autorización de varias  
30 agencias alrededor del mundo, principalmente para el tratamiento del asma grave y de la rinitis. A pesar de que muestra eficacia frente al asma grave, este anticuerpo todavía tiene algunos inconvenientes. En primer lugar es un anticuerpo monoclonal murino humanizado y como tal, no excluye totalmente reacciones inmunológicas en pacientes humanos, dando origen posiblemente por lo tanto a algunas preocupaciones de seguridad. En segundo  
35 lugar, la dosis de omalizumab usada en el tratamiento del asma grave se basa tanto en el peso corporal como en el nivel de IgE libre circulante. Se recomienda que los pacientes cuyo peso corporal e IgE libre circulante se desvíen de un intervalo especificado no usen este tratamiento. Los pacientes que pueden tratarse pueden requerir recibir hasta tres inyecciones subcutáneas una vez cada dos semanas. Esto afecta mucho a los costes de tratamiento (que se estima que oscilan entre 15.000-44.000 US\$ anualmente por paciente), así como sobre la calidad de vida de los  
40 pacientes, haciendo difícil usarlo como una estrategia general para el tratamiento de alergias.

Para superar los problemas del alto coste y las administraciones frecuentes, una alternativa es hacer funcionar el propio sistema inmune para producir los anticuerpos terapéuticos por vacunación.

45 En el transcurso de sus investigaciones, los trabajadores anteriores en el campo de la alergia han encontrado varias consideraciones y problemas, que deben tenerse en cuenta cuando se diseñan nuevas terapias antialergia. Uno de los problemas más peligrosos gira en torno a la implicación de la reticulación de IgE en la señal de liberación de histamina. El caso más frecuente es que la generación de anticuerpos anti-IgE durante la vacunación activa es capaz de desencadenar la liberación de histamina por sí misma, mediante la reticulación de complejos de IgE-receptor vecinos en ausencia de alérgeno. Este fenómeno se denomina anafilactogenicidad. De hecho, muchos anticuerpos monoclonales anti-IgE disponibles en el mercado que se usan normalmente para ensayos de detección  
50 de IgE son anafilactogénicos y por consiguiente inútiles y potencialmente peligrosos si se administran a un paciente. Por lo tanto, para ser seguros y eficaces, los anticuerpos administrados de forma pasiva o inducidos por vacuna, deben unirse en una región de la IgE que sea capaz de, inhibir las actividades de IgE sin ser anafilácticos por sí mismos.

55 Se ha resuelto la estructura de los dominios constantes CH3-CH4 de la IgE humana que interactúan con la subunidad alfa del receptor de alta afinidad de IgE FceRI (Wurzburg BA y col. (2000) *Immunity* 13 (3) 375-85; Garman SC y col., (2000) *Nature* 20; 406 (6793): 259-66). El trabajo anterior también ha identificado varios péptidos de IgE o péptidos derivados o mimótopos que se consideran útiles para inducir anticuerpos anti-IgE no anafilactogénicos (documentos WO 1993/005810; WO99/67293; WO2004/058799, WO9731948, WO2000/25722, WO05/075504, US2002/0645525, US2004/146504 y US2006/062782; WO00/050461, WO02/34288 y  
60 WO2003/092714; Chen y col. (2008) *J. Immunologic. Meth.* 333: 10-23; Hellman *Expert Rev. Vaccines* 7 (2): 193-208 (2008)). Dichos dominios o péptidos de IgE están habitualmente unidos a vehículos para aumentar su inmunogenicidad para romper la autotolerancia a IgE en un individuo.

65 Por lo tanto es deseable proporcionar una composición, tal como un péptido de IgE antigénico o la combinación de varios de los mismos acoplados a un vehículo inmunogénico y opcionalmente administrado con uno o más adyuvantes, capaz de inducir anticuerpos anti-IgE potentes no anafilactogénicos en un individuo capaces de reducir

significativamente los niveles de IgE libre circulante. Típicamente una potencia aumentada daría como resultado los siguientes beneficios: serían necesarias menores dosis para conseguir beneficios clínicos, sería necesario un menor volumen de inyección por ejemplo para administración subcutánea o intramuscular (en comparación con terapias de anticuerpos monoclonales, por ejemplo), menor coste de tratamiento, mayores posibilidades de éxito del tratamiento, frecuencia de administración disminuida en el régimen del tratamiento, proporcionando por lo tanto acceso a tratamiento a una población de pacientes más amplia, incluyendo pacientes con mayor peso corporal y/o niveles elevados de IgE circulante y mejorando la calidad de vida de los pacientes.

### Sumario de la divulgación

La presente divulgación se refiere a un inmunógeno que comprende un péptido de IgE antigénico preferentemente unido a un vehículo inmunogénico. Dicho péptido antigénico de IgE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.º: 1 a 430, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.º: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.º: 220 a 430. Dicho péptido de IgE antigénico podría estar modificado con fines de conjugación, preferentemente mediante la adición de restos de cisteína o lisina y/o la adición de engarces tales como engarces GC/GGC. En realizaciones preferidas, dicho péptido de IgE antigénico está limitado conformacionalmente, preferentemente limitado de forma simple. Dicho vehículo inmunogénico es una proteína heteróloga, preferentemente una partícula similar a virus (VLP), más preferentemente una VLP de HBcAg, HBsAg o Qbeta. La divulgación también se refiere a procedimientos para producir dicho péptido de IgE antigénico preferentemente unido a un vehículo inmunogénico.

La divulgación también se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden dicho péptido de IgE antigénico preferentemente unido a un vehículo inmunogénico, preferentemente a composiciones inmunogénicas, que opcionalmente comprenden un adyuvante preferentemente seleccionado del grupo constituido por alumbre; oligonucleótidos que contienen CpG, preferentemente CpG7909 y CpG24555; y adyuvantes basados en saponina, preferentemente Iscomatrix. Preferentemente, dicho ácido nucleico que contiene CpG comprende uno o más enlaces modificados, preferentemente uno o más enlaces fosforitoato, aún más preferentemente todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces fosforitoato.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido de IgE antigénico de acuerdo con la divulgación o una composición inmunogénica del mismo, así como a usos médicos de dichas composiciones.

En particular, la divulgación se refiere a un péptido de IgE antigénico de acuerdo con la divulgación, o a una composición inmunogénica o farmacéutica del mismo, para el uso como medicamento, preferentemente en el tratamiento, alivio o profilaxis de trastornos mediados por IgE. La divulgación también se refiere a procedimientos para inducir una respuesta inmune en un individuo contra IgE propia y a procedimientos para tratar, aliviar o prevenir trastornos mediados por IgE que comprenden administrar una cantidad eficaz de dicho péptido de IgE antigénico o composición inmunogénica o farmacéutica del mismo.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: presentación estructural de la interacción entre la región CH3-CH4 de IgE humana con su receptor de alta afinidad FcεRI. Se presentan 4 bucles (azul, morado, naranja y amarillo) que se corresponden con los 4 péptidos de las SEC ID N.º: 165, 312, 1 y 220 respectivamente.

Figura 2. Representaciones gráficas de formatos de péptidos para inducir respuestas de anticuerpos contra epítopes definidos estructuralmente de IgE humana.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones y técnicas generales

A menos que se defina otra cosa en este documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los especialistas en la técnica. Generalmente, la nomenclatura usada en relación con y las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en este documento, es la bien conocida y comúnmente usada en la técnica.

Los procedimientos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan por toda la presente memoria descriptiva a menos que se indique otra cosa. Véase, por ejemplo, Sambrook J. y Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2000); Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow y Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1998); y Coligan y col., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en este documento.

La nomenclatura usada en relación con y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritos en este documento son los bien conocidos y usados comúnmente en la técnica.

Por toda esta memoria descriptiva y reivindicaciones, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un número entero indicado o grupo de números enteros indicados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. Los términos

“que comprende”, “constituido por” y “constituido esencialmente por” pretenden usarse indistintamente. Cuando los términos “un”, “una” o “uno” se usan en esta divulgación, significan “al menos un” o “uno o más” a menos que se indique otra cosa. Además, a menos que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

## 5 Definiciones generales:

10 El término “péptido” o “polipéptido” se refiere a un polímero de aminoácidos independientemente de la longitud del polímero; por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen en la definición de polipéptido. Este término tampoco especifica o excluye modificaciones post-expresión de polipéptidos, por ejemplo, polipéptidos que incluyen la unión covalente de grupos glucosilo, grupos acetilo, grupos fosfato, grupos lipídicos y similares se incluyen expresamente en el término polipéptido. También se incluyen en la definición polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos de origen no natural, aminoácidos que solo aparecen de forma natural en un sistema biológico no relacionado, aminoácidos modificados de sistemas de mamíferos, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural.

15 Las expresiones “proteína aislada”, “polipéptido aislado” o “péptido aislado” son de una proteína, polipéptido o péptido que en virtud de su origen o fuente de obtención (1) no está asociada con los componentes con los que se asocia de forma natural que la acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no se da en la naturaleza. Por lo tanto, un péptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que procede de forma natural estará “aislado” de sus componentes con los que se asocia de forma natural. Una proteína también puede liberarse sustancialmente de sus componentes asociados de forma natural por aislamiento, usando procedimientos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

20 Como se usa en este documento, cuando se usa el término “purificado” en relación con una molécula (por ejemplo, un péptido, polipéptido o proteína) significa que la concentración de la molécula que se está purificando se ha aumentado respecto a moléculas asociadas con ella en su entorno natural, o en el entorno en el que se ha producido, encontrado o sintetizado. Las moléculas asociadas de forma natural incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares pero generalmente no incluyen agua, tampones ni reactivos añadidos para mantener la integridad o facilitar la purificación de la molécula que se está purificando.

25 En algunas realizaciones, un compuesto es sustancialmente puro o está sustancialmente purificado cuando está al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 % o al menos el 60 % en peso libre de moléculas orgánicas con las que se asocia de forma natural o con las que se asocia durante la fabricación. En algunas realizaciones, la preparación es de al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % en peso del compuesto de interés respecto a sus contaminantes.

30 Un compuesto sustancialmente puro o purificado puede obtenerse, por ejemplo, por extracción a partir de una fuente natural (por ejemplo, bacterias), por síntesis química de un compuesto, o por una combinación de purificación y modificación química. Un compuesto sustancialmente puro o purificado también puede obtenerse, por ejemplo, por enriquecimiento de una muestra que tiene un compuesto que se une a un anticuerpo de interés. La pureza puede medirse por cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, cromatografía, espectroscopía de masas, análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento, etc.

35 El término “heterólogo”, como se usa en este documento en el contexto de un péptido o polipéptido de IgE, donde una proteína de fusión de polipéptido de IgE comprende un péptido o polipéptido de IgE y un polipéptido “heterólogo”, se refiere a un polipéptido que es distinto de un péptido o polipéptido de IgE, por ejemplo, un polipéptido que no se asocia normalmente en la naturaleza con un péptido o polipéptido de IgE. Por ejemplo, un polipéptido heterólogo no presenta una identidad de secuencia de aminoácidos significativa con el péptido o polipéptido de IgE, por ejemplo, el polipéptido heterólogo tiene una identidad de secuencia de aminoácidos menor de aproximadamente el 50 %, menor de aproximadamente el 40 %, menor de aproximadamente el 30 % o menor de aproximadamente el 20 % con el péptido o polipéptido de IgE.

40 Como se usa en este documento, la expresión “trastorno mediado por IgE” o “trastorno relacionado con IgE” se refiere a una afección o enfermedad que se caracteriza por la superproducción y/o hipersensibilidad a la inmunoglobulina IgE. En concreto se interpretaría que incluye afecciones asociadas con un hipersensibilidad anafiláctica y alergias atópicas, incluyendo, por ejemplo: asma, asma alérgica, rinitis y conjuntivitis alérgica (fiebre del heno), eccema, urticaria, dermatitis atópica y alergias alimentarias incluyendo alergia a cacahuets. La afección fisiológica grave de choque anafiláctico causada, por ejemplo, por picaduras de abeja, mordeduras de serpiente, alimentos o medicación, también se incluye en el alcance de este término. Otros trastornos mediados por IgE incluyen anafilaxia, dermatitis de contacto, gastroenteropatía alérgica, aspergilosis pulmonar alérgica, púrpura alérgica, eccema, síndrome de hiper IgE (de Job), hipersensibilidad anafiláctica, mieloma de IgE, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada y colitis infecciosa), urticaria y psoriasis.

## Péptido de IgE antigénico de la invención

60 La presente invención se refiere a péptidos de IgE y péptidos derivados de los mismos que se han identificado como porciones del dominio CH3 de IgE capaces de formar bucles que participan en la interacción de la región CH3-CH4 con su receptor de alta afinidad FcεRI (consúltese la figura 1). Se demostró que dichos péptidos de IgE eran inmunogénicos y no anafilactogénicos.

65 Dichos péptidos de IgE antigénicos pueden usarse en solitario o en combinación, preferentemente cuando se conjugan con un vehículo inmunogénico, para inducir autoanticuerpos anti-IgE en un sujeto para tratar, prevenir o

mejorar trastornos relacionados con IgE.

En particular, la presente invención se refiere a un inmunógeno constituido por, constituido esencialmente por o que comprende un péptido de IgE antigénico preferentemente unido a un vehículo inmunogénico.

5 En una realización, el péptido de IgE antigénico de la divulgación está constituido por, está constituido esencialmente por o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente seleccionadas del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430. En otra realización, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, está constituido esencialmente por o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente seleccionadas del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153. En otra realización, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, está constituido esencialmente por o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 a 219 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente seleccionadas del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 a 219. En otra realización más, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, está constituido esencialmente por o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 310 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente seleccionadas del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 310. En otra realización más, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, está constituido esencialmente por o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 a 430 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente seleccionadas del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 a 430.

20 La expresión "péptido de IgE antigénico", dentro del significado de la presente divulgación incluye todos los péptidos derivados de CH3 de IgE, preferentemente de especies de mamíferos, más preferentemente de seres humanos, así como sus variantes, análogos, ortólogos, homólogos y derivados y fragmentos de los mismos que presenten una "actividad biológica de péptido de IgE antigénico". Preferentemente, la expresión "péptido de IgE antigénico" se refiere a péptidos que comprenden, están constituidos por o están constituidos esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, así como a sus variantes, homólogos y derivados que presentan esencialmente la misma actividad biológica. Más preferentemente, la expresión "péptido de IgE antigénico" se refiere a péptidos que comprenden, que están constituidos por o que están constituidos esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente a péptidos que comprenden, que están constituidos por o que están constituidos esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente, a péptidos que comprenden, que están constituidos por o que están constituidos esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430.

35 En una realización, el péptido de IgE antigénico de la invención está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 y 430.

55 En otra realización, el péptido de IgE antigénico de la invención está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152 y 153.

65 Preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 133, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 144, 145 y 148. Más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o está constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 63,

64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 99, 100, 101, 102, 103, 109, 110, 111, 112, 118, 119, 120, 126, 127, 133 y 139. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o está constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 63, 64, 65, 66, 67, 76, 77, 78, 79, 88, 89, 90, 99, 100, 101 y 109. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o está constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21, 22, 34, 35, 36, 37, 49, 50, 51, 63, 64 y 76. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 18, 19 y 34. Lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 o 18.

En otra realización, el péptido de IgE antigénico de la divulgación está constituido por, o constituido esencialmente por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218 y 219. Preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 192, 193, 194, 195, 196, 199, 200, 201, 202, 205, 206, 207, 210, 211, 214 y 217. Más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 165, 166, 167, 168, 169, 175, 176, 177, 178, 184, 185, 186, 192, 193, 199 y 200. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154, 155, 156, 165, 166 y 175. Lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.<sup>o</sup>: 154 o 165.

En otra realización, el péptido de IgE antigénico de la invención está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309 y 310. Preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 283, 284, 285, 286, 287, 290, 291, 292, 293, 296, 297, 298, 301, 302 y 305. Más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 256, 257, 258, 259, 260, 266, 267, 268, 269, 275, 276, 277, 283, 284 y 290. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 233, 234, 235, 236, 245, 246, 247, 256, 257 y 266. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 233, 234 y 245. Lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>o</sup>: 220 o 233.

En otra realización más, el péptido de IgE antigénico de la invención está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 y 430. Preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 395, 396, 397, 398, 399, 399, 399, 400, 401, 402, 403, 398, 399, 400, 403, 404, 405, 406, 407, 410, 411, 412, 413, 416, 417, 418, 421, 422 y 425. Más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 380, 386, 387, 388, 389, 395, 396, 397, 403, 404 y 410. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 340, 341, 342, 343, 344, 353, 354, 355, 356, 365, 366, 367, 376, 377 y 386. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 326, 327, 328, 340, 341 y 353. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312 y 326. Lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.<sup>o</sup>: 311 o 312.

La expresión "actividad biológica de péptido de IgE antigénico", cuando se usa en este documento, se refiere a la capacidad de los péptidos de IgE antigénicos de la divulgación para inducir autoanticuerpos anti-IgE en un paciente, con un perfil antagonista, siendo dichos autoanticuerpos capaces de disminuir el nivel de IgE libre circulante sin causar ninguna liberación significativa de mediadores inflamatorios mediada por IgE y siendo al mismo tiempo sustancialmente incapaces de unirse a IgE unida a su receptor de alta afinidad. Será evidente para el especialista en la técnica qué técnicas pueden usarse para confirmar si una construcción específica se incluye en el alcance de la presente invención. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación, las técnicas descritas en la sección de Ejemplos de la presente solicitud y también lo siguiente. El supuesto péptido puede ensayarse para determinar la inmunogenicidad de la construcción, en el sentido de que los antisueros generados por el supuesto péptido presenten reacción cruzada con la molécula de IgE nativa y también sean funcionales en el bloqueo de la liberación de mediadores alérgicos a partir de células efectoras alérgicas. La especificidad de estas respuestas puede confirmarse mediante ensayos funcionales en los que puede cuantificarse la precipitación de IgE y/o por inhibición de la desgranulación de células que expresan el receptor de IgE, o mediante experimentos de competición por bloqueo de la actividad del antisuero con el propio péptido o la IgE nativa y/o anticuerpos monoclonales específicos que se sabe que se unen al epítipo en el interior de la IgE. También son bien conocidos por los especialistas en la técnica procedimientos para determinar la unión a IgE-FcRI.

En una realización los péptidos de IgE antigénicos de la presente invención son de un tamaño tal que mimetizan una región seleccionada del dominio completo de IgE en el que se encuentra el epítipo nativo. En una realización particular, los péptidos de IgE antigénicos de la invención, tienen una longitud de menos de 100 aminoácidos, preferentemente más corta de 75 aminoácidos, más preferentemente menor de 50 aminoácidos, aún más preferentemente menor de 40 aminoácidos. Los péptidos de IgE antigénicos de la divulgación tienen típicamente una longitud de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos, preferentemente de 4 a 20 aminoácidos, por ejemplo de 6 a 12 o de 6 a 9 aminoácidos.

Se proporcionan ejemplos específicos de péptidos de IgE antigénicos de la divulgación en la lista de secuencias e incluyen péptidos que varían de 4 a 20 aminoácidos de longitud.

Los péptidos antigénicos de la divulgación incluyen una secuencia de aminoácidos de una porción de CH3 de IgE humana, correspondiéndose dicha porción derivada de CH3 humana con la secuencia de aminoácidos de la IgE de origen natural o correspondiéndose con una IgE variante, es decir la secuencia de aminoácidos de la IgE de origen natural en la que se han sustituido, añadido o delecionado un pequeño número de aminoácidos pero que conserva esencialmente las mismas propiedades inmunológicas. Además, dicha porción de CH3 de IgE derivada puede modificarse adicionalmente mediante aminoácidos, especialmente en los extremos N- y C-terminales para permitir que el péptido de IgE antigénico se limite conformacionalmente y/o para permitir el acoplamiento del péptido de IgE antigénico con un vehículo inmunogénico después de que se haya realizado una química apropiada.

Los péptidos de IgE antigénicos de la presente divulgación incluyen péptidos variantes funcionalmente activos derivados de la secuencia de aminoácidos de CH3 de IgE en la que se han delecionado, insertado o sustituido aminoácidos sin devaluar esencialmente las propiedades inmunológicas de la misma, es decir dichos péptidos variantes funcionalmente activos conservan una actividad biológica de péptido de IgE antigénico sustancial. Típicamente, dichos péptidos funcionalmente variantes tienen una secuencia de aminoácidos homóloga, preferentemente altamente homóloga, con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430.

En una realización, dichos péptidos variantes funcionalmente activos presentan una identidad de al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430.

La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina identidad de secuencia se mide típicamente usando un programa informático de análisis de secuencia. El programa informático de análisis de proteína empareja secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que pueden usarse con los parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA usando los parámetros por defecto o recomendados, un programa en el GCG Versión 6.1. El FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132: 185-219 (2000)). Un algoritmo alternativo cuando se compara una secuencia de la divulgación con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando los parámetros por defecto. Véanse, por ejemplo, Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990); Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402 (1997).

Las variantes funcionalmente activas comprenden variantes funcionalmente activas de origen natural tales como variantes alélicas y variantes de especies y variantes funcionalmente activas de origen no natural que pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

Una variante funcionalmente activa difiere en aproximadamente, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos aminoacídicos de cualquiera de los péptidos mostrados en las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente en las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente en las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430 y aún conserva una

actividad biológica de IgE antigénica. Cuando esta comparación requiere alineamiento las secuencias se alinean para una homología máxima. El lugar de variación puede darse en cualquier sitio del péptido, siempre que la actividad biológica sea sustancialmente similar a un péptido mostrado en las SEC ID N.ºs: 1 a 430, más preferentemente sustancialmente similar a un péptido mostrado en las SEC ID N.ºs: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente sustancialmente similar a un péptido mostrado en las SEC ID N.ºs: 220 a 430.

Se proporcionan orientaciones en relación con cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silentes en Bowie y col., *Science*, 247: 1306-1310 (1990), que muestra que existen dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio.

La primera estrategia aprovecha la tolerancia de sustituciones de aminoácidos por selección natural durante el procedimiento de la evolución. Por comparación de las secuencias de aminoácidos en diferentes especies, pueden identificarse las posiciones aminoacídicas que se han conservado entre especies. Estos aminoácidos conservados son probablemente importantes para la función de la proteína. Por el contrario, las posiciones aminoacídicas en las que se han tolerado sustituciones por selección natural indican posiciones que no son críticas para la función de la proteína. Por lo tanto, las posiciones que toleran la sustitución de aminoácidos pueden modificarse al tiempo que se mantiene aún una actividad inmunogénica específica del péptido modificado.

La segunda estrategia usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones críticas para la función de la proteína. Por ejemplo, puede usarse mutagénesis dirigida o mutagénesis mediante alanina (Cunningham y col., *Science*, 244: 1081-1085 (1989)). Los péptidos variantes resultantes pueden ensayarse después para determinar la actividad biológica de IgE antigénica específica.

De acuerdo con Bowie y col., estas dos estrategias han puesto de manifiesto que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además qué cambios de aminoácidos es posible que se permitan en ciertas posiciones aminoacídicas en la proteína. Por ejemplo, los restos aminoacídicos más enterrados o interiores (en el interior de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, mientras que generalmente están conservadas escasas características de cadenas laterales de superficie o exteriores.

Los especialistas en la técnica conocen bien procedimientos para introducir una mutación en aminoácidos de una proteína. Véanse, por ejemplo, Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, E. F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)).

También pueden introducirse mutaciones usando kits disponibles en el mercado tales como "QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) o directamente mediante síntesis peptídica. La generación de una variante funcionalmente activa para un péptido de IgE antigénico por sustitución de un aminoácido que no influya significativamente en la función de dicho péptido de IgE antigénico puede efectuarse por un especialista en la técnica.

Un tipo de sustitución aminoacídica que puede realizarse en uno de los péptidos de acuerdo con la invención es una sustitución de aminoácidos conservativa. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que un resto aminoacídico se sustituye por otro resto aminoacídico que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse al alza para corregir por la naturaleza conservativa de la sustitución. Los especialistas en la técnica conocen bien medios para realizar este ajuste. Véase, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243: 307-31 (1994).

Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales hidroxilo-alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, una sustitución conservativa es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y col., *Science* 256: 1443-45 (1992). Una sustitución "moderadamente conservativa" es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

Un péptido variante funcionalmente activo también puede aislarse usando una técnica de hibridación. En resumen, se usa ADN que tiene una alta homología con la totalidad o parte de una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido, polipéptido o proteína de interés, por ejemplo, las SEC ID N.ºs: 1 a 430, para preparar un péptido funcionalmente activo. Por lo tanto, un péptido de IgE antigénico de la divulgación también incluye péptidos que son funcionalmente equivalentes a uno o más de los péptidos de las SEC ID N.ºs: 1 a 430 y que están codificados por una molécula de ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico que codifica una cualquiera de las SEC ID N.ºs: 1 a 430 o un complementario del mismo. Un especialista en la técnica puede determinar fácilmente secuencias de ácido nucleico que codifican péptidos de la divulgación usando tablas de codones fácilmente disponibles. Como tales, estas secuencias de ácido nucleico no se presentan en este documento.

La rigurosidad de hibridación para un ácido nucleico que codifica un péptido, polipéptido o proteína que es una variante funcionalmente activa es, por ejemplo, formamida al 10 %, SSPE 5x, solución de Denhart 1x y ADN de esperma de salmón 1x (condiciones de baja rigurosidad). Son condiciones más preferibles formamida al 25 %, SSPE

5x, solución de Denhart 1x y ADN de esperma de salmón 1x (condiciones de rigurosidad moderada) y condiciones aún más preferibles son formamida al 50 %, SSPE 5x, solución de Denhart 1x y ADN de esperma de salmón 1x (condiciones de alta rigurosidad). Sin embargo, varios factores influyen en la rigurosidad de hibridación distintos de la concentración de formamida descrita anteriormente y un especialista en la técnica puede seleccionar convenientemente estos factores para lograr una rigurosidad similar.

También pueden aislarse moléculas de ácido nucleico que codifican una variante funcionalmente activa mediante un procedimiento de amplificación génica tal como PCR usando una porción de una molécula de ácido nucleico de ADN que codifica un péptido, polipéptido o proteína de interés, por ejemplo, uno cualquiera de los péptidos que se muestran en las SEC ID N.ºs: 1 a 430, como la sonda.

Para los fines de la presente divulgación, debería considerarse que pueden usarse varios péptidos de IgE antigénicos de la invención en combinación. Pueden preverse todos los tipos de combinaciones posibles. Por ejemplo, podría usarse un polipéptido que comprende más de un péptido de IgE antigénico, preferentemente seleccionado de las SEC ID N.ºs: 1 a 430, más preferentemente de las SEC ID N.ºs: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente de las SEC ID N.ºs: 220 a 430, en el que se usa el mismo péptido de IgE antigénico en varias copias en la misma molécula polipeptídica, o en el que se usan péptidos de IgE antigénicos de diferentes secuencias de aminoácidos en la misma molécula polipeptídica; fusionándose directamente entre sí los diferentes péptidos o copias de IgE antigénicos o separándose mediante engarces apropiados. Como se usa en este documento, la expresión "(poli)péptido de IgE antigénico multimerizado" se refiere a ambos tipos de combinación en los que están presentes péptidos de IgE antigénicos de secuencia de aminoácidos bien diferentes o bien iguales en una sola molécula polipeptídica. Por lo tanto pueden estar presentes de 2 a aproximadamente 20 péptidos de IgE antigénicos idénticos y/o diferentes, preferentemente 2, 3, 4, 5, 6 o 7 péptidos de IgE antigénicos en una sola molécula polipeptídica de IgE antigénica multimerizada.

En un aspecto de la invención, el inmunógeno está constituido por, está constituido esencialmente por, o comprende un péptido de IgE antigénico multimerizado que está constituido por, constituido esencialmente por o que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 430 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente seleccionadas del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 430. En una realización, dicho péptido de IgE multimerizado comprende un primer péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 153 y un segundo péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154 a 219 o las SEC ID N.ºs: 220 a 310 o SEC ID N.ºs: 311 a 430. En otra realización, dicho péptido de IgE multimerizado comprende un primer péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154 a 219 y un segundo péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 153 o las SEC ID N.ºs: 154 a 219 o las SEC ID N.ºs: 311 a 430. En otra realización más, dicho péptido de IgE multimerizado comprende un primer péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220 a 310 y un segundo péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 153 o las SEC ID N.ºs: 154 a 219 o las SEC ID N.ºs: 311 a 430. En otra realización más, dicho péptido de IgE multimerizado comprende un primer péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 153 o las SEC ID N.ºs: 154 a 219 o SEC ID N.ºs: 220 a 310. En otra realización más, dicho péptido de IgE multimerizado comprende un primer péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 311 a 430, un segundo péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220 a 310 y un tercer péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154 a 219 o las SEC ID N.ºs: 1 a 153.

En una realización de la invención, un péptido, polipéptido o proteína de la invención procede de una fuente natural y se aísla de un mamífero, tal como un ser humano, un primate, un gato, un perro, un caballo, un ratón o una rata, preferentemente de una fuente humana. Un péptido, polipéptido o proteína de la invención puede aislarse por lo tanto a partir de fuentes celulares o tisulares usando técnicas de purificación de proteínas convencionales.

Como alternativa, los péptidos, polipéptidos y proteínas de la invención pueden sintetizarse químicamente o producirse usando técnicas de ADN recombinante.

Por ejemplo, un péptido, polipéptido o proteína de la invención puede sintetizarse mediante procedimientos en fase sólida bien conocidos en la técnica. Pueden realizarse síntesis adecuadas utilizando procedimientos de "T-boc" o "F-moc". Pueden sintetizarse péptidos cíclicos mediante el procedimiento en fase sólida que emplea el procedimiento "F-moc" bien conocido y resina de poliamida en el aparato totalmente automatizado. Como alternativa, los especialistas en la técnica conocerán los procedimientos de laboratorio necesarios para realizar el procedimiento manualmente. Se describen técnicas y procedimientos para síntesis en fase sólida en 'Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach' por E. Atherton y R. C. Sheppard, publicado por IRL en Oxford University Press (1989) y 'Methods in Molecular Biology, Vol. 35: Peptide Synthesis Protocols' (ed. M. W. Pennington y B. M. Dunn), capítulo 7, págs. 91-171 por D. Andreau y col.

Como alternativa, un polinucleótido que codifica un péptido, polipéptido o proteína de la invención puede introducirse en un vector de expresión que puede expresarse en un sistema de expresión adecuado usando procedimientos bien conocidos en la técnica, seguido de aislamiento o purificación del péptido, polipéptido o proteína de interés expresada. Una diversidad de sistemas de expresión bacterianos, de levaduras, vegetales, de mamíferos e insectos están disponibles en la técnica y puede usarse cualquier sistema de expresión de este tipo. Opcionalmente, un polinucleótido que codifica un péptido, polipéptido o proteína de la invención puede traducirse en un sistema de traducción sin células.

Los péptidos de IgE antigénicos de la invención también pueden comprender los que surgen como resultado de la existencia de múltiples genes, acontecimientos de transcripción alternativos, acontecimientos de corte y empalme de ARN alternativos y acontecimientos traduccionales y postraduccionales alternativos. Un péptido puede expresarse en sistemas, por ejemplo, células cultivadas, que den como resultado sustancialmente las mismas modificaciones postraduccionales presentes que cuando el péptido se expresa en una célula nativa, o en sistemas que den como resultado la alteración u omisión de las modificaciones postraduccionales, por ejemplo, glucosilación o escisión, presentes cuando se expresa en una célula nativa.

Un péptido, polipéptido o proteína de la invención tal como un péptido de IgE antigénico puede producirse como una proteína de fusión que contiene otras secuencias de aminoácidos que no son de IgE o no proceden de IgE, tales como engarces aminoácidos o secuencias señal o vehículos inmunogénicos según se definen en este documento, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión-S-transferasa, marcador de histidina y proteína A estafilocócica. Puede estar presente más de un péptido de IgE antigénico de la invención en una proteína de fusión. El polipéptido heterólogo puede fusionarse, por ejemplo, en el extremo N-terminal o C-terminal del péptido, polipéptido o proteína de la invención. Un péptido, polipéptido o proteína de la invención también puede producirse como proteínas de fusión que comprenden secuencias de aminoácidos homólogas, es decir, otras secuencias de IgE o derivadas de IgE.

Los péptidos de IgE antigénicos de la invención podrían ser lineales o estar limitados conformacionalmente. En realizaciones preferidas de la invención, el péptido de IgE antigénico está limitado conformacionalmente. Como se usa en este documento en relación con una molécula, la expresión "limitado conformacionalmente" significa que una molécula, tal como un péptido, polipéptido o proteína en la que la estructura tridimensional se mantiene sustancialmente en una disposición espacial a lo largo del tiempo. Las moléculas limitadas conformacionalmente pueden tener propiedades mejoradas tales como una afinidad, estabilidad metabólica, permeabilidad de membrana o solubilidad aumentadas.

Además, se espera que dichas moléculas limitadas conformacionalmente presenten el epítipo de IgE antigénico en una conformación similar a su conformación de bucle nativo, induciendo de este modo anticuerpos anti-IgE más susceptibles de reconocer moléculas propias de IgE nativas intactas o con una afinidad aumentada para reconocer moléculas de IgE propias. Se conocen bien en la técnica procedimientos de limitación conformacional e incluyen, sin limitación, formación de puentes y ciclación.

Existen varias estrategias conocidas en la técnica anterior para introducir limitaciones conformacionales en un péptido o cadena polipeptídica lineal. Por ejemplo, la formación de puentes entre dos aminoácidos vecinos en un péptido conduce a una modificación conformacional local, limitándose su flexibilidad en comparación con la de péptidos normales. Algunas posibilidades para formar dichos puentes incluyen la incorporación de lactámicos y piperazinonas (para una revisión véase Giannis y Koiter, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1993, 32: 1244).

Como se usa en este documento en relación con un péptido, el término "cíclico" se refiere a una estructura que incluye un enlace intramolecular entre dos aminoácidos o análogos de aminoácidos no adyacentes. La ciclación puede efectuarse a través de un enlace covalente o no covalente. Los enlaces intramoleculares incluyen, pero sin limitación, enlaces de cadena principal con cadena principal, cadena lateral con cadena principal, cadena lateral con cadena lateral, cadena lateral con grupo terminal, grupo terminal con grupo terminal. Los procedimientos de ciclación incluyen, sin limitación, la formación de un enlace disulfuro entre las cadenas laterales de aminoácidos o análogos de aminoácidos no adyacentes; la formación de un enlace amida entre las cadenas laterales de restos de Lys y Asp/Glu; la formación de un enlace éster entre restos de serina y restos de Asp/Glu; la formación de un enlace lactámico, por ejemplo, entre un grupo de cadena lateral de un aminoácido o análogo del mismo con la amina N-terminal del resto amino-terminal; y la formación de enlaces de lisinanorleucina y ditirosina. También podrían usarse versiones de carbono de un enlace disulfuro, por ejemplo, un enlace etenilo o etilo (*J. Peptide Sc.*, 2008, 14, 898-902), así como reacciones de alquilación con un reactivo electrófilo apropiadamente polisustituido tal como un di-, tri- o tetrahaloalcano (*PNAS*, 2008, 105 (40), 15293-15298; *ChemBioChem*, 2005, 6, 821-824). También pueden usarse diversos análogos de prolina modificada para incorporar limitaciones conformacionales en péptidos (Zhang y col., *J. Med. Chem.*, 1996, 39: 2738-2744; Pfeifer y Robinson, *Chem. Comm.*, 1998, 1977-1978). Las químicas que pueden usarse para ciclar péptidos de la invención dan como resultados péptidos ciclados con un enlace incluyendo, pero sin limitación, los siguientes: enlaces lactámicos, hidrazona, oxima, tiazolidina, tioéter o sulfonio.

Otra estrategia más en el diseño de péptidos limitados conformacionalmente que se describe en el documento US10/114918 es la unión de una secuencia de aminoácidos corta de interés con una plantilla para generar un péptido cíclico limitado. Dichos péptidos cíclicos no solo están estructuralmente estabilizados por sus plantillas y por lo tanto ofrecen conformaciones tridimensionales que pueden imitar epítopos conformacionales en proteínas nativas tales como virus y parásitos o proteínas propias (proteínas autólogas de mamíferos tales como IgE), sino que también son más resistentes que los péptidos lineales a la degradación proteolítica en suero. El documento US 10/114918 describe además la síntesis de péptidos reticulados limitados conformacionalmente por preparación de aminoácidos sintéticos para acoplamiento de cadena principal con aminoácidos apropiadamente situados para estabilizar la estructura supersecundaria de los péptidos. La reticulación puede conseguirse por acoplamiento de amida del grupo amino primario de un resto de (2S,3R)-3-aminoprolina ortogonalmente protegido con un grupo carboxilo de cadena lateral de glutamato convenientemente situado. Esta estrategia se ha seguido en la preparación de repeticiones tetrapeptídicas limitadas conformacionalmente de la proteína CS en las que se ha sustituido al menos una prolina por (2S,3R)-3-aminoprolina y para introducir un grupo carboxilo de cadena lateral, se ha incorporado glutamato como sustitución para alanina.

Las estrategias de reticulación también incluyen la aplicación de la reacción de metátesis de cierre de anillo de Grubbs para formar péptidos "grapados" diseñados para mimetizar conformaciones alfa-helicoidales (*Angew. Int. Ed. Engl.*, 1998, 37, 3281; *JACS*, 2000, 122, 5891); uso de sacáridos polifuncionalizados; uso de un enlace triptationina (*Chemistry Eu. J.*, 2008, 24, 3404-3409); uso de reacciones "clic" de azidas y alquinas que podrían incorporarse como restos aminoácidos de cadena lateral o localizarse en el interior de la cadena principal de la secuencia

peptídica (*Drug Disc. Today*, 2003, 8 (24), 1128-1137). También se sabe en la bibliografía que los iones metálicos pueden estabilizar conformaciones limitadas de péptidos lineales a través del secuestro de restos específicos, por ejemplo, histidina, que se coordinan con cationes metálicos (*Angew. Int. Ed. Engl.*, 2003, 42, 421). De una forma similar, puede usarse la funcionalización de una secuencia peptídica lineal con una funcionalidad ácido y amina no naturales, o con una funcionalidad poliamina y poliácido para permitir el acceso a estructuras cicladas después de la activación y de la formación de un enlace amida.

De acuerdo con una realización, el péptido de IgE antigénico está limitado conformacionalmente por formación de un enlace covalente intramolecular de dos aminoácidos no adyacentes del péptido de IgE antigénico entre sí, por ejemplo, los aminoácidos N- y C-terminales. De acuerdo con otra realización, el péptido de IgE antigénico de la invención está limitado conformacionalmente por formación de enlaces covalentes con una molécula de armazón. De acuerdo con una realización adicional, el péptido de IgE antigénico está limitado de forma simple, es decir, acoplado en un extremo (extremo C o N terminal) o a través de otro aminoácido no localizado en ningún extremo, a la molécula de armazón. De acuerdo con otra realización, el péptido de IgE antigénico está doblemente limitado, es decir, acoplado tanto en el extremo C como N terminal a la molécula de armazón. De acuerdo con otra realización, el péptido antigénico se limita por ciclación a través del efecto de plantilla de una unidad de diprolina heteroquiral (D-Pro-L-Pro) (Spath y col, 1998, *Helvetica Chimica Acta* 81, págs. 1726-1738). Se representan gráficamente en la Figura 2 ejemplos ilustrativos pero no limitantes de péptidos limitados conformacionalmente de acuerdo con la invención.

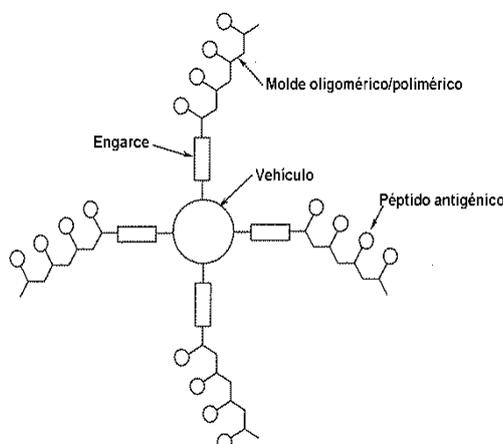
El armazón (también denominado "plataforma") puede ser cualquier molécula que sea capaz de reducir, por formación de enlaces covalentes, el número de conformaciones que puede asumir el péptido de IgE antigénico. Los ejemplos de armazones limitantes de la conformación incluyen proteínas y péptidos, por ejemplo, moléculas relacionadas con lipocalina tales como proteínas de tiorredoxina y similares a tiorredoxina que contienen barriles beta, nucleasas (por ejemplo, ARNasaA), proteasas (por ejemplo, tripsina), inhibidores de proteasas (por ejemplo, eglina C), anticuerpos o fragmentos estructuralmente rígidos de los mismos, proteínas fluorescentes tales como GFP o YFP, conotoxinas, regiones de bucle de dominio de fibronectina tipo III, CTL-A4 y partículas similares a virus (VLP).

Otras moléculas de plataforma adecuadas incluyen carbohidratos tales como sefariosa. La plataforma puede ser una molécula lineal o circular, por ejemplo, cerrada para formar un bucle. La plataforma generalmente es heteróloga con respecto al péptido de IgE antigénico. Se piensa que dichos péptidos limitados conformacionalmente unidos a una plataforma son más resistentes a la degradación proteolítica que el péptido lineal.

De acuerdo con una realización preferida, el armazón es un vehículo inmunogénico según se define en la presente solicitud, preferentemente una proteína de vehículo heteróloga o una VLP. En una realización adicional, el péptido de IGE antigénico está limitado de forma simple sobre el vehículo inmunogénico. En otra realización adicional, el péptido de IgE antigénico está doblemente limitado sobre el vehículo inmunogénico. De esta forma, el péptido de IgE antigénico forma una estructura de bucle limitada conformacionalmente que se ha demostrado que es una estructura particularmente adecuada como molécula de reconocimiento intracelular.

Los péptido de IgE antigénicos de la invención pueden modificarse para facilitar la conjugación con una plataforma, por ejemplo mediante la adición de una cisteína terminal en uno o ambos extremos y/o mediante la adición de una secuencia de engarce, tal como una cabeza o cola de doble glicina, un engarce que termine con un resto de lisina o cualquier otro engarce que sepan los especialistas en la técnica que realiza dicha función. También podría usarse química bioortogonal (tal como la reacción "clic" descrita anteriormente) para acoplar la secuencia peptídica completa con el vehículo, evitando de este modo cualquier cuestión de regioquímica y quimioselectividad. Se sabe que los engarces rigidificados tales como el descrito en Jones y col. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41: 4241-4244 generan una respuesta inmunológica mejorada y también podrían usarse.

En una realización adicional, el péptido de IgE antigénico se une a una plantilla multivalente que por sí mismo se acopla al vehículo, aumentado de este modo la densidad del antígeno (véase a continuación). La plantilla multivalente podría ser un polímero u oligómero apropiadamente funcionalizado tal como (pero sin limitación) oligoglutamato y oligoquitosana.



5 Dicho engarce podría localizarse en el extremo N-terminal del péptido o en el extremo C-terminal del péptido o en ambos extremos del péptido. Dicho engarce podría tener una longitud de 0 a 10 aminoácidos, preferentemente una longitud de 0 a 6 aminoácidos, aún más preferentemente una longitud de 2-3 aminoácidos. Como alternativa, la adición o sustitución de una forma D-estereoisomérica de uno o más de los aminoácidos puede realizarse para generar un derivado beneficioso, por ejemplo, para aumentar la estabilidad del péptido.

Se proporcionan a continuación combinaciones ejemplares de conjugaciones, estando todas dentro del alcance de la presente invención y constituyendo diversas realizaciones:

Péptido-GGGGGC-armazón

Péptido-GGGGC-armazón

10 Péptido-GGGC-armazón

Péptido-GGC-armazón

Péptido-GC-armazón

Péptido-C-armazón

Péptido-GGGGK

15 Péptido-GGGK

Péptido-GGK

Péptido-GK

Péptido-GK

Péptido-K

20 Péptido-GGGGSC

Péptido-GGGSC

Péptido-GGSC

Péptido-GSC

Péptido-SC

25 CSGGGG-Péptido

CSGGG-Péptido

CSGG-Péptido

CSG-Péptido

CS-Péptido

30 En una realización, el péptido está constituido por cualquiera de los péptidos de IgE antigénicos descritos en este documento y el armazón está constituido por cualquiera de los vehículos inmunogénicos descritos en este documento, preferentemente una VLP.

35 Se proporcionan a continuación combinaciones ejemplares de conjugaciones usando diversos engarces y péptidos doblemente limitados, en las que el vehículo puede ser el monómero idéntico de un vehículo o un monómero diferencial de un vehículo. (En el ejemplo a continuación, el engarce GC puede sustituirse por cualquiera de los engarces GK o GSC ejemplificados anteriormente o cualquier otro conocido por los especialistas en la técnica):

Vehículo-CGGGGG-Péptido-GGGGGC-vehículo

Vehículo-CGGGG-Péptido-GGGGC-vehículo

Vehículo-CGGGG-Péptido-GGGGC-vehículo

40 Vehículo-CGGG-Péptido-GGGC-vehículo

Vehículo-CG-Péptido-GC-vehículo

Vehículo-C-Péptido-C-vehículo

45 En una realización, el péptido está constituido por cualquiera de los péptidos de IgE antigénicos descritos en este documento y el vehículo está constituido por cualquiera de los vehículos inmunogénicos descritos en este documento, preferentemente una VLP.

En una realización, se añade un resto de cisteína terminal, si no está ya presente en la secuencia de aminoácidos del péptido de IgE antigénico, en uno o ambos extremos de cualquiera de los péptidos de IgE antigénicos de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430 para generar un péptido limitado conformacionalmente. En una realización preferida, el péptido de IgE antigénico limitado conformacionalmente de la divulgación se selecciona del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430. En una realización, dicho resto de cisteína terminal se añade en el extremo C-terminal de dicho péptido de IgE antigénico. En otra realización, se añade un resto de cisteína terminal tanto en el extremo C-terminal como en el extremo N-terminal de dicho péptido de IgE antigénico.

En otra realización, se añade un engarce GC que comprende un número variable de restos de glicina y un resto de cisteína terminal en uno o ambos extremos de cualquiera de los péptidos de IgE antigénicos de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430 para generar un péptido limitado conformacionalmente. Preferentemente, el engarce GC comprende de 1 a 10 restos de glicina, más preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 restos de glicina. En una realización preferida adicional, el péptido de IgE antigénico limitado conformacionalmente de la divulgación se selecciona del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430. En una realización, dicho engarce de GC se añade en el extremo C-terminal de dicho péptido de IgE antigénico. En otra realización dicho engarce de GC se añade en el extremo N-terminal de dicho péptido de IgE antigénico. En otra realización se añade dicho engarce de GC tanto en el extremo C-terminal como en el extremo N-terminal de dicho péptido de IgE antigénico.

En otra realización más, se añade un engarce de GC que comprende un número variable de restos de glicina y un resto de cisteína terminal en un extremo del péptido de IgE antigénico de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430 y se añade un resto de cisteína terminal, si no está ya presente en el otro extremo del péptido de IgE antigénico, en el otro extremo del péptido antigénico. Preferentemente el engarce de GC comprende de 1 a 10 restos de glicina, más preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 restos de glicina. En una realización preferida adicional, el péptido de IgE antigénico limitado conformacionalmente de la invención se selecciona del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430. En una realización, dicho engarce de GC se añade en el extremo C-terminal de dicho péptido de IgE antigénico y dicho resto de cisteína terminal se añade en el extremo N-terminal de dicho péptido de IgE antigénico. En otra realización dicho engarce de GC se añade en el extremo N-terminal de dicho péptido de IgE antigénico y dicho resto de cisteína terminal se añade en el extremo C-terminal de dicho péptido de IgE antigénico.

En una realización preferida adicional, el engarce de GC se modifica, preferentemente por adición de un resto de lisina, para permitir la conjugación de dicho engarce acoplado con dicho péptido de IgE antigénico con una molécula de armazón. En una realización aún más preferida, el péptido de IgE antigénico limitado conformacionalmente de la divulgación se selecciona del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430. En una realización, dicho engarce GC modificado se añade en el extremo C-terminal de dicho péptido de IgE antigénico. En otra realización, dicho engarce de GC modificado se añade en el extremo N-terminal de dicho péptido de IgE antigénico.

En una realización, el péptido de IgE antigénico limitado conformacionalmente de la invención es cualquiera de los péptidos descritos en la tabla 9.

#### **Vehículo inmunogénico de la invención**

El péptido o polipéptido de IgE antigénico de la invención se une a una molécula de vehículo inmunogénica para formar inmunógenos para protocolos de vacunación, preferentemente no estando relacionada la molécula de vehículo con la molécula de IgE nativa.

La expresión "vehículo inmunogénico" incluye en este documento los materiales que tienen la propiedad de generar de forma independiente una respuesta inmunogénica en un animal huésped y que pueden acoplarse covalentemente a un péptido, polipéptido o proteína bien directamente por formación de enlaces peptídicos o éster entre grupos carboxilo, amino o hidroxilo libres en el péptido, polipéptido o proteína y los grupos correspondientes en el material de vehículo inmunogénico, bien como alternativa por formación de enlaces a través de un grupo de enlace bifuncional convencional, o bien como una proteína de fusión.

Los especialistas en la técnica conocerán fácilmente los tipos de vehículos usados en los inmunógenos de la presente invención. Son ejemplos de dichos vehículos inmunogénicos: albúminas séricas tales como albúmina sérica bovina (BSA); globulinas; tiroglobulinas; hemoglobinas; hemocianinas (particularmente Hemocianina de Lapa Californiana [KLH]); proteínas extraídas de ascáridos, toxinas o toxoides bacterianos inactivados tales como toxinas tetánica o diftérica (TT y DT) o CRM197, el derivado proteico purificado de tuberculina (PPD); o Proteína D de *Haemophilus influenzae* (documento WO 91/18926) o fragmentos recombinantes de los mismos (por ejemplo, Dominio 1 de Fragmento C de TT, o el dominio de translocación de DT o 1/3 de Proteína D que comprende los 100-110 aminoácidos N-terminales de la proteína D de *Haemophilus influenzae* (documento GB 9717953.5); poliisina; ácido poliglutámico; copolímeros de lisina-ácido glutámico; copolímeros que contienen lisina u ornitina; vehículos liposomales, etc.

En una realización, el vehículo inmunogénico es KLH. En otra realización, el vehículo inmunogénico es una partícula similar a virus (VLP), preferentemente una partícula similar a virus recombinante.

Como se usa en este documento, la expresión "partícula similar a virus" se refiere a una estructura que se parece a una partícula de virus pero que se ha demostrado que no es patógena. En general, las partículas similares a virus carecen de al menos parte del genoma viral. Además, las partículas similares a virus pueden producirse con frecuencia en grandes cantidades por expresión heteróloga y pueden purificarse fácilmente. Una partícula similar a virus de acuerdo con la invención puede contener un ácido nucleico distinto de su genoma. Una realización típica y preferida de una partícula similar a virus de acuerdo con la presente invención es una cápsida viral tal como la cápsida viral del virus, bacteriófago o fago de ARN correspondiente.

Como se usa en este documento, la expresión "partícula similar a virus de un bacteriófago" se refiere a una partícula similar a virus que se parece a la estructura de un bacteriófago, que no es replicante ni infecciosa y que carece de al menos el gen o los genes que codifican la maquinaria de replicación del bacteriófago y que carece también típicamente del gen o genes que codifican la proteína o proteína responsables de la unión viral a o de la entrada en el huésped. Sin embargo, esta definición también debería incluir partículas similares a virus de bacteriófagos en las que el gen o genes mencionados anteriormente estén todavía presentes pero inactivos y por lo tanto, también conduzcan a partículas similares a virus no replicantes ni infecciosas de un bacteriófago.

La estructura de la cápsida formada a partir del autoensamblaje de 180 subunidades de proteína de cubierta de fago de ARN y que contiene opcionalmente ARN huésped se denomina en este documento "VLP de proteína de cubierta de fago de ARN". Un ejemplo específico es la VLP de la proteína de cubierta de Qbeta. En este caso particular, la VLP de la proteína de cubierta de Qbeta puede ensamblarse exclusivamente a partir de subunidades CP de Qbeta (generadas por expresión de un gen de CP de Qbeta que contiene, por ejemplo, un codón de terminación TAA que impide cualquier expresión de la proteína A1 más larga por supresión, véase Kozlovska, T. M. y col., *Intervirology* 39: 9-15 (1996)), o contiene adicionalmente subunidades de proteína A1 en el ensamblaje de la cápsida. Generalmente, el porcentaje de proteína A1 de Qbeta respecto a CP de Qbeta en el ensamblaje de la cápsida estará limitado para asegurar la formación de la cápsida.

Los ejemplos de VLP adecuadas como vehículos inmunogénicos en el contexto de la presente invención incluyen, pero sin limitación, las proteínas de las cápsidas del virus de la Hepatitis B (Ulrich y col., *Virus Res.* 50: 141-182 (1998)), virus del sarampión (Warnes y col., *Gene* 160: 173-178 (1995)), virus Sindbis, rotavirus (Patentes de Estados Unidos N.ºs: 5.071.651 y 5.374.426), virus de la glosopeda (Twomey y col., *Vaccine* 13: 1603-1610, (1995)), virus Norwalk (Jiang, X. y col., *Science* 250: 1580-1583 (1990); Matsui, S. M. y col., *J Clin. invest.* 87: 1456-1461 (1991)), la proteína GAG retroviral (Solicitud de Patente PCT N° WO 96/30523), la proteína pI del retrotransposón Ty, la proteína de superficie de virus de la Hepatitis B (documento WO 92/11291), papilomavirus humano (documento WO 98/15631), poliomavirus humano (Sasnauskas K. y col., *Biol. Chem.* 380 (3): 381-386 (1999); Sasnauskas K. y col., *Generation of recombinant virus-like particles of different polyomaviruses in yeast.* 3rd International Workshop "Virus-like particles as vaccines." Berlín, 26-29 de septiembre (2001)), fagos de ARN, Ty, fago fr, fago GA, fago AP 205 y en particular, fago Qbeta, virus del moteado clorótico de la habichuela, papilomavirus humanos (HPV), papilomavirus bovinos, parvovirus porcino, parvovirus, calicivirus (por ejemplo, virus Norwalk), virus de la enfermedad hemorrágica del conejo y VLP de antígeno de núcleo de hepadnavirus animal.

Como será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica, la VLP que se usará como vehículo inmunogénico de la invención no está limitada a ninguna forma específica. La partícula puede sintetizarse químicamente o a través de un procedimiento biológico que puede ser natural o no natural. A modo de ejemplo, este tipo de realización incluye una partícula similar a virus o una forma recombinante de la misma. En una realización más específica, la VLP puede comprender o como alternativa estar constituida por, polipéptidos recombinantes de cualquiera de los virus que se sabe que forman una VLP. La partícula similar a virus puede comprender además, o como alternativa puede estar constituida por, uno o más fragmentos de dichos polipéptidos, así como variantes de dichos polipéptidos. Las variantes de polipéptidos pueden compartir, por ejemplo, una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % a nivel de aminoácidos con sus homólogos de tipo silvestre. Las VLP variantes adecuadas para usar en la presente invención pueden proceder de cualquier organismo siempre que sean capaces de formar una "partícula similar a virus" y pueden usarse como "vehículo inmunogénico" según se define en este documento.

Las VLP preferidas de acuerdo con la invención incluyen la proteína de la cápsida o el antígeno de superficie de HBV (HBcAg y HBsAg respectivamente) o proteínas recombinantes o fragmentos de las mismas y las proteínas de cubierta de fagos de ARN o proteínas recombinantes o fragmentos de las mismas, más preferentemente la proteína de cubierta de Qbeta o proteínas recombinantes o fragmentos de la misma.

En una realización, el vehículo inmunogénico usado en combinación con un péptido o polipéptido de IgE antigénico de la invención es una proteína HBcAg. Los ejemplos de proteínas HBcAg que podrían usarse en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por un especialista en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, proteínas del núcleo de HBV descritas en Yuan y col., (*J. Virol.* 73: 10122-10128 (1999)) y en los documentos WO00/198333, WO 00/177158, WO 00/214478, WO WO00/32227, WO01/85208, WO02/056905, WO03/024480 y WO03/024481. Los HBcAg adecuados para usar en la presente invención pueden proceder de cualquier organismo siempre que sean capaces de formar una "partícula similar a virus" y pueden usarse como un "vehículo inmunogénico" según se define en este documento.

Las variantes de HBcAg de interés particular que podrían usarse en el contexto de la presente invención son las variantes en las que uno o más restos de cisteína naturalmente presentes se han delecionado o sustituido. Es bien sabido en la técnica que los restos de cisteína libres pueden estar implicados en varias reacciones secundarias químicas incluyendo intercambios disulfuro, reacción con sustancias químicas o metabolitos que, por ejemplo, se inyectan o se forman en una terapia de combinación con otras sustancias u oxidación directa y reacción con nucleótidos tras la exposición a luz UV. Por lo tanto podrían generarse aductos tóxicos, considerando especialmente

el hecho de que los HBcAg tienen una fuerte tendencia a unirse a ácidos nucleicos. Los aductos tóxicos se distribuirían por lo tanto entre una multiplicidad de especies, pudiendo estar cada una presente individualmente a baja concentración, pero alcanzar niveles tóxicos en conjunto. En vista de lo anterior, una ventaja al uso de HBcAg en composiciones de vacunas que se han modificado para eliminar restos de cisteína naturalmente presentes es que se reducirían en número o se eliminarían totalmente los sitios con los que pueden unirse especies tóxicas cuando se unen antígenos o determinantes antigénicos.

Además, la forma procesada de HBcAg que carece de la secuencia líder N-terminal de la proteína precursora del antígeno de núcleo de hepatitis B también puede usarse en el contexto de la invención, especialmente cuando se produce HBcAg en condiciones en las que no se producirá el procesamiento (por ejemplo, expresión en sistemas bacterianos).

Otras variantes de HBcAg de acuerdo con la invención incluyen i) una secuencia polipeptídica que tiene una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % con una de las secuencias de aminoácidos de HBcAg de tipo silvestre o una subporción de la misma, usando programas informáticos conocidos de uso convencional, ii) mutantes de truncamiento C-terminal que incluyen mutantes en los que se han eliminado 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 34 o 35 aminoácidos del extremo C-terminal, iii) mutantes de truncamiento N-terminal que incluyen mutantes en los que se han eliminado 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, o 17 aminoácidos del extremo N-terminal, iv) los mutantes truncados tanto en el extremo N-terminal como C-terminal incluyen HBcAg en los que se han eliminado 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15 o 17 aminoácidos del extremo N-terminal y se han eliminado 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 34 o 35 aminoácidos del extremo C-terminal.

Otras proteínas variantes de HBcAg más dentro del alcance de la invención son las variantes modificadas para aumentar la presentación inmunogénica de un epítipo extraño en las que se han delecionado una o más de las cuatro repeticiones de arginina, pero en las que se conserva la cisteína C-terminal (véase, por ejemplo, el documento WO01/98333) y HBcAg truncados C-terminalmente quiméricos tales como los descritos en los documentos WO02/14478, WO03/102165 y WO04/053091.

En otra realización, el vehículo inmunogénico usado en combinación con un péptido o polipéptido de IgE antigénico de la invención es una proteína HBsAg. Las proteínas HBsAg que podrían usarse en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por un especialista en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, proteínas de superficie de HBV descritas en los documentos US5792463, WO02/10416 y WO08/020331. Los HBsAg adecuados para usar en la presente invención pueden proceder de cualquier organismo siempre que sean capaces de formar una "partícula similar a virus" y puedan usarse como "vehículo inmunogénico" según se define en este documento. Por ejemplo, el subtipo adw (véase la parte de ejemplo del presente documento).

En otra realización más, el vehículo inmunogénico usado en combinación con un péptido o polipéptido de IgE antigénico de la invención es una proteína de cubierta de Qbeta.

Se descubrió que la proteína de cubierta de Qbeta se autoensambla en cápsidas cuando se expresa en *E. coli* (Kozlovskaya TM. y col., GENE 137: 133-137 (1993)). Las cápsidas o partículas similares a virus obtenidas mostraban una estructura de cápsida similar a fago icosaédrica con un diámetro de 25 nm y una cuasi simetría T = 3. Además, se ha resuelto la estructura cristalina del fago Qss. La cápsida contiene 180 copias de la proteína de cubierta que están unidas en pentámeros y hexámeros covalentes mediante puentes disulfuro (Golmohammadi, R. y col., Structure 4: 5435554 (1996)) conduciendo a una estabilidad notable de la cápsida de la proteína de cubierta de Qbeta. La proteína de la cápsida de Qbeta también muestra una resistencia poco habitual a disolventes orgánicos y agentes desnaturantes. La alta estabilidad de la cápsida de la proteína de cubierta de Qbeta es una característica ventajosa, en particular, por su uso en la inmunización y vacunación de mamíferos y seres humanos de acuerdo con la presente invención.

Los ejemplos de proteínas de cubierta de Qbeta que pueden usarse en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por un especialista en la técnica. Se han descrito exhaustivamente ejemplos en los documentos WO02/056905, WO03/024480, WO03/024481 e incluyen, pero sin limitación, secuencias de aminoácidos descritas en la base de datos PIR, N.º de acceso VCBPGbeta que hace referencia a CP de Qbeta; N.º de acceso AAA16663 que hace referencia a la proteína A1 de Qbeta; y variantes de las mismas incluyendo proteínas variantes en las que se escinde la metionina N-terminal; formas truncadas C-terminales de A1 de Qbeta que carecen de tantos como 100, 150 o 180 aminoácidos; proteínas variantes que se han modificado por eliminación de un resto de lisina por deleción o sustitución o por la adición de un resto de lisina por sustitución o inserción (véase por ejemplo Qbeta-240, Gbeta-243, Qbeta-250, Qbeta-251 y Qbeta-259 divulgadas en el documento WO03/024481) y variantes que presentan una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % con cualquiera de las proteínas de núcleo de Qbeta descritas anteriormente. Las proteínas de cubierta de Qbeta variantes adecuadas para usar en la presente invención pueden proceder de cualquier organismo siempre que sean capaces de formar una "partícula similar a virus" y puedan usarse como "vehículos inmunogénicos" según se definen en este documento.

Los péptidos de IgE antigénicos de la invención pueden acoplarse con vehículos inmunogénicos por conjugación química o por expresión de compañeros de fusión modificados por ingeniería genética. El acoplamiento no tiene que ser necesariamente directo, pero puede producirse a través de secuencias de engarce. Más generalmente, en el caso de que los péptidos antigénicos se fusionen, conjuguen o se unan de otro modo a un vehículo inmunogénico, se añaden típicamente secuencias espaciadoras o de engarce en uno o ambos extremos de los péptidos antigénicos. Dichas secuencias de engarce comprenden generalmente secuencias reconocidas por el proteasoma, proteasas de los endosomas u otro compartimento vesicular de la célula.

En una realización, los péptidos de la presente invención se expresan como proteínas de fusión con el vehículo inmunogénico. La fusión del péptido puede efectuarse por inserción en la secuencia primaria del vehículo inmunogénico, o por fusión con el extremo N- o C-terminal del vehículo inmunogénico. En lo sucesivo, cuando se hace referencia a proteínas de fusión de un péptido con un vehículo inmunogénico, se incluye la fusión con cualquier

extremo de la secuencia de subunidad o inserción interna del péptido dentro de la secuencia de vehículo. La fusión, como se denomina en este documento a continuación, puede efectuarse por inserción del péptido antigénico en la secuencia de vehículo, por sustitución de parte de la secuencia del vehículo con el péptido antigénico o por combinación de delección, sustitución o inserciones.

5 Cuando el vehículo inmunogénico es una VLP, la subunidad de péptido antigénico quimérico-VLP será generalmente capaz de autoensamblarse en una VLP. También se hace referencia en este documento a VLP que presentan epítopes fusionados con sus subunidades como VLP quiméricas. Por ejemplo, el documento EP 0 421 635 B describe el uso de partículas de antígeno de núcleo de hepadnavirus quiméricas para presentar secuencias peptídicas extrañas en una partícula similar a virus.

10 Pueden añadirse restos de aminoácidos flanqueantes en cualquier extremo de la secuencia del péptido antigénico que se fusionará con cualquier extremo de la subunidad de una VLP o para inserción interna de dicha secuencia peptídica en la secuencia de la subunidad de una VLP. Los restos de glicina y serina son aminoácidos particularmente preferidos para usarse en las secuencias flanqueantes añadidas al péptido que se va a fusionar. Los restos de glicina confieren una flexibilidad adicional que puede disminuir el efecto potencialmente desestabilizante de la fusión de una secuencia extraña en la secuencia de una subunidad de VLP.

En una realización específica de la invención, el vehículo inmunogénico es una VLP de HBcAg. Se han descrito proteínas de fusión del péptido antigénico con el extremo N-terminal de un HBcAg (Neyrinck, S. y col., *Nature Med.* 5: 1157-1163 (1999)) o inserciones en la denominada región inmunodominante principal (MIR) (Pumpens, P. y Grens, E., *Intervirology* 44: 98-114 (2001)), documento WO 01/98333) y son realizaciones específicas de la invención. También se han descrito variantes de origen natural de HBcAg con delecciones en la MIR (Pumpens, P. y Grens, E., *Intervirology* 44: 98-114 (2001)) y fusiones con el extremo N- o C-terminal, así como inserciones en la posición de la MIR correspondiente al sitio de delección en comparación con un HBcAg de tipo silvestre (wt) son realizaciones adicionales de la invención. Las fusiones en el extremo C-terminal también se han descrito (Pumpens, P. y Grens, E., *Intervirology* 44: 98-114 (2001)). Un especialista en la técnica encontrará fácilmente orientaciones sobre cómo construir proteínas de fusión usando técnicas de biología molecular clásicas. Se han descrito vectores y plásmidos que codifican HBcAg y proteínas de fusión de HBcAg y útiles para la expresión de un HBcAg y proteínas de fusión de HBcAg (Pumpens, P. y #38; Grens, E., *Intervirology* 44: 98-114 (2001), Neyrinck, S. y col., *Nature Med.* 5: 1157-1163 (1999)) y pueden usarse en la práctica de la invención. Un factor importante para la optimización de la eficacia del autoensamblaje y de la presentación del epítipo que se va a insertar en la MIR de HBcAg es la selección del sitio de inserción, así como el número de aminoácidos que se va a delecionar de la secuencia de HBcAg dentro de la MIR (Pumpens, P. y Grens, E., *Intervirology* 44: 98-114 (2001); documento EP 0 421 635; Patente de Estados Unidos Nº 6.231.864) tras la inserción o, en otras palabras, qué aminoácidos de HBcAg se van a sustituir con el nuevo epítipo. Por ejemplo, se ha descrito la sustitución de los aminoácidos de HBcAg 76-80, 79-81, 79-80, 75-85 u 80-81 con epítipes extraños (Pumpens, P. y Grens, E., *Intervirology* 44: 98-114 (2001); documentos EP0421635; US 6.231.864, WO00/26385). El HBcAg contiene una cola de arginina larga (Pumpens, P. y Grens, E., *Intervirology* 44: 98-114 (2001)) que es prescindible para el ensamblaje de la cápsida y capaz de unirse a ácidos nucleicos (Pumpens, P. y Grens, E., *Intervirology* 44: 98-114 (2001)). Tanto el HBcAg que comprende como que carece de esta cola de arginina son realizaciones de la invención.

En otra realización específica de la invención, el vehículo inmunogénico es una VLP de un fago de ARN, preferentemente Qbeta. Las proteínas de cubierta principales de fagos de ARN se ensamblan espontáneamente en VLP tras la expresión en bacterias y en particular en *E. coli*. Se han descrito construcciones de proteína de fusión en las que se han fusionado péptidos antigénicos con el extremo C-terminal de una forma truncada de la proteína A1 de Qbeta, o se han insertado en el interior de la proteína A1 (Kozlovská, T. M. y col., *Intervirology*, 39: 9-15 (1996)). La proteína A1 se genera por supresión en el codón de terminación UGA y tiene una longitud de 329 aa o de 328 aa, si se ha tenido en cuenta la escisión de la metionina N-terminal. La escisión de la metionina N-terminal antes de una alanina (el segundo aminoácido codificado por el gen de CP de Qbeta) tiene lugar habitualmente en *E. coli* y tal es el caso para los extremos N-terminales de las proteínas de cubierta de Qbeta. La parte del gen de A1 3' del codón ámbar UGA codifica la extensión de CP, que tiene una longitud de 195 aminoácidos. La inserción del péptido antigénico entre la posición 72 y 73 de la extensión de CP conduce a realizaciones adicionales de la invención (Kozlovská, T. M. y col., *Intervirology* 39: 9-15 (1996)). La fusión de un péptido antigénico en el extremo C-terminal de una proteína A1 de Qbeta truncada C-terminalmente conduce a realizaciones preferidas adicionales de la invención. Por ejemplo, Kozlovská y col., (*Intervirology*, 39: 9-15 (1996)) describen fusiones de proteína A1 de Qbeta en las que el epítipo se fusiona en el extremo C-terminal de la extensión de CP de Qbeta truncada en la posición 19.

55 Como se describe por Kozlovská y col. (*Intervirology*, 39: 9-15 (1996)), el ensamblaje de las partículas que presentan los epítipes fusionados requiere típicamente la presencia tanto de la fusión de proteína A1-antígeno como de la CP wt para formar una partícula de mosaico. Sin embargo, también se incluyen en el alcance de la presente invención realizaciones que comprenden partículas similares a virus y por la presente en particular las VLP de la proteína de cubierta de Qbeta de fago de ARN, que están compuestas exclusivamente por subunidades de VLP que tienen un péptido antigénico fusionado con las mismas.

La producción de partículas de mosaico puede efectuarse de varias formas. Kozlovská y col., *Intervirology*, 39: 9-15 (1996), describen tres procedimientos, pudiendo todos usarse en la práctica de la invención. En la primera estrategia, la presentación eficaz del epítipo fusionado en las VLP está mediada por la expresión del plásmido que codifica la fusión de proteína A1 de Qbeta que tiene un codón de terminación UGA entre CP y la extensión de CP en una cepa de *E. coli* que alberga un plásmido que codifica un ARNt supresor de UGA clonado que conduce a la traducción del codón UGA en Trp (plásmido pISM3001 (Smiley B. K y col., *Gene* 134: 33-40 (1993))). En otra estrategia, el codón de terminación del gen de CP se modifica en UAA y se cotransforma un segundo plásmido que expresa la fusión de proteína A1-antígeno. El segundo plásmido codifica una resistencia a antibiótico diferente y el origen de replicación es compatible con el primer plásmido. En una tercera estrategia, el CP y la fusión de proteína A1-antígeno están codificadas de forma bicistónica, unidas operativamente a un promotor tal como el promotor Trp

como se describe en la Figura 1 de Kozlovskaya y col., *Intervirolgy*, 39: 9-15 (1996).

Se describen VLP adicionales adecuadas para la fusión de antígenos o determinantes antigénicos en el documento WO03/024481 e incluyen bacteriófago  $\phi$ , ARN fase MS-2, proteína de cápsida de papilomavirus, retrotransposón Ty, levaduras y también partículas similares a Retrovirus, Gag de VIH2, Virus del Mosaico de la Habichuela, VLP de VP2 de parvovirus, HBsAg (documentos US 4.722.840, EP0020416B1). También son ejemplos de VLP quiméricas adecuadas para la práctica de la invención los descritos en *Intervirolgy* 39: 1 (1996). Son ejemplos adicionales de VLP contempladas para usar en la invención: HPV-1, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-45, CRPV, COPV, HIV GAG, Virus del Mosaico del Tabaco. Partículas similares a virus de SV-40, Poliomasvirus, Adenovirus, Virus Herpes Simple, Rotavirus y Virus Norwalk.

Para cualquier péptido o proteína expresado de forma recombinante que forma parte de la presente invención, incluyendo un péptido de IgE antigénico de acuerdo con la invención acoplado o no a un vehículo inmunogénico, el ácido nucleico que codifica dicho péptido o proteína también forma un aspecto de la presente divulgación, así como un vector de expresión que comprende el ácido nucleico y una célula huésped que contiene el vector de expresión (de forma autónoma o insertado cromosómicamente). Un procedimiento para producir de forma recombinante el péptido o proteína por expresión del mismo en la célula huésped anterior y aislar el inmunógeno a partir de la misma es un aspecto adicional de la divulgación. La molécula de IgE nativa de longitud completa o la secuencia de ADN nativa de longitud completa que la codifica no están cubiertas por la presente divulgación.

En otra realización, el péptido de la invención se acopla químicamente a un vehículo inmunogénico, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Puede producirse una conjugación que permita el libre movimiento de péptidos a través de conjugación en un solo punto (por ejemplo, un punto bien N-terminal o bien C-terminal) o como una estructura inmovilizada en la que ambos extremos de péptidos estén conjugados bien con una proteína de vehículo inmunogénico o bien con una estructura de armazón tal como una VLP. Donde la conjugación se produce por química de conjugación conocida por los especialistas en la técnica tal como a través de restos de cisteína, restos de lisina u otros restos carboxi comúnmente conocidos como puntos de conjugación tales como ácido glutámico o ácido aspártico. Por lo tanto, por ejemplo, para el acoplamiento covalente directo es posible utilizar una carbodiimida, glutaraldehído o éster de (N-[ $\gamma$ -maleimidobutirilo]succinimida, utilizando engarces heterobifuncionales disponibles en el mercado comunes tales como CDAP y SPDP (usando las instrucciones de los fabricantes). Se describen ejemplos de conjugación de péptidos, particularmente péptidos ciclados, a un vehículo proteico a través de derivados peptídicos de acilhidrazina en el documento WO03/092714. Después de la reacción de acoplamiento, el inmunógeno puede aislarse fácilmente y purificarse por medio de un procedimiento de diálisis, un procedimiento de filtración en gel, un procedimiento de fraccionamiento etc. Los péptidos que terminan con un resto de cisteína (preferentemente con un engarce fuera de la región ciclada) pueden conjugarse convenientemente con una proteína de vehículo a través de química de maleimida. Cuando el vehículo inmunogénico es una VLP, varios péptidos antigénicos, que tienen bien una secuencia de aminoácidos idéntica o bien una secuencia de aminoácidos diferente, pueden acoplarse a una sola molécula de VLP, conduciendo preferentemente a una estructura repetitiva y ordenada que presenta varios determinantes antigénicos de una forma orientada como se describe en los documentos WO00/32227, WO03/024481, WO02/056905 y WO04/007538.

En un aspecto de la invención, el péptido antigénico se une a la VLP por medio de reticulación química, típicamente y preferentemente mediante el uso de un reticulante heterobifuncional. Se conocen en la técnica varios reticulantes heterobifuncionales. En algunas realizaciones, el reticulante heterobifuncional contiene un grupo funcional que puede reaccionar con los primeros sitios de unión, es decir con el grupo amino de cadena lateral de restos de lisina de la VLP o subunidad de VLP y un grupo funcional adicional que puede reaccionar con un segundo sitio de unión preferido, es decir un resto de cisteína fusionado con el péptido antigénico y que opcionalmente también se hecho disponible para la reacción mediante reducción. La primera etapa del procedimiento, típicamente denominada derivatización, es la reacción de la VLP con el reticulante. El producto de esta reacción es una VLP activada, también denominada vehículo activado. En la segunda etapa, se elimina el reticulante sin reaccionar usando procedimientos habituales tales como filtración en gel o diálisis. En la tercera etapa, el péptido antigénico se hace reaccionar con la VLP activada y esta etapa se denomina típicamente la etapa de acoplamiento. Opcionalmente puede eliminarse el péptido antigénico sin reaccionar en una cuarta etapa, por ejemplo mediante diálisis. Se conocen en la técnica varios reticulantes heterobifuncionales. Estos incluyen los reticulantes preferidos SMPH (succinimidil-6-[ $\beta$ -maleimidopropionamido]hexanoato), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA y otros reticulantes disponibles por ejemplo en la Pierce Chemical Company (Rockford, IL, Estados Unidos) y que tienen un grupo funcional reactivo hacia grupos amino y un grupo funcional reactivo hacia restos de cisteína. Todos los reticulantes mencionados anteriormente conducen a la formación de un enlace tioéter.

Otra clase de reticulantes adecuados en la práctica de la invención se caracteriza por la introducción de un enlace disulfuro entre el péptido antigénico y la VLP tras el acoplamiento. Los reticulantes preferidos que pertenecen a esta clase incluyen por ejemplo SPDP y Sulfo-LC-SPDP (Pierce). Puede influirse en el grado de derivatización de la VLP con reticulante variando las condiciones experimentales tales como la concentración de cada uno de los compañeros de reacción, el exceso de un reactivo sobre el otro, el pH, la temperatura y la fuerza iónica. El grado de acoplamiento, es decir la cantidad de péptido antigénico por subunidades de la VLP puede ajustarse variando las condiciones experimentales descritas anteriormente para que coincidan con las necesidades de la vacuna.

Otro procedimiento de unión de péptidos antigénicos a la VLP, es la unión de un resto de lisina en la superficie de la VLP con un resto de cisteína en el péptido antigénico. En algunas realizaciones, puede ser necesaria la fusión de un engarce aminoacídico que contiene un resto de cisteína, como un segundo sitio de unión o como parte del mismo, con el péptido antigénico para el acoplamiento con la VLP. En general, se prefieren engarces aminoacídicos flexibles. Los ejemplos del engarce aminoacídico se seleccionan del grupo constituido por: (a) CGG; (b) engarce gamma 1 N-terminal; (c) engarce gamma 3 N-terminal; (d) regiones de bisagra de IgE; (e) engarces de glicina N-terminales; (f) (G) $k$ C(G) $n$  con  $n = 0-12$  y  $k = 0-5$ ; (g) engarces de glicina-serina N-terminales; (h) (G) $k$ C(G) $m$ (S) $i$ (GGGG) $n$  con  $n = 0-3$ ,  $k = 0-5$ ,  $m = 0-10$ ,  $i = 0-2$ ; (i) GGC; (k) GGC-NH<sub>2</sub>; (l) engarce gamma 1 C-

terminal; (m) engarce gama 3 C-terminal; (n) engarces de glicina C-terminales; (o) (G)<sub>n</sub>C(G)<sub>k</sub> con n = 0-12 y k = 0-5; (p) engarces de glicina-serina C-terminales; (q) (G)<sub>m</sub>(S)<sub>l</sub>(GGGG)<sub>n</sub>(G)<sub>o</sub>C(G)<sub>k</sub> con n = 0-3, k = 0-5, m = 0-10, l = 0-2 y o = 0-8. Son ejemplos adicionales de engarces aminoacídicos la región de bisagra de inmunoglobulinas, engarces de glicina-serina (GGGS)<sub>n</sub> y engarces de glicina (G)<sub>n</sub> conteniendo todos además un resto de cisteína como segundo sitio de unión y opcionalmente restos de glicina adicionales. Son ejemplos típicamente preferidos de dichos engarces aminoacídicos el gamma 1 N-terminal: CGDKTHTSPP; gamma 1 C-terminal: DKTHT-SPPCG; gamma 3 N-terminal: CGGPKSTPPGSSGGAP; gamma 3 C-terminal: PKSTPPGSSGGAPGGCG; engarce de glicina N-terminal: GCGGGG y engarce de glicina C-terminal: GGGGCG.

Otros engarces aminoacídicos particularmente adecuados en la práctica de la invención, cuando se une un péptido antigénico hidrófobo a una VLP son CGKKGG o CGDEGG para engarces N-terminales, o GGKKGK y GGEDGC, para los engarces C-terminales. Para los engarces C-terminales, la cisteína terminal está opcionalmente amidada C-terminalmente.

En algunas realizaciones de la presente invención, se prefieren engarces GGCG, GGC o GGC-NH<sub>2</sub> ("NH<sub>2</sub>" representa amidación) en el extremo C-terminal del péptido o CGG en su extremo N-terminal como engarces aminoacídicos. En general, se insertarán restos de glicina entre aminoácidos voluminosos y la cisteína que se usará como segundo sitio de unión, para evitar un impedimento estérico potencial del aminoácido más voluminoso en la reacción de acoplamiento. En una realización adicional de la invención, el engarce aminoacídico GGC-NH<sub>2</sub> se fusiona con el extremo C-terminal del péptido antigénico.

El resto de cisteína presente en el péptido antigénico tiene que estar en su estado reducido para reaccionar con el reticulante heterobifuncional en la VLP activada, es decir tiene que estar disponible una cisteína libre o un resto de cisteína con un grupo sulfhidrilo libre. En el caso en el que el resto de cisteína que funciona como sitio de unión esté en una forma oxidada, por ejemplo, si está formando un puente disulfuro, es necesaria la reducción de este puente disulfuro con, por ejemplo, DTT, TCEP o p-mercaptoetanol. Bajas concentraciones de agente reductor son compatibles con el acoplamiento como se describe en el documento WO02/05690, concentraciones mayores inhiben la reacción de acoplamiento, como sabrá un especialista, en cuyo caso el agente reductor tiene que eliminarse o su concentración disminuirse antes del acoplamiento, por ejemplo mediante diálisis, filtración en gel o HPLC de fase inversa.

La unión del péptido antigénico a la VLP usando un reticulante heterobifuncional de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, permite el acoplamiento del péptido antigénico con la VLP de una forma orientada. Otros procedimientos de unión del péptido antigénico con la VLP incluyen procedimientos en los que el péptido antigénico se reticula con la VLP usando la carbodiimida EDC y NHS.

En otros procedimientos, el péptido antigénico se une a la VLP usando un reticulante homobifuncional tal como glutaraldehído, DSGBM [PEO] 4, BS3, (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, Estados Unidos) u otros reticulantes homobifuncionales conocidos con grupos funcionales reactivos hacia grupos amina o grupos carboxilo de la VLP.

Otros procedimientos de unión de la VLP a un péptido antigénico incluyen procedimientos en los que la VLP está biotinilada y el péptido antigénico se expresa como una proteína de fusión con estreptavidina, o procedimientos en los que tanto el péptido antigénico como la VLP están biotinilados, por ejemplo como se describe en el documento WO 00/23955. En este caso, el péptido antigénico puede unirse primero a estreptavidina o avidina por ajuste de la proporción de péptido antigénico respecto a estreptavidina de modo que los sitios de unión libres estén todavía disponibles para la unión de la VLP, que se añade en la siguiente etapa. Como alternativa, todos los componentes pueden mezclarse en una reacción "en un recipiente". Otros pares de ligando-receptor, en los que está disponible una forma soluble del receptor y del ligando y que son capaces de reticularse con la VLP o el péptido antigénico, pueden usarse como agentes de unión para la unión del péptido antigénico a la VLP. Como alternativa, bien el ligando o bien el receptor pueden fusionarse con el péptido antigénico y de este modo mediar la unión con la VLP químicamente unida o fusionada al receptor, o al ligando, respectivamente. La fusión también puede efectuarse por inserción o sustitución.

Pueden unirse una o varias moléculas antigénicas a una subunidad de la cápsida o VLP de proteínas de cubierta de fagos de ARN, preferentemente a través de los restos de lisina expuestos de la VLP de fagos de ARN, si se puede permitir estéricamente. Una característica específica de la VLP de la proteína de cubierta de fagos de ARN y en particular de la VLP de la proteína de cubierta de QP es por lo tanto la posibilidad de acoplar varios antígenos por subunidad. Esto permite la generación de una matriz de antígenos densa.

En una realización de la invención, la unión y el acoplamiento, respectivamente, de el al menos un antígeno o determinante antigénico con la partícula similar a virus es por medio de interacción y asociación, respectivamente, entre al menos un primer sitio de unión de la partícula similar a virus y al menos una segunda unión del péptido antigénico.

Las VLP o cápsidas de proteína de cubierta Q presentan un número definido de restos de lisina en su superficie, con una topología definida con tres restos de lisina dirigidos hacia el interior de la cápsida y que interactúan con el ARN y otros cuatro restos de lisina expuestos hacia el exterior de la cápsida. Estas propiedades definidas favorecen la unión de antígenos al exterior de la partícula, más que al interior de la partícula, donde los restos de lisina interactúan con el ARN. Las VLP de otras proteínas de cubierta de fago de ARN también tienen un número definido de restos de lisina en su superficie y una topología definida de estos restos de lisina.

En una realización adicional de la presente invención, el primer sitio de unión es un resto de lisina y/o la segunda unión comprende un grupo sulfhidrilo o un resto de cisteína. En una realización adicional más de la presente invención, el primer sitio de unión es un resto de lisina y la segunda unión es un resto de cisteína. En realizaciones adicionales de la invención, el antígeno o determinante antigénico se une mediante un resto de cisteína a restos de

lisina de la VLP de una proteína de cubierta de fago de ARN y en particular a la VLP de la proteína de cubierta de Qbeta.

Otra ventaja de las VLP derivadas de fagos de ARN es su alto rendimiento de expresión en bacterias que permite la producción de grandes cantidades de material a un coste razonable. Además, el uso de las VLP como vehículos permite la formación de matrices de antígenos robustas y conjugados de antígenos robustos, respectivamente, con una densidad de antígenos variable. En particular, el uso de las VLP de fagos de ARN y en este documento en particular el uso de la VLP de proteína de cubierta de Qbeta de fago de ARN permite conseguir una densidad de epítopes muy elevada.

En algunas realizaciones de la invención, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender mezclas de conjugados inmunogénicos, es decir, vehículos inmunogénicos acoplados a uno o varios péptidos de IgE antigénicos de la invención. Por lo tanto, estas composiciones inmunogénicas pueden estar compuestas de vehículos inmunogénicos que difieran en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, podrían prepararse composiciones de vacunas que comprenden una VLP "de tipo silvestre" y una proteína VLP modificada en la que se han modificado (por ejemplo, delecionado, insertado o sustituido) uno o más restos aminoácidos. Como alternativa, podría usarse el mismo vehículo inmunogénico pero acoplado a péptidos de IgE antigénicos de secuencias de aminoácidos diferentes.

La divulgación también se refiere por lo tanto a un procedimiento para producir un inmunógeno de acuerdo con la divulgación que comprende i) proporcionar un péptido de IgE antigénico de acuerdo con la divulgación, ii) proporcionar un vehículo inmunogénico de acuerdo con la divulgación, preferentemente una VLP y iii) combinar dicho péptido de IgE antigénico y dicho vehículo inmunogénico. En una realización, dicha etapa de combinación se produce por reticulación química, preferentemente a través de un reticulante heterobifuncional.

En una realización, el péptido de IgE antigénico de la divulgación está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 y 430.

En otra realización, el péptido de IgE antigénico de la divulgación está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152 y 153.

Preferentemente dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 133, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 144, 145 y 148. Más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 99, 100, 101, 102, 103, 109, 110, 111, 112, 118, 119, 120, 126, 127, 133 y 139. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 63, 64, 65, 66, 67, 76, 77, 78, 79, 88, 89, 90, 99, 100, 101 y 109. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21, 22, 34, 35, 36, 37, 49, 50, 51, 63, 64 y 76. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 18, 19 y 34. Lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 o 18.

5 En otra realización, el péptido de IgE antigénico de la divulgación está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218 y 219. Preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 192, 193, 194, 195, 196, 199, 200, 201, 202, 205, 206, 207, 210, 211, 214 y 217.

10 Más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 165, 166, 167, 168, 169, 175, 176, 177, 178, 184, 185, 186, 192, 193, 199 y 200. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154, 155, 156, 165, 166 y 175. Lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 o 165.

20 En otra realización, el péptido de IgE antigénico de la divulgación está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309 y 310. Preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 283, 284, 285, 286, 287, 290, 291, 292, 293, 296, 297, 298, 301, 302 y 305. Más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 256, 257, 258, 259, 260, 266, 267, 268, 269, 275, 276, 277, 283, 284 y 290. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 233, 234, 235, 236, 245, 246, 247, 256, 257 y 266. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 233, 234 y 245. Lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 o 233.

40 En otra realización más, el péptido de IgE antigénico de la invención está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 y 430. Preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 353, 354, 355, 356, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 403, 404, 405, 406, 407, 410, 411, 412, 413, 416, 417, 418, 421, 422 y 425. Más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 376, 377, 378, 379, 380, 386, 387, 388, 389, 395, 396, 397, 403, 404 y 410. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 340, 341, 342, 343, 344, 353, 354, 355, 356, 366, 367, 376, 377 y 386. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 326, 327, 328, 340, 341 y 353. Aún más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312 y 326. Lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 o 312.

65 En una realización de la presente divulgación, el péptido de IgE antigénico descrito en este documento se une a una molécula de vehículo inmunogénico. En una realización dicho vehículo inmunogénico se selecciona del grupo constituido por cualquiera de los vehículos inmunogénicos descritos en este documento. En otra realización, dicho vehículo inmunogénico se selecciona del grupo constituido por: albúminas séricas tales como albúmina sérica bovina (BSA); globulinas; tiroglobulinas; hemoglobinas; hemocianinas (particularmente Hemocianina de Lapa Californiana [KLH]) y partículas similares a virus (VLP). En una realización preferida dicho vehículo inmunogénico es Hemocianina de Lapa Californiana o partículas similares a virus (VLP). En una realización incluso preferida, dicho vehículo inmunogénico es una VLP seleccionada del grupo constituido por VLP de HBcAg, VLP de HBsAg, VLP de Qbeta o cualquier variante divulgada en este documento. En una realización incluso preferida, dicho vehículo inmunogénico es una VLP de Qbeta seleccionada del grupo constituido por CP de Qbeta; A1 de Qbeta, Qbeta-240,

Qbeta-243, Qbeta-250, Qbeta-251 y Qbeta-259 (divulgadas en el documento WO03/024481).

En una realización, dicho vehículo inmunogénico se une covalentemente al péptido de IgE antigénico descrito en este documento directamente o mediante un engarce. En una realización, dicho vehículo inmunogénico se une al péptido de IgE antigénico divulgado en este documento por expresión de una proteína de fusión como se describe en este documento. En otra realización, el péptido de IgE antigénico divulgado en este documento se une al vehículo inmunogénico, preferentemente una VLP, por medio de una reticulación química como se describe en este documento y preferentemente, usando un reticulante heterobifuncional. Se conocen en la técnica varios reticulantes heterobifuncionales. En algunas realizaciones, el reticulante heterobifuncional contiene un grupo funcional que puede reaccionar con primeros sitios de unión, es decir, con el grupo amino de cadena lateral de restos de lisina de la VLP o subunidad de VLP y contiene un grupo funcional adicional que puede reaccionar con un segundo sitio de unión preferido, es decir un resto de cisteína fusionado con el péptido antigénico que se ha hecho disponible para la reacción mediante reducción.

Por lo tanto en una realización de la presente divulgación el péptido de IgE antigénico divulgado en este documento comprende además bien en su extremo N-terminal, o bien en su extremo C-terminal o en ambos extremos N-terminal y C-terminal un engarce que es capaz de reaccionar con un sitio de unión del vehículo inmunogénico en una reacción de reticulación química. En una realización, el péptido de IgE antigénico descrito en este documento comprende además en su extremo C-terminal un engarce que tiene la fórmula  $(G)_nC$  en la que n es un número entero seleccionado del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, preferentemente del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5, más preferentemente de los grupos constituidos por 0, 1, 2 y 3, lo más preferentemente n es 0 o 1 (cuando n es igual a 0 dicha fórmula representa una cisteína). Preferentemente, el péptido de IgE antigénico descrito en este documento comprende además en su extremo C-terminal un engarce que tiene la fórmula GGGC, GGC, GC o C.

En otra realización de la presente divulgación el péptido de IgE antigénico divulgado en este documento comprende además en su extremo N-terminal un engarce que tiene la fórmula  $C(G)_n$ , en la que n es un número entero seleccionado del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, preferentemente del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5, más preferentemente de los grupos constituidos por 0, 1, 2 y 3, lo más preferentemente n es 0 o 1 (cuando n es igual a 0 la fórmula representa una cisteína). Preferentemente, el péptido de IgE antigénico descrito en este documento comprende además en su extremo N-terminal un engarce que tiene la fórmula CGGG, CGG, CG o C.

En otra realización el péptido de IgE antigénico divulgado en este documento comprende además en su extremo N-terminal un engarce que tiene la fórmula GGGC, GGC, GC o C.

En otra realización el péptido de IgE antigénico divulgado en este documento comprende además en su extremo C-terminal un engarce que tiene la fórmula  $(G)_nC$  en la que n es un número entero seleccionado del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, preferentemente del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5, más preferentemente de los grupos constituidos por 0, 1, 2 y 3, lo más preferentemente n es 0 o 1 (cuando n es igual a 0 dicha fórmula representa una cisteína) y en su extremo N-terminal un engarce que tiene la fórmula  $C(G)_n$ , en la que n es un número entero seleccionado del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, preferentemente del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5, más preferentemente de los grupos constituidos por 0, 1, 2 y 3, lo más preferentemente n es 0 o 1 (cuando n es igual a 0 la fórmula representa una cisteína). Preferentemente el péptido de IgE antigénico divulgado en este documento comprende además en su extremo N-terminal un engarce que tiene la fórmula GGGC, GGC, GC o C y en su extremo C-terminal un engarce que tiene la fórmula GGGC, GGC, GC o C. Más preferentemente el péptido de IgE antigénico divulgado en este documento comprende además en su extremo N-terminal una cisteína y en su extremo C-terminal una cisteína.

Se divulgan representantes de dichos péptidos de IgE antigénicos que comprenden además dicho engarce en las SEC ID N.<sup>os</sup>: 434, 436, 437, 438 y 439. En una realización de la divulgación, el péptido de IgE antigénico que comprende un engarce es cualquiera de los péptidos divulgados en la tabla 9.

El resto de cisteína añadido en el extremo N-terminal y/o extremo C-terminal del péptido antigénico de IgE está disponible para reacción por reducción (reticulación química) típicamente y preferentemente usando un reticulante heterobifuncional. Se conocen en la técnica varios reticulantes heterobifuncionales. En algunas realizaciones, el péptido antigénico de IgE que comprende además un engarce descrito en este documento se reticula con el grupo amino de cadena lateral de restos de lisina de una VLP.

Por lo tanto, en una realización, el péptido antigénico de IgE que comprende además un engarce descrito anteriormente se reticula con el vehículo inmunogénico (en particular con una VLP, preferentemente VLP de HBcAg, VLP de HBsAg o VLP de Qbeta). La primera etapa del procedimiento, típicamente denominada derivatización, es la reacción de la VLP con el reticulante. El producto de esta reacción es una VLP activada, también denominada vehículo activado. En la segunda etapa, se elimina el reticulante sin reaccionar usando procedimientos habituales tales como filtración en gel o diálisis. En la tercera etapa, el péptido antigénico se hace reaccionar con la VLP activada y esta etapa se denomina típicamente etapa de acoplamiento. El péptido antigénico sin reaccionar puede eliminarse opcionalmente en una cuarta etapa, por ejemplo mediante diálisis. Se conocen en la técnica varios reticulantes heterobifuncionales. Estos incluyen los reticulantes preferidos SMPH (succinimidil-6- $\beta$ -maleimidopropionamido]hexanoato), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA y otros reticulantes disponibles por ejemplo en la Pierce Chemical Company (Rockford, IL, Estados Unidos) y que tienen un grupo funcional reactivo hacia grupos amino y un grupo funcional reactivo hacia restos de cisteína. Todos los reticulantes mencionados anteriormente conducen a la formación de un enlace tioéter.

En una realización, la divulgación se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1, 2, 3, 18, 19 o 34, lo más preferentemente de la SEC ID N.<sup>o</sup>: 1 o 18, en la que dicha IgE antigénica comprende además en su extremo C-

terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

5 En una realización, la divulgación se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.ºs: 1, 2, 3, 18, 19 o 34, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 1 o 18, en la que dicha IgE antigénica comprende además en su extremo N-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus mediante un enlace tioéter. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

10 En una realización, la divulgación se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 165, 166 y 175, lo más preferentemente, de las SEC ID N.º: 154 o 165, en la que dicha IgE antigénica comprende además en su extremo C-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus mediante un enlace tioéter. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

15 En una realización, la divulgación se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 165, 166 y 175, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 154 o 165, en la que dicha IgE antigénica comprende además en su extremo N-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

20 En una realización, la invención se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 233, 234 y 245, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 220 o 233, en la que dicha IgE antigénica comprende además en su extremo C-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente, dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

25 En una realización, la invención se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 233, 234 y 245, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 220 o 233, en la que dicha IgE antigénica comprende además en su extremo N-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente, dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

30 En una realización, la invención se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.ºs: 311, 312 y 326, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 311 o 312, en la que dicha IgE antigénica comprende además en su extremo C-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

35 En una realización, la invención se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.ºs: 311, 312 y 326, más preferentemente de la SEC ID N.º: 311 o 312, comprendiendo dicha IgE antigénica además en su extremo N-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

40 En una realización, la invención se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.ºs: 311, 312 y 326, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 311 o 312. Preferentemente, dicha IgE antigénica comprende además en su extremo C-terminal un engarce GC, preferentemente un engarce que tiene la fórmula GGC (comprendiendo preferentemente dicho péptido de IgE antigénico en su extremo C-terminal un engarce GC constituido por, o constituido esencialmente por la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 457) que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter usando SMPH (succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato) como reticulante, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la VLP y el resto de cisteína de dicho engarce C-terminal. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

45 En una realización, la invención se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.ºs: 220, 221, 233, 234, 244 y 246, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 220 o 233, que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la VLP y el resto de cisteína de dicho péptido de IgE antigénico. En dicha realización, el péptido de IgE antigénico divulgado en este documento se une al vehículo inmunogénico, preferentemente una VLP, por medio de una reticulación química como se describe en este documento y preferentemente usando un reticulante heterobifuncional. Se conocen en la técnica varios reticulantes heterobifuncionales. En algunas realizaciones, el reticulante heterobifuncional contiene un grupo funcional que puede reaccionar con primeros sitios de unión, es decir con el grupo amino de cadena lateral de restos de lisina de la VLP o subunidad de VLP y un grupo funcional adicional que puede reaccionar con un segundo sitio de unión preferido, es decir el resto de cisteína del péptido antigénico que se ha hecho disponible para la reacción mediante

reducción. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente, dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

En una realización, la invención se refiere a un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por o constituida esencialmente por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 220 que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter usando SMPH (succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato) como reticulante, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la VLP y el resto de cisteína de dicho péptido de IgE antigénico. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente dicha VLP es Qbeta, incluso más preferentemente la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

En una realización particular, cuando la secuencia del péptido de IgE antigénico divulgada en este documento comprende una cisteína, dicho péptido de IgE antigénico se une covalentemente al vehículo inmunogénico directamente por medio de dicha cisteína. En dicha realización, el péptido de IgE antigénico divulgado en este documento se une al vehículo inmunogénico, preferentemente una VLP, por medio de reticulación química como se describe en este documento y preferentemente usando un reticulante heterobifuncional. Se conocen en la técnica varios reticulantes heterobifuncionales. En algunas realizaciones, el reticulante heterobifuncional contiene un grupo funcional que puede reaccionar con primeros sitios de unión, es decir, con el grupo amino de cadena lateral de restos de lisina de la VLP o subunidad de VLP y un grupo funcional adicional que puede reaccionar con un segundo sitio de unión preferido, es decir un resto de cisteína fusionado con el péptido antigénico que se ha hecho disponible para la reacción mediante reducción. Por lo tanto en alguna realización, cuando la secuencia del péptido de IgE antigénico divulgada en este documento comprende una cisteína, dicho péptido de IgE antigénico se reticula químicamente con el vehículo inmunogénico por medio de un enlace tioéter, siendo dicho enlace entre un resto de lisina del vehículo inmunogénico y el resto de cisteína de dicha IgE antigénica. En una realización preferida, dicho vehículo inmunogénico es una VLP, preferentemente una partícula similar a virus de Qbeta (aún más preferentemente la Qbeta de la SEC ID N.º: 435).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos dos inmunógenos descritos en este documento. En una realización, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos dos inmunógenos comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento unido a un vehículo inmunogénico. En una realización dicha composición comprende dos, tres, cuatro o cinco inmunógenos de la presente invención comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento unido a un vehículo inmunogénico.

Preferentemente, cada péptido de IgE antigénico se une individualmente a diferentes moléculas de vehículo inmunogénico (teniendo cada molécula de vehículo inmunogénico solo un tipo de péptido de IgE antigénico conjugado con la misma). En dicha realización, se dice que el péptido de IgE antigénico está conjugado individualmente con el vehículo inmunogénico.

En una realización, la divulgación se refiere a una composición que comprende o está constituida por dos inmunógenos comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento unido a un vehículo inmunogénico. Preferentemente, cada péptido de IgE antigénico se conjuga individualmente con el vehículo inmunogénico.

En una realización, el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno está constituido por: una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152 y 153, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 133, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 144, 145 y 148, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 99, 100, 101, 102, 103, 109, 110, 111, 112, 118, 119, 120, 126, 127, 133 y 139, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 63, 64, 65, 66, 67, 76, 77, 78, 79, 88, 89, 90, 99, 100, 101 y 109, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20, 21, 22, 34, 35, 36, 37, 49, 50, 51, 63, 64 y 76, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1, 2, 3, 18, 19 y 34, lo más preferentemente dicho péptido de IgE antigénico está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 1 o 18.

En una realización, el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218 y 219, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 192, 193, 194, 195, 196, 199, 200, 201, 202, 205, 206, 207, 210, 211, 214 y 217, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 165, 166, 167, 168, 169, 175, 176, 177, 178, 184, 185, 186, 192, 193, 199 y 200, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 165 y 175, lo más preferentemente dicho péptido de IgE antigénico está constituido

por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 154 o 165.

En otra realización, el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309 y 310, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 283, 284, 285, 286, 287, 290, 291, 292, 293, 296, 297, 298, 301, 302 y 305, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 256, 257, 258, 259, 260, 266, 267, 268, 269, 275, 276, 277, 283, 284 y 290, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 223, 224, 233, 234, 235, 236, 245, 246, 247, 256, 257 y 266, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 233, 234 y 245, lo más preferentemente dicho péptido de IgE antigénico está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 220 o 233.

En otra más el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 y 430, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 403, 404, 405, 406, 407, 410, 411, 412, 413, 416, 417, 418, 421, 422 y 425, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 403, 404, 405, 406, 407, 410, 411, 412, 413, 416, 417, 418, 421, 422 y 425, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 376, 377, 378, 379, 380, 386, 387, 388, 389, 395, 396, 397, 403, 404 y 410, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 340, 341, 342, 343, 344, 353, 354, 355, 356, 365, 366, 367, 376, 377 y 386, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 311, 312, 313, 314, 326, 327, 328, 340, 341 y 353, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 311, 312 y 326, lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 311 o 312.

En una realización, la divulgación se refiere a una composición que comprende o está constituida por dos inmunógenos comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico unido a un vehículo inmunogénico en la que, el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 1 y el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por la 165. En otra realización, el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 1 y el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 220. En otra realización, el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 1 y el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 312. Preferentemente, cada péptido de IgE antigénico se conjuga individualmente con el vehículo inmunogénico.

En una realización, la divulgación se refiere a una composición que comprende o está constituida por dos inmunógenos, comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento unido a un vehículo inmunogénico. Preferentemente, cada péptido de IgE antigénico se conjuga individualmente con el vehículo inmunogénico. En una realización, el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno está constituido por: una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218 y 219, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 192, 193, 194, 195, 196, 199, 200, 201, 202, 205, 206, 207, 210, 211, 214 y 217, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 157, 158, 159, 165, 166, 167, 168, 169, 175, 176, 177, 178, 184, 185, 186, 192, 193, 199 y 200, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 154, 155, 156, 165, 166 y 175, lo más preferentemente dicho péptido de IgE antigénico está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 154 o 165.

En una realización, el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309 y 310, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 283, 284, 285, 286, 287, 290, 291, 292, 293, 296, 297, 298, 301, 302 y 305, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 233, 234, 235,

236, 237, 238, 239, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 256, 257, 258, 259, 260, 266, 267, 268, 269, 275, 276, 277, 283, 284 y 290, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 233, 234, 235, 236, 245, 246, 247, 256, 257 y 266, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 233, 234 y 245, lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>o</sup>: 220 o 233.

En otra realización, el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 y 430, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 403, 404, 405, 406, 407, 410, 411, 412, 413, 416, 417, 418, 421, 422 y 425, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 376, 377, 378, 379, 380, 386, 387, 388, 389, 395, 396, 397, 403, 404 y 410, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 340, 341, 342, 343, 344, 353, 354, 355, 356, 365, 366, 367, 376, 377 y 386, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 326, 327, 328, 340, 341 y 353, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312 y 326, lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>o</sup>: 311 o 312.

En una realización, la divulgación se refiere a una composición que comprende o está constituida por dos inmunógenos comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico unido a un vehículo inmunogénico en la que, el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>o</sup>: 165 y el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por la 220. En otra realización, el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>o</sup>: 165 y el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>o</sup>: 312. Preferentemente, cada péptido de IgE antigénico se conjuga individualmente con el vehículo inmunogénico.

En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende o está constituida por dos inmunógenos, comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento unido a un vehículo inmunogénico. Preferentemente, cada péptido de IgE antigénico se conjuga individualmente con el vehículo inmunogénico. En una realización, el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno está constituido por: una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309 y 310, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 283, 284, 285, 286, 287, 290, 291, 292, 293, 296, 297, 298, 301, 302 y 305, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 256, 257, 258, 259, 260, 266, 267, 268, 269, 275, 276, 277, 283, 284 y 290, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>o</sup>: 220, 221, 222, 223, 224, 233, 234, 235, 236, 245, 246, 247, 256, 257 y 266, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 233, 234 y 245, lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.<sup>o</sup>: 220 o 233.

En una realización, el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 y 430, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 403, 404, 405, 406, 407, 410, 411, 412, 413, 416, 417, 418, 421, 422 y 425, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 376, 377, 378, 379, 380, 386, 387, 388, 389, 395, 396, 397, 403, 404 y 410, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 340, 341, 342, 343, 344, 353, 354, 355, 356, 365, 366, 367, 376, 377 y 386, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 326, 327, 328, 340, 341 y 353, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312 y 326, lo más preferentemente, dicho péptido de IgE antigénico está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID

N.º: 311 o 312.

En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende o está constituida por dos inmunógenos, comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico unido a un vehículo inmunogénico en la que, el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno está constituido por una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 220 y el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno está constituido por la 5 312. Preferentemente, cada péptido de IgE antigénico se conjuga individualmente con el vehículo inmunogénico.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el inmunógeno de la composición divulgado en este documento anteriormente se une, preferentemente se reticula químicamente, con un vehículo inmunogénico bien directamente o bien por medio de un engarce como se divulga en este documento. En una realización, el vehículo 10 inmunogénico es Hemocianina de Lapa Californiana [KLH] o una partícula similar a virus (VLP). En una realización preferida, dicho vehículo inmunogénico es una VLP seleccionada del grupo constituido por VLP de HBsAg, VLP de HBsAg, VLP de Qbeta o cualquier variante divulgada en este documento. En una realización aún preferida, dicho vehículo inmunogénico es una VLP de Qbeta seleccionada del grupo constituido por CP de Qbeta; A1 de Qbeta, Qbeta-240, Qbeta-243, Qbeta-250, Qbeta-251 y Qbeta-259. En una realización, la invención se refiere a una 15 composición que comprende o está constituida por dos inmunógenos comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento unido a un vehículo inmunogénico. En una realización, el primer inmunógeno está constituido por un inmunógeno que comprende una IgE antigénica que está constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 220, 221, 233, 234, 244 y 246, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 220 o 233, que se reticula químicamente con una partícula similar a virus de Qbeta (más preferentemente, Qbeta de la SEC ID N.º: 435) por medio de un enlace tioéter, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la VLP y el resto de cisteína de dicho péptido de IgE antigénico y el segundo 20 inmunógeno está constituido por un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.º: 311, 312 y 326, más preferentemente de la SEC ID N.º: 311 o 312, comprendiendo dicha IgE antigénica además en su extremo C-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus de Qbeta, más preferentemente la Qbeta de la SEC ID N.º: 435. Preferentemente cada péptido de IgE antigénico se conjuga individualmente con el vehículo inmunogénico.

En una realización, la divulgación se refiere a una composición que comprende o está constituida por dos inmunógenos, comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento unido a un vehículo inmunogénico. En una realización, el primer inmunógeno está constituido por un 30 inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.º: 220, 221, 233, 234, 244 y 246, más preferentemente de la SEC ID N.º: 220 o 233, que se reticula químicamente con una partícula similar a virus de Qbeta (más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435) por medio de un enlace tioéter, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la VLP y el resto de cisteína de dicho péptido de IgE antigénico, el segundo inmunógeno está constituido por un inmunógeno que 35 comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.º: 1, 2, 3, 18, 19 o 34, más preferentemente de la SEC ID N.º: 1 o 18, comprendiendo dicha IgE antigénica además en su extremo C-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus de Qbeta, más preferentemente la Qbeta de la SEC ID N.º: 435. Preferentemente, cada péptido de IgE antigénico se conjuga individualmente con el vehículo inmunogénico.

En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende o está constituida por tres 40 inmunógenos, comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico descrito en este documento unido a un vehículo inmunogénico. En una realización, el primer inmunógeno está constituido por un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.º: 220, 221, 233, 234, 244 y 246, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 220 o 45 233, que se reticula químicamente con una partícula similar a virus de Qbeta (más particularmente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435) por medio de un enlace tioéter, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la VLP y el resto de cisteína de dicho péptido de IgE antigénico, el segundo inmunógeno está constituido por un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.º: 311, 312 y 326, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 311 o 312, comprendiendo dicha IgE 50 antigénica además en su extremo C-terminal una cisteína que se reticula químicamente con una partícula similar a virus de Qbeta, más preferentemente la Qbeta de la SEC ID N.º: 435 y el tercer inmunógeno está constituido por un inmunógeno que comprende una IgE antigénica constituida por, o constituida esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.º: 1, 2, 3, 18, 19 o 34, lo más preferentemente, de la SEC ID N.º: 1 o 18, comprendiendo dicha IgE antigénica además en su extremo C-terminal una cisteína que se reticula químicamente 55 con una partícula similar a virus de Qbeta, más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435. Preferentemente, cada péptido de IgE antigénico se conjuga individualmente con el vehículo inmunogénico.

En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende o está constituida por dos 60 inmunógenos, comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento conjugado individualmente con un vehículo inmunogénico. En una realización el primer inmunógeno está constituido por un inmunógeno que comprende un péptido de IgE antigénico constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.º: 220, 221, 233, 234, 244 y 246, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 220 o 233. Preferentemente dicho primer péptido de IgE antigénico se reticula químicamente con una partícula similar a virus de Qbeta (más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435) por 65 medio de un enlace tioéter usando SMPH (succinimidil-6- $\beta$ -maleimidopropionamido)hexanoato) como reticulante, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la VLP y el resto de cisteína de dicho péptido de IgE antigénico. Preferentemente, el segundo inmunógeno está constituido por un inmunógeno que comprende un péptido de IgE antigénico constituido por, o constituido esencialmente por, una secuencia de aminoácidos de las SEC ID N.º: 311, 312 y 326, lo más preferentemente de la SEC ID N.º: 311 o 312. Preferentemente, dicho segundo péptido de IgE 70 antigénico comprende además en su extremo C-terminal un engarce GC, preferentemente un engarce que tiene la fórmula GGC (comprendiendo preferentemente dicho segundo péptido de IgE antigénico en su extremo C-terminal un engarce GC constituido por, o constituido esencialmente por la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 457),

que se reticula químicamente con una partícula similar a virus por medio de un enlace tioéter usando SMPH (succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato) como reticulante, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la VLP y el resto de cisteína de dicho engarce C-terminal. En una realización preferida, dicha VLP se selecciona del grupo constituido por HBcAg, HBsAg y Qbeta. Preferentemente, dicha VLP es Qbeta, aún más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435.

En una realización, la divulgación se refiere a una composición que comprende o está constituida por dos, tres, cuatro o más inmunógenos comprendiendo cada uno de estos inmunógenos un péptido de IgE antigénico unido a un vehículo inmunogénico y estando dicho péptido de IgE antigénico constituido por, o estando esencialmente constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429 y 430. En una realización, dichos péptidos de IgE antigénicos se unen al mismo vehículo inmunogénico. En otra realización, dichos péptidos de IgE antigénicos se unen a un vehículo inmunogénico diferente y después se mezclan.

### Procedimiento de producción del inmunógeno de la divulgación

La divulgación se refiere además a un procedimiento para la producción del inmunógeno divulgado en este documento. En una realización dicho inmunógeno comprende al menos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento unido a un vehículo inmunogénico divulgado en este documento. Por lo tanto la divulgación se refiere además a un procedimiento para la producción de un inmunógeno que comprende la etapa de unir al menos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento a un vehículo inmunogénico divulgado en este documento. En una realización, dicho enlace se realiza por reticulación química, directamente o por medio de un engarce, en particular un engarce GC (por ejemplo, una cisteína) como se divulga en este documento. En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un inmunógeno que comprende la etapa de unir al menos un péptido de IgE antigénico divulgado en este documento, que comprende opcionalmente además un engarce como se divulga en este documento, a una VLP divulgada en este documento, realizándose dicho enlace por reticulación química, bien directamente o bien por medio de un engarce, en particular un engarce GC (por ejemplo una cisteína) como se divulga en este documento. En una realización particular, cuando la secuencia del péptido de IgE antigénico divulgado en este documento comprende una cisteína, dicho péptido de IgE antigénico se une covalentemente a la VLP directamente por medio de dicha cisteína. En dicha realización, el procedimiento incluye una etapa de reticulación química como se describe en este documento y preferentemente usando un reticulante heterobifuncional (por ejemplo, éster de *N*-gamma-maleimido-butiriloxi-succinimida (GMBS) o succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato (SMPH)). Por lo tanto en algunas realizaciones, la etapa de reticulación química da como resultado que la VLP se entrecruce por medio de un enlace tioéter, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la VLP y el resto de cisteína de dicha IgE antigénica. En una realización preferida, dicha VLP es preferentemente una partícula similar a virus de Qbeta (aún más preferentemente, la Qbeta de la SEC ID N.º: 435). Una realización adicional de la presente divulgación se refiere a un inmunógeno que puede obtenerse mediante el procedimiento divulgado en este documento.

### Composiciones que comprenden un péptido de IgE antigénico de la invención

La presente divulgación se refiere además a composiciones, particularmente composiciones inmunogénicas también denominadas "composiciones inmunogénicas objeto", que comprenden un péptido de IgE antigénico de la invención, preferentemente unido a un vehículo inmunogénico, más preferentemente una VLP, aún más preferentemente una VLP de HBsAg, HbcAg o Qbeta y opcionalmente, al menos un adyuvante. Dichas composiciones inmunogénicas, particularmente cuando se formulan como composiciones farmacéuticas, se consideran útiles para prevenir, tratar o aliviar trastornos relacionados con IgE.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica objeto de acuerdo con la divulgación comprende un péptido de IgE antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N.ºs: 1 a 430 y variantes funcionalmente activas de las mismas, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 430, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente, del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 220 a 430. En alguna realización, dicho péptido de IgE antigénico se une a un vehículo inmunogénico, preferentemente una VLP, más preferentemente a una VLP de HBsAg, HbcAg o Qbeta. Una composición inmunogénica objeto que comprende un péptido de IgE antigénico de acuerdo con la invención puede formularse de varias formas, como se describe en más detalle a continuación.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica objeto comprende una sola especie de péptido de IgE antigénico, por ejemplo, la composición inmunogénica comprende una población de péptidos de IgE antigénicos, teniendo sustancialmente todos la misma secuencia de aminoácidos. En otras realizaciones, una composición inmunogénica objeto comprende dos o más péptidos de IgE antigénicos diferentes, por ejemplo, la composición inmunogénica objeto comprende una población de péptidos de IgE antigénicos, pudiendo los miembros de dicha población diferir en la secuencia de aminoácidos. Una composición inmunogénica objeto puede comprender de dos a aproximadamente 20 péptidos de IgE antigénicos diferentes, por ejemplo, una composición inmunogénica objeto puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11-15 o 15-20 péptidos de IgE antigénicos diferentes, teniendo cada uno un aminoácido que difiere de las secuencias de aminoácidos de los otros péptidos de IgE antigénicos.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición inmunogénica objeto comprende un primer péptido de IgE antigénico, preferentemente unido a un vehículo inmunogénico, más preferentemente a una VLP, aún más preferentemente a una VLP de HBsAg, HbcAg o Qbeta y que comprende una primera secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430; y al menos un segundo péptido de IgE antigénico, preferentemente unido a un vehículo inmunogénico, más preferentemente a una VLP, aún más preferentemente a una VLP de HBsAg, HbcAg o Qbeta y que comprende una segunda secuencia de aminoácidos, preferentemente seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 430; difiriendo la segunda secuencia de aminoácidos de la primera secuencia de aminoácidos en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10 o 15 aminoácidos. En una realización adicional, el primer péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 a 430 y dicho segundo péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 310, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 310, o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 a 219, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 310. En otra realización adicional, el primer péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 310 y dicho segundo péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 219 y 311 a 430, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 a 430 o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153, o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 a 219, más preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 a 430. En otra realización adicional, el primer péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y dicho segundo péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 a 430, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 310, de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 a 430 o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 a 219. En otra realización adicional, el primer péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 a 219 y dicho segundo péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 y 220 a 430, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 310, o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153, o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 a 430.

Como otro ejemplo, una composición inmunogénica objeto comprende un primer péptido de IgE antigénico, preferentemente unido a un vehículo inmunogénico, más preferentemente a una VLP, aún más preferentemente a una VLP de HBsAg, HbcAg o Qbeta y que comprende una primera secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430; un segundo péptido de IgE antigénico, preferentemente unido a un vehículo inmunogénico, más preferentemente a una VLP, aún más preferentemente a una VLP de HBsAg, HbcAg o Qbeta y que comprende una segunda secuencia de aminoácidos, preferentemente seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, difiriendo la segunda secuencia de aminoácidos de la primera secuencia de aminoácidos en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10 o 15 aminoácidos; y al menos un tercer polipéptido de IgE antigénico, preferentemente unido a un vehículo inmunogénico, más preferentemente a una VLP, aún más preferentemente a una VLP de HBsAg, HbcAg o Qbeta y que comprende una tercera secuencia de aminoácidos, preferentemente seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 430, difiriendo la tercera secuencia de aminoácidos tanto de la primera como de la segunda secuencia de aminoácidos en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 10 o 15 aminoácidos. En una realización adicional, el primer péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 a 430; y dicho segundo y tercer péptidos de IgE antigénicos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 310, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 310 o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 a 219.

En otra realización adicional, el primer péptido de IgE antigénico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220 a 310 y dichos segundo y tercer péptidos de IgE antigénicos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 219 y 311 a 430, preferentemente del grupo constituido por las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311 a 430 o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 1 a 153 o de las SEC ID N.<sup>os</sup>: 154 a 219.

En otras realizaciones, una composición inmunogénica objeto comprende un polipéptido de IgE antigénico multimerizado, como se ha descrito anteriormente. Como se usa en este documento, las expresiones "composición inmunogénica que comprende un péptido de IgE antigénico" o "composición inmunogénica de la invención" o "composición inmunogénica objeto" se refieren a una composición inmunogénica que comprende una sola especie (multimerizada o no) o múltiples especies de un péptido o péptidos de IgE antigénicos acoplados o no a un vehículo inmunogénico. Cuando se usan dos o más péptidos acoplados a un vehículo, el péptido puede acoplarse a la misma molécula de vehículo o acoplarse individualmente a moléculas de vehículo y después combinarse para producir una composición inmunogénica. Otro aspecto de la divulgación se refiere a procedimientos para producir un inmunógeno de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho procedimiento el acoplamiento de un péptido de IgE antigénico a un vehículo inmunogénico. En una realización, dicho acoplamiento es químico.

En algunas realizaciones, una composición inmunogénica objeto comprende al menos un adyuvante. Los adyuvantes adecuados incluyen los adecuados para uso en mamíferos, preferentemente en seres humanos. Los ejemplos de adyuvantes adecuados conocidos que pueden usarse en seres humanos incluyen, pero no necesariamente se limitan a, alumbre, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, MF59 (escualeno al 4,3 % p/v, polisorbato 80 (Tween 80) al 0,5 % p/v, trioleato de sorbitán (Span 85) al 0,5 % p/v, ácido nucleico que contiene CpG (en el que la citosina no está metilada), QS21 (adyuvante de saponina), MPL (Monofosforil Lípido A), 3DMPL (MPL 3-O-desacilado), extractos de Aquilla, ISCOMS (véase, por ejemplo, Sjolander y col. (1998) *J. Leukocyte Biol.* 64: 713; documentos WO90/03184, WO96/11711, WO 00/48630, WO98/36772, WO00/41720, WO06/134423 y WO07/026190), mutantes de LT/CT, micropartículas de poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLG), Quil A, interleucinas y similares. Para aplicaciones veterinarias incluyendo, pero sin limitación, la experimentación animal, se puede usar adyuvante de Freund, *N*-acetil-muramilo-*L*-treonil-*D*-isoglutamina (thr-MDP), *N*-acetil-nor-muramilo-*L*-alanil-*D*-isoglutamina (CGP 11637, denominada nor-MDP), *N*-acetilmuramilo-*L*-alanil-*D*-isoglutaminil-*L*-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominada MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno/Tween 80 al 2 %.

Los adyuvantes ejemplares adicionales para aumentar la eficacia de la composición incluyen, pero sin limitación: (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos muramilo (véase a continuación) o componentes de la pared celular bacteriana) tales como, por ejemplo, (a) MF59™ (documento WO90/14837; Capítulo 10 en *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene Escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % (monooleato de polioxietilensorbitán) y Span 85 (trioleato de sorbitán) al 0,5 % (que contiene opcionalmente tripéptido muramilo unido covalentemente a dipalmitoil fosfatidiletanolamina (MTP-PE)) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador, (b) SAF, que contiene Escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero bloqueado con plurónico L121 al 5 % y thr-MDP microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado vorticialmente para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula y (c) sistema adyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene Escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 % y uno o más componentes de pared celular bacteriana tales como monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (DETOX™); (2) pueden usarse adyuvantes de saponina, tales como QS21, STIMULON™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA), Abisco® (Isconova, Suecia) o Iscomatrix® (Commonwealth Serum Laboratories, Australia), o partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes), pudiendo dichos ISCOM estar desprovistos de detergente adicional, por ejemplo, documento WO00/07621; (3) Adyuvante completo de Freund (CFA) y Adyuvante Incompleto de Freund (IFA); (4) citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (documento WO99/44636), etc.), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc.; (5) monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) por ejemplo documentos GB-2220221, EP-A-0689454, opcionalmente en ausencia sustancial de alumbre cuando se usa con sacáridos neumocócicos por ejemplo documento WO00/56358; (6) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua por ejemplo documentos EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG [Krieg *Vaccine* 2000, 19, 618-622; Krieg *Curr Opin Mol Ther* 2001 3: 15-24; Roman y col., *Nat Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner y col., *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis y col., *J. Immunol.*, 1998, 160, 870-876; Chu y col., *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford y col., *Ear. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveami y col., *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224, Krieg y col., *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman y col., *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas y col., *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery y col., *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern y col., *Cell Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto y col., *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey y col., *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina y col., *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi y col., *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi y col., *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi y col., *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; y Yi y col., *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898-5906; Solicitudes de Patente Internacional WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 y WO98/52581], es decir que contiene al menos un dinucleótido CG, en el que la citosina no está metilada; (8) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno por ejemplo documento WO99/52549; (9) un tensioactivo de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207) o un tensioactivo de éter o éster alquílico de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como octoxinol (documento WO01/21152); (10) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo un oligonucleótido CpG) (documento WO00/62800); (11) un inmunoestimulante y una partícula de sal de metal, por ejemplo, documento WO00/23105; (12) una saponina y una emulsión de aceite en agua, por ejemplo, documento WO99/11241; (13) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + SM2 (opcionalmente + un esteroide), por ejemplo, documento WO98/57659; (14) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para aumentar la eficacia de la composición, tales como péptidos Muramilo incluyen *N*-acetil-muramilo-*L*-treonil-*D*-isoglutamina (thr-MDP), *N*-25 acetil-normuramilo-*L*-alanil-*D*-isoglutamina (nor-MDP), *N*-acetilmuramilo-*L*-alanil-*D*-isoglutaminil-*L*-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), (15) ligandos para receptores de tipo peaje (*toll*) (TLR), naturales o sintetizados (por ejemplo, como se describe en Kanzler y col. 2007, *Nature Medicine* 13, págs. 1552-9), incluyendo ligandos de TLR3 tales como polil: C y compuestos similares tales como Hiltonol y Ampligen.

En una realización, la composición inmunogénica de la presente invención comprende al menos un adyuvante. En una realización particular, dicho adyuvante es un oligonucleótido inmunoestimulador y más preferentemente un oligonucleótido CpG. En una realización, el oligonucleótido CpG tiene la secuencia de ácido nucleico 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (ODN CpG 24555; SEC ID N.º: 431). La secuencia de ácido nucleico del oligonucleótido inmunoestimulador de la SEC ID N.º: 431 difiere de un oligonucleótido inmunoestimulador previamente descrito (ODN 10103) 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEC ID N.º: 432) por la inversión del dinucleótido CG más 3'. Las similitudes en la actividad entre estos dos oligonucleótidos inmunoestimuladores es sorprendente porque se ha descrito previamente porque la actividad inmunoestimuladora de oligonucleótidos CpG depende del número de motivos CpG, de las secuencias que flanquean el dinucleótido CG, de la localización del motivo o motivos CpG y de la separación entre los motivos CpG (Ballas y col., 1996, *J. Immunol.*; Hartmann y col., 2000, *J. Immunol.*; Klinman y col., 2003, *Clin. Exp. Immunol.*). La eliminación del dinucleótido CG más 3' en el oligonucleótido inmunoestimulador CpG ODN 24555 (SEC ID N.º: 431) no dio como resultado un impacto negativo

sobre la capacidad de este oligonucleótido inmunoestimulador para aumentar respuestas inmunes específicas de antígeno como se habría esperado de descripciones anteriores. El CpG ODN 24555 demostró una actividad inmunoestimuladora similar y en algunos casos aumentada cuando se comparaba con el CpG ODN 10103.

5 El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser bicatenario o monocatenario. Generalmente, las moléculas bicatenarias son más estables *in vivo*, mientras que las moléculas monocatenarias tienen una actividad inmune aumentada. Por lo tanto, en algunos aspectos de la invención se prefiere que el ácido nucleico sea monocatenario y en otros aspectos se prefiere que el ácido nucleico sea bicatenario.

10 Las expresiones "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan indistintamente en este documento para referirse a múltiples nucleótidos (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo, ribosa o desoxirribosa) unido a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, que es una pirimidina sustituida (por ejemplo, citosina (C), timidina (T) o uracilo (U)) o una purina sustituida (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)). Como se usa en este documento, la expresión se refiere a oligorribonucleótidos (es decir, un polinucleótido menos el fosfato) y cualquier otro polímero que contiene una base orgánica. Pueden obtenerse moléculas de ácido nucleico de fuentes de ácido nucleico existentes (por ejemplo, genómico o ADNc), pero preferentemente son sintéticas (por ejemplo, producidas por síntesis de ácidos nucleicos).

15 En una realización, los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden incluir diversas modificaciones y sustituciones químicas en comparación con el ARN y ADN natural, que impliquen un puente internucleosídico fosfodiéster, una unidad de  $\beta$ -D-ribosa y/o una base de nucleósido natural (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo). El especialista conoce ejemplos de modificaciones químicas y se describen, por ejemplo, en Uhlmann E. y col. (1990), Chem. Rev. 90: 543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke, S.T. y col. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36: 107-129; y Hunziker J. y col., (1995), Mod. Synth. Methods 7: 331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, encontrándose cada modificación en un puente internucleosídico fosfodiéster particular y/o en una unidad de  $\beta$ -D-ribosa particular y/o en una posición de base de nucleósido natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está compuesto por ADN o ARN natural.

20 Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden comprender una o más modificaciones. Dichas modificaciones pueden seleccionarse de: a) la sustitución de un puente internucleosídico fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido por un puente internucleosídico modificado, b) la sustitución de un puente fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido por un puente desfosfo, c) la sustitución de una unidad de fosfato de azúcar de la estructura de fosfato de azúcar por otra unidad, d) la sustitución de una unidad de  $\beta$ -D-ribosa por una unidad de azúcar modificada y e) la sustitución de una base de nucleósido natural.

25 Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas, tales como bases modificadas de pirimidina con propino C-5 y de purina 7-desaza-7-sustituida (Wagner y col., 1996, Nat. Biotechnol. 14: 840-4). Las purinas y pirimidinas incluyen, pero sin limitación, adenina, citosina, guanina, timidina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina y otras nucleobases de origen natural y no natural y restos aromáticos sustituidos y no sustituidos. Los especialistas en la técnica conocen bien otras modificaciones de este tipo.

30 Una base modificada es cualquier base que sea químicamente diferente de las bases de origen natural que se encuentran típicamente en el ADN y ARN, tales como T, C, G, A y U pero que comparten estructuras químicas básicas con estas bases de origen natural. La base de nucleósido modificado puede seleccionarse, por ejemplo, de hipoxantina, dihidouracilo pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquiluracilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), 5-alqueniluracilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-alquiniuracilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clouracilo, 5-flourouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquilitosina (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), 5-alquenilitosina (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-alquinitosina (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N<sup>2</sup>-dimetilguanina, 2,4-diamino-purina, 8-azapurina, una 7-desazapurina sustituida, preferentemente 7-desaza-purina 7-sustituida y/o 7-desaza-purina 8-sustituida, 5-hidroximetilcitosina, N<sup>4</sup>-alquilitosina (por ejemplo, N<sup>4</sup>-etilcitosina), 5-hidroxidesoxicidina, 5-hidroximetilidesoxicidina, N<sup>4</sup>-alquildesoxicidina, por ejemplo, N<sup>4</sup>-etilidesoxicidina, 6-tiodesoxiguanosina y desoxirribonucleósidos de nitropirrol, C5-propinilpirimidina, diaminopurina por ejemplo, 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina u otras modificaciones de una base de nucleósido natural. Esta lista pretende ser ejemplar y no debe considerarse limitante.

35 En algunos aspectos de la invención, el dinucleótido CpG de los oligonucleótidos inmunoestimuladores descritos en este documento está preferentemente no metilado. Un motivo CpG no metilado es una secuencia dinucleotídica de citosina-guanina no metilada (es decir, una citosina 5' no metilada seguida de guanosina 3' y unida por un enlace fosfato). En otros aspectos, los motivos CpG están metilados. Un motivo CpG metilado es una secuencia dinucleotídica de citosina-guanina metilada (es decir, una citosina 5' metilada seguida de una guanosina 3' y unida por un enlace fosfato).

40 En algunos aspectos de la invención, un oligonucleótido inmunoestimulador puede contener una citosina modificada. Una citosina modificada es un análogo de base de pirimidina de origen natural o de origen no natural de citosina que puede sustituir a esta base sin afectar a la actividad inmunoestimuladora del oligonucleótido. Las citosinas modificadas incluyen, pero sin limitación, citosinas sustituidas en posición 5 (por ejemplo, 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-yodo-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-difluorometil-citosina y 5-alquini-citosina no sustituida o sustituida), citosinas sustituidas en posición 6, citosinas sustituidas en posición N<sup>4</sup> (por ejemplo N<sup>4</sup>-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina con sistemas de anillo condensado (por ejemplo, N,N'-propilencitosina o fenoxazina) y uracilo y sus derivados (por ejemplo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo). Algunas de las citosinas preferidas incluyen 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina y N<sup>4</sup>-etil-citosina. En otra realización de la invención, la base de citosina está sustituida por una base universal (por ejemplo 3-nitropirrol, base P), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, fluorobenceno o

difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (dSpacer).

En algunos aspectos de la invención, un oligonucleótido inmunoestimulador puede contener una guanina modificada. Una guanina modificada es un análogo de base de purina de origen natural o de origen no natural de guanina que puede sustituir a esta base sin afectar a la actividad inmunoestimuladora del oligonucleótido. Las guaninas modificadas incluyen, pero sin limitación, 7-desazaguanina, guanina 7-desaza-7-sustituida, hipoxantina, guaninas N2-sustituidas (por ejemplo, N2-metil-guanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazol[4,5-d]pirimidin-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas sustituidas (por ejemplo, N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina), guanina 8-sustituida (por ejemplo, 8-hidroxiguanina u 8-bromoguanina) y 6-tioguanina. En otra realización de la invención, la base de guanina está sustituida por una base universal (por ejemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol o base K), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, benzimidazol o dicloro-benzimidazol, amida del ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico) o un átomo de hidrógeno (dSpacer)).

En determinados aspectos, los oligonucleótidos pueden incluir enlaces internucleotídicos modificados. Estos enlaces modificados pueden ser parcialmente resistentes a degradación (por ejemplo, están estabilizados). Una "molécula de ácido nucleico estabilizada" se referirá a una molécula de ácido nucleico que es relativamente resistente a degradación *in vivo* (por ejemplo, mediante una exo- o endonucleasa). La estabilización puede estar en función de la longitud o de la estructura secundaria. Los ácidos nucleicos que tienen una longitud de decenas a cientos de kilobases son relativamente resistentes a la degradación *in vivo*. Para ácidos nucleicos más cortos, la estructura secundaria puede estabilizar y aumentar su efecto. La formación de una estructura de tallo-bucle puede estabilizar una molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, si el extremo 3' de un ácido nucleico tiene autocomplementariedad con una región cadena arriba de modo que puede plegarse hacia atrás y formar una estructura de tallo-bucle, entonces el ácido el nucleico puede estabilizarse y presentar más actividad.

La estabilización de ácido nucleico también puede conseguirse mediante modificaciones de la cadena principal de fosfato. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato, en algunas realizaciones, pueden proporcionar una actividad máxima y proteger al oligonucleótido de la degradación por exo- y endonucleasas intracelulares.

Para uso *in vivo*, los ácidos nucleicos son preferentemente relativamente resistentes a degradación (por ejemplo, mediante endo- y exonucleasas). Se ha demostrado que la modificación de la cadena principal de ácido nucleico proporciona una actividad aumentada de los ácidos nucleicos cuando se administran *in vivo*. Las estructuras secundarias, tales como tallos-bucles, pueden estabilizar a los ácidos nucleicos frente a la degradación. Como alternativa, la estabilización de ácidos nucleicos puede conseguirse por modificaciones de la cadena principal de fosfato. Un ácido nucleico estabilizado preferido tiene al menos una cadena principal modificada con fosforotioato parcial. Los fosforotioatos pueden sintetizarse usando técnicas automatizadas que emplean bien química de fosforamidoato o bien H-fosfonato. Pueden generarse aril- y alquil-fosfonatos por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º: 4.469.863; y pueden generarse alquifosfotriésteres (en los que el resto oxígeno cargado está alquilado como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º: 5.023.243 y en la Patente Europea N.º: 092.574) mediante síntesis en fase sólida automatizada usando reactivos disponibles en el mercado. Se han descrito procedimientos para generar otras modificaciones y sustituciones de la cadena principal de ADN (Uhlmann, E. y Peyman, A. (1990) Chem. Rev. 90: 544; Goodchild, J. (1990) Bioconjugate Chem. 1: 165). Los ácidos nucleicos 2'-O-metilo con motivos CpG también causan activación inmune, así como los ácidos nucleicos CpG modificados con etoxi. Lo de hecho, no se han descubierto modificaciones de la cadena principal que supriman completamente el efecto de CpG, aunque se reduce enormemente por sustitución de la C con una 5-metil C. Las construcciones que tienen enlaces fosforotioato proporcionan una actividad máxima y protegen al ácido nucleico de la degradación por exo- y endonucleasas intracelulares. Otros ácidos nucleicos modificados incluyen ácidos nucleicos modificados con fosfodiéster, combinaciones de ácido nucleico con fosfodiéster y fosforotioato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi y combinaciones de los mismos. Cada una de estas combinaciones y sus efectos particulares sobre las células inmunes se analizan en más detalle con respecto a ácidos nucleicos CpG en la Solicitudes de Patente PCT Publicadas PCT/US95/01570 (documento WO 96/02555) y PCT/US97/19791 (documento WO 98/18810) y en la Patente de Estados Unidos N.º: 6.194.388 B1 expedida el 27 de febrero de 2001 y la Patente de Estados Unidos N.º: 6.239.116 B1 expedida el 29 de mayo de 2001. Se piensa que estos ácidos nucleicos modificados pueden mostrar más actividad estimuladora debido a la resistencia a nucleasas aumentada, a una captación celular aumentada y a una unión a proteínas aumentada y/o una localización intracelular alterada.

Para la administración *in vivo*, los ácidos nucleicos pueden asociarse con una molécula que de cómo resultado una unión con mayor afinidad a una superficie de célula diana (por ejemplo, célula B, célula monocítica o célula asesina natural (NK)) y/o una captación celular aumentada por células diana para formar un "complejo de suministro de ácido nucleico". Los ácidos nucleicos pueden asociarse iónicamente o covalentemente con moléculas apropiadas usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Pueden usarse una diversidad de agentes de acoplamiento o reticulación tales como proteína A, carbodiimida o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). Como alternativa, los ácidos nucleicos pueden encapsularse en liposomas o virosomas usando técnicas bien conocidas.

Otros ácidos nucleicos estabilizados incluyen, pero sin limitación, análogos de ADN no iónicos tales como alquil- y aril-fosfatos (en los que el oxígeno de fosfonato cargado se sustituye por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquifosfotriésteres, en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado. Los ácidos nucleicos que contienen un diol, tales como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en cualquiera o ambos extremos terminales también han demostrado ser sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas. En algunas realizaciones, un oligonucleótido inmunoestimulador de la invención puede incluir al menos un análogo de nucleótido sustituido lipófilo y/o un dinucleótido de pirimidina-purina.

Los oligonucleótidos pueden tener uno o dos extremos 5' accesibles. Es posible generar oligonucleótidos modificados que tengan dos extremos 5' de este tipo, por ejemplo, por unión de dos oligonucleótidos a través de un enlace 3'-3' para generar un oligonucleótido que tenga uno o dos extremos 5' accesibles. El enlace 3'-3' puede ser un fosfodiéster, fosforotioato o cualquier otro puente internucleosídico modificado. Se conocen en la técnica procedimientos para realizar dichos enlaces. Por ejemplo, dichos enlaces se han descrito en Seliger, H. y col.,

Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3' and 5'-5'-internucleotidic linkages, *Nucleosides & Nucleotides* (1991), 10 (1-3), 469-77 y Jiang y *col.*, Pseudo-cyclic oligonucleotides: *in vitro* and *in vivo* properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7 (12), 2727-2735.

Además, pueden prepararse ODN con unión 3'-3' en los que el enlace entre los nucleósidos terminales 3' no es un fosfodiéster, fosforotioato ni otro puente modificado usando un espaciador adicional, tal como un resto tri- o tetraetilenglicol fosfato (Durand, M. y *col.*, Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)<sub>12</sub> and two (dT)<sub>12</sub> sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31 (38), 9197-204, Patente de Estados Unidos N.º: 5.658.738 y Patente de Estados Unidos N.º: 5.668.265). Como alternativa, el engarce no nucleotídico puede proceder de etanodiol, propanodiol o de una unidad de desoxirribosa abásica (dSpacer) (Fontanel, Marie Laurence y *col.*, Sterical Recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; *Nucleic Acids Research* (1994), 22 (11), 2022-7) usando química de fosforamidita convencional. Los engarces no nucleotídicos pueden incorporarse una vez o múltiples veces o combinarse entre sí dejando cualquier distancia deseable entre los extremos 3' de los dos ODN a unir.

Un puente internucleosídico fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido puede sustituirse por un puente internucleosídico modificado, seleccionándose el puente internucleosídico modificado por ejemplo de puentes fosforotioato, fosforoditioato, NR1R2-fosforamidato, boranofosfato,  $\alpha$ -hidroxibencil fosfonato, éster de fosfato-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-alquilo, fosfato-[(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)aril-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-alquil]éster, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilfosfonato y/o (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)arilfosfonato, (C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>)- $\alpha$ -hidroximetil-arilo (por ejemplo, divulgado en el documento WO 95/01363), donde el arilo-(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)<sub>1</sub>, arilo-(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>) y arilo-(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) se sustituyen opcionalmente por halógeno, alquilo, alcoxi, nitro, ciano y donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son, de forma independiente entre sí, hidrógeno, alquilo-(C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>), arilo-(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>), arilo-(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>), alquilo-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), preferentemente hidrógeno, alquilo-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), preferentemente alquilo-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y/o metoxietilo o R1 y R2 forman, junto con el átomo de nitrógeno que llevan, un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros que puede contener adicionalmente un heteroátomo adicional del grupo O, S y N.

La sustitución de un puente fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido por un puente desfosfo (se describen puentes desfosfo, por ejemplo, en Uhlmann E. y Peyman A. en "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Capítulo 16, pág. 355 ff), seleccionándose el puente desfosfo por ejemplo de los puentes desfosfo formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, oxima, metilendimetil-hidrazo, dimetilensulfona y/o grupos sililo.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención pueden tener opcionalmente cadenas principales quiméricas. Una cadena principal quimérica es una que comprende más de un tipo de enlace. En una realización, la cadena principal quimérica puede representarse mediante la fórmula: 5' Y<sub>1</sub>N<sub>1</sub>ZN<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> 3'. Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> son moléculas de ácido nucleico que tienen entre 1 y 10 nucleótidos. Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> incluyen cada uno al menos un enlace internucleotídico modificado. Puesto que al menos dos nucleótidos de los oligonucleótidos quiméricos incluyen modificaciones de la cadena principal estos ácidos nucleicos son un ejemplo de un tipo de "ácidos nucleicos inmunoestimuladores estabilizados".

Con respecto a los oligonucleótidos quiméricos, Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> se consideran independientes entre sí. Esto significa que cada uno de Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> puede o no tener secuencias diferentes y enlaces de cadena principal diferentes entre sí en la misma molécula. En algunas realizaciones, Y<sub>1</sub> y/o Y<sub>2</sub> tienen entre 3 y 8 nucleótidos. N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> son moléculas de ácido nucleico que tienen entre 0 y 5 nucleótidos siempre que N<sub>1</sub>ZN<sub>2</sub> tengan al menos 6 nucleótidos en total. Los nucleótidos de N<sub>1</sub>ZN<sub>2</sub> tienen una cadena principal fosfodiéster y no incluyen ácidos nucleicos que tengan una cadena principal modificada. Z es un motivo de ácido nucleico inmunoestimulador seleccionado preferentemente de los oligonucleótidos inmunoestimuladores enumerados en este documento.

Los nucleótidos centrales (N<sub>1</sub>ZN<sub>2</sub>) de la fórmula Y<sub>1</sub>N<sub>1</sub>ZN<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> tienen enlaces internucleotídicos fosfodiéster e Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> tienen al menos uno, pero pueden tener más de uno o incluso pueden tener todos los enlaces internucleotídicos modificados. En realizaciones preferidas, Y<sub>1</sub> y/o Y<sub>2</sub> tienen al menos dos o entre dos y cinco enlaces internucleotídicos modificados o Y<sub>1</sub> tiene cinco enlaces internucleotídicos modificados e Y<sub>2</sub> tiene dos enlaces internucleotídicos modificados. El enlace internucleotídico modificado en algunos casos es un enlace modificado fosforotioato, un enlace fosforoditioato o un enlace modificado p-etoxi.

Los ácidos nucleicos también incluyen ácidos nucleicos que tienen azúcares de cadena principal que están unidos covalentemente a grupos orgánicos de peso molecular bajo distintos de un grupo hidroxilo en la posición 2' y distintos de un grupo fosfato en la posición 5'. Por lo tanto, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alquilado. Además, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir azúcares tales como arabinosa o 2'-fluoroarabinosa en lugar de ribosa. Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden ser heterogéneos en la composición de estructura principal conteniendo de este modo cualquier combinación posible de unidades poliméricas unidas entre sí, tales como ácidos peptidonucleicos (que tienen una cadena principal de aminoácidos con bases de ácido nucleico). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son homogéneos en la composición de la cadena principal.

Una unidad de fosfato de azúcar (es decir, una  $\beta$ -D-ribosa y un puente internucleosídico fosfodiéster que forman conjuntamente una unidad de fosfato de azúcar) de la cadena principal de fosfato de azúcar (es decir, una cadena principal de fosfato de azúcar está compuesta por unidades de fosfato de azúcar) puede sustituirse por otra unidad, donde por ejemplo la otra unidad es adecuada para generar un oligómero "derivado de morfolino" (como se describe, por ejemplo, en Stirchak E. P. y *col.* (1989) *Nucleic Acid Res.* 17: 6129-41), es decir, por ejemplo, la sustitución por un derivado de morfolino; o para generar un ácido nucleico de poliamida ("PNA"; como se describe, por ejemplo, en Nielsen P. E. y *col.* (1994) *Bioconjug. Chem.* 5: 3-7), es decir por ejemplo, la sustitución de una unidad de cadena principal de PNA, por ejemplo, por 2-aminoetilglicina. El oligonucleótido puede tener otras modificaciones y sustituciones de cadena principal de carbohidrato, tales como ácidos peptidonucleicos con grupos fosfatos (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y oligonucleótidos que tienen secciones de cadena principal con engarces alquilo o engarces amino. El engarce alquilo puede estar ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido y ser quiralmente puro o una mezcla racémica.

Una unidad de  $\beta$ -ribosa o una unidad de  $\beta$ -D-2'-desoxirribosa puede sustituirse por una unidad de azúcar modificado, seleccionándose la unidad de azúcar modificado por ejemplo de  $\beta$ -D-ribosa,  $\alpha$ -D-2'-desoxirribosa, L-2'-desoxirribosa, 2'-F-2'-desoxirribosa, 2'-F-arabinosa, 2'-O-(C1-C6)alquil-ribosa, preferentemente 2'-O-(C1-C6)alquil-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-(C1-C6)alquenil-ribosa, 2'-[O-(C1-C6)alquil-O-(C1-C6)alquil]-ribosa, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxirribosa,  $\beta$ -D-xilo-furanosa,  $\alpha$ -arabinofuranosa, 2,4-didesoxi- $\beta$ -D-eritro-hexo-piranososa, un carbocíclico (descrito, por ejemplo, en Froehler J. (1992) Am. Chem. Soc. 114: 8320) y/o análogos de azúcar de cadena abierta (descritos, por ejemplo, en Vandendriessche y col. (1993) Tetrahedron 49: 7223) y/o análogos de bicicloazúcar (descritos, por ejemplo, en Tarkoy M. y col. (1993) Helv. Chim. Acta. 76: 481).

En algunas realizaciones, el azúcar es 2'-O-metilribosa, particularmente para uno o ambos nucleótidos unidos por un enlace internucleosídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster.

Los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse *de novo* usando cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de b-cianoetil fosforamidita (Beaucage, S. L. y Caruthers, M. H., (1981) Tet. Let. 22: 1859); procedimiento de nucleósido H-fosfonato (Garegg y col., (1986) Tet. Let. 27: 4051-4054; Froehler y col., (1986) Nucl. Acid Res. 14: 5399-5407; Garegg y col., (1986) 27: 4055-4058; Gaffney y col., (1988) Tet. Let. 29: 2619-2622). Estas químicas pueden realizarse mediante una diversidad de sintetizadores de ácido nucleico automatizados disponibles en el mercado. Estos oligonucleótidos se denominan oligonucleótidos sintéticos. Como alternativa, pueden producirse dinucleótidos ricos en T y/o TG a gran escala en plásmidos (véase Sambrook T. y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor laboratory Press, Nueva York, 1989) y separarse en trozos más pequeños o administrarse completos. Pueden prepararse ácidos nucleicos a partir de secuencias de ácidos nucleicos existentes (por ejemplo, genómico o ADNc) usando técnicas conocidas, tales como las que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas. Pueden sintetizarse cadenas principales modificadas tales como fosforotioatos usando técnicas automatizadas que emplean química de fosforamidato o H-fosfonato. Pueden generarse aril- y alquil-fosfonatos, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º: 4.469.863 y pueden generarse alquifosfotriésteres (en los que el resto oxígeno cargado está alquilado, como se describen en la Patente de Estados Unidos N.º: 5.023.243) mediante síntesis en fase sólida automatizada usando reactivos disponibles en el mercado. Se han descrito procedimientos para generar otras modificaciones y sustituciones de cadena principal de ADN (por ejemplo, Uhlmann, E. y Peyman, A., Chem. Rev. 90: 544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1: 165, 1990).

Los ácidos nucleicos preparados de esta forma se denominan ácido nucleico aislado. Un "ácido nucleico aislado" se refiere generalmente a un ácido nucleico que está separado de componentes, con lo que está separado de una célula, de un núcleo, de mitocondrias o de cromatina y de cualesquiera otros componentes que puedan considerarse como contaminantes.

En una realización, la composición inmunogénica de la presente invención comprende al menos un adyuvante que es un oligonucleótido CpG. Se han descrito oligonucleótidos CpG en varias patentes expedidas, solicitudes de patente publicadas y otras publicaciones incluyendo las Patentes de Estados Unidos N.ºs: 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; y 6.339.068.

Se han identificado diferentes clases de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. Se denominan clase A, B, C y P y se describen con más detalle a continuación. Los procedimientos y composiciones de la invención incluyen el uso de estas clases diferentes de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG.

Cualquiera de las clases puede someterse a una modificación E que aumente su potencia. Una modificación E puede ser una sustitución con halógeno para el nucleótido 5' terminal; los ejemplos de dichas sustituciones incluyen, pero sin limitación, sustituciones con bromo-uridina o yodo-uridina. Una modificación E también puede incluir una sustitución con etil-uridina para el nucleótido 5' terminal.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG de "clase A" se caracterizan funcionalmente por la capacidad para inducir altos niveles de interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ) a partir de células dendríticas plasmocitoides (pDC) e inducir la activación de células NK al tiempo que tienen efectos mínimos sobre la activación de células B. Estructuralmente, esta clase tiene típicamente secuencias poli-G estabilizadas en los extremos 5' y 3'. También tiene una secuencia que contiene dinucleótido CpG fosfodiéster palindrómica de al menos 6 nucleótidos, por ejemplo pero no necesariamente, ella contiene uno de los siguientes palíndromos hexaméricos: GACGTC, AGCGCT o AACGTT, descritos por Yamamoto y colaboradores. Yamamoto S y col. J. Immunol 148: 4072-6 (1992). Se ha descrito una clase de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG y secuencias ejemplares de esta clase en la Solicitud de Patente no provisional de Estados Unidos de N.º de Serie 09/672.126 y la solicitud PCT publicada PCT/US00/26527 (documento WO 01/22990), ambas presentadas el 27 de septiembre de 2000.

En una realización, el oligonucleótido CpG de "clase A" de la invención tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico: 5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3' (SEC ID N.º: 440).

Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de clase A incluyen:

5' G\*G\*G\_G\_A\_C\_G\_A\_C\_G\_T\_C\_G\_T\_G\_G\*G\*G\*G\*G\*G 3'; donde el \* se refiere a un enlace fosforotioato y \_ se refiere a un enlace fosfodiéster.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG de "clase B" se caracterizan funcionalmente por la capacidad para activar células B y pDC excepto porque son relativamente débiles para inducir activación de células IFN- $\alpha$  y NK. Estructuralmente, esta clase típicamente puede estabilizarse totalmente con enlaces fosforotioato, pero también puede tener uno o más enlaces fosfodiéster, preferentemente entre la citosina y la guanina del motivo o motivos CpG, en cuyo caso la molécula se denomina semiblanda. En una realización, el oligonucleótido CpG de la presente invención es un oligonucleótido CpG de clase B representado por al menos la fórmula:

5' X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> 3', en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> son nucleótidos. En una realización, X<sub>2</sub> es adenina, guanina o timina. En otra realización, X<sub>3</sub> es citosina, adenina o timina.

En otra realización, el oligonucleótido CpG de la presente invención es un oligonucleótido CpG de clase B representado por al menos la fórmula:

5 5' N<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>N<sub>2</sub> 3',

en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> son nucleótidos y N es cualquier nucleótido y N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> son secuencias de ácido nucleico compuestas por aproximadamente 0-25 N cada una. En una realización, X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> es un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT y TpG; y X<sub>3</sub>X<sub>4</sub> es un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por TpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA y CpA. Preferentemente X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> es GpA o GpT y X<sub>3</sub>X<sub>4</sub> es TpT. En otras realizaciones, X<sub>1</sub> o X<sub>2</sub> o ambos son purinas y X<sub>3</sub> o X<sub>4</sub> o ambos son pirimidinas o X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> es GpA y X<sub>3</sub> o X<sub>4</sub> o ambos son pirimidinas. En una realización preferida, X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> es un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por TpA, ApA, ApC, ApG y GpG. En otra realización más, X<sub>3</sub>X<sub>4</sub> es un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por TpT, TpA, TpG, ApA, ApG, GpA y CpA. X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>, en otra realización, es un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por TpT, TpG, ApT, GpC, CpC, CpT, TpC, GpT y CpG; X<sub>3</sub> es un nucleótido seleccionado del grupo constituido por A y T y X<sub>4</sub> es un nucleótido, pero cuando X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> es TpC, GpT o CpG, X<sub>3</sub>X<sub>4</sub> no es TpC, ApT o ApC.

En otra realización preferida, el oligonucleótido CpG tiene la secuencia 5' TCN<sub>1</sub>TX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> 3'. Los oligonucleótidos CpG de la invención, en algunas realizaciones, incluyen X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> seleccionados del grupo constituido por GpT, GpG, GpA y ApA y X<sub>3</sub>X<sub>4</sub> seleccionados del grupo constituido por TpT, CpT y TpC.

20 Las secuencias oligonucleotídicas CpG de clase B de la invención son las ampliamente descritas anteriormente, así como las descritas en las Solicitudes de Patente PCT publicadas PCT/US95/01570 y PCT/US97/19791 y en las Patentes de Estados Unidos 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116 y 6.339.068. Las secuencias ejemplares incluyen, pero sin limitación, las descritas en estas últimas solicitudes y patentes.

En una realización, el oligonucleótido CpG de "clase B" de la invención tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico:

5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEC ID N.º: 431), o

5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEC ID N.º: 432), o

5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEC ID N.º: 433), o

5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (SEC ID N.º: 441), o

30 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (SEC ID N.º: 442).

En cualquiera de estas secuencias, todos los enlaces pueden ser enlaces fosforotioato. En otra realización, en cualquiera de estas secuencias, uno o más de los enlaces pueden ser fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo CpG generando un oligonucleótido CpG semiblando. En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno pueden sustituir a la T 5'; los ejemplos de sustituciones con halógeno incluyen, pero sin limitación, sustituciones con bromo-uridina o yodo-uridina.

Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de clase B incluyen:

5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T 3', o

5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T 3', o

5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T 3', o

40 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T 3', o

5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*A 3'.

en los que el \* se refiere a un enlace fosforotioato.

La "clase C" de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG se caracteriza funcionalmente por la capacidad para activar células B y células NK e inducir IFN- $\alpha$ . Estructuralmente, esta clase incluye típicamente una región con uno o más motivos CpG inmunoestimuladores de tipo de clase B y una región palindrómica o casi palindrómica rica en GC que permite que las moléculas formen estructuras de tipo secundario (por ejemplo, tallo-bucle) o terciario (por ejemplo, dímeros). Algunos de estos oligonucleótidos tienen tanto una secuencia CpG "estimuladora" tradicional como un motivo "rico en GC" o "neutralizante de células B". Estos oligonucleótidos de motivo de combinación tienen efectos inmunoestimulantes que se encuentran en algún lugar entre los efectos asociados con los oligonucleótidos CpG de clase B tradicionales (es decir, inducción fuerte de la activación de células B y activación de células dendríticas (DC)) y los efectos asociados con CpG ODN de clase A (es decir, inducción fuerte de IFN- $\alpha$  y activación de células NK pero inducción relativamente escasa de la activación de células B y DC). Krieg AM y col. (1995) Nature 374: 546-9; Ballas ZK y col. (1996) J Immunol 157: 1840-5; Yamamoto S y col. (1992) J Immunol 148: 4072-6.

55 La clase C de oligonucleótidos inmunoestimuladores de motivo de combinación puede tener cadenas principales totalmente estabilizadas (por ejemplo, todas fosforotioato), quiméricas (región central fosfodiéster) o semiblandas

(por ejemplo, fosfodiéster dentro de un motivo CpG). Esta clase se ha descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos US 10/224.523 presentada el 19 de agosto de 2002.

Un dominio o motivo estimulador del oligonucleótido CpG de clase C se define mediante la fórmula: 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub> 3'. D es un nucleótido distinto de C. C es citosina. G es guanina. H es un nucleótido distinto de G. X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son cualquier secuencia de ácido nucleico de 0 a 10 nucleótidos de longitud. X<sub>1</sub> puede incluir una CG, en cuyo caso existe preferentemente una T inmediatamente antes de esta CG. En algunas realizaciones, DCG es TCG. X<sub>1</sub> tiene preferentemente de 0 a 6 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, X<sub>2</sub> no contiene ningún motivo poli G o poli A. En otras realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulador tiene una secuencia poli T en el extremo 5' o en el extremo 3'. Como se usa en este documento, "poli A" o "poli-T" se referirán a una extensión de cuatro o más A o T consecutivas, respectivamente, por ejemplo, 5' AAAA 3' o 5' TTTT 3'. Como se usa en este documento, el "extremo poli G" se referirá a una extensión de cuatro o más G consecutivas, por ejemplo, 5' GGGG 3', que aparece en el extremo 5' o el extremo 3' de un ácido nucleico. Como se usa en este documento, un "oligonucleótido poli G" se referirá a un oligonucleótido que tiene la fórmula 5' X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GGGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> 3' en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> son nucleótidos y preferentemente al menos uno de X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> es una G. Algunos diseños preferidos para el dominio estimulador de células B con esta fórmula comprenden TTTTTCG, TCG, TTCG, TTTTCG, TTTTTCG, TCGT, TTCGT, TTTTCGT, TCGTCGT.

El segundo motivo del oligonucleótido CpG de clase C se denomina P o N y se sitúa inmediatamente 5' a X<sub>1</sub> e inmediatamente 3' a X<sub>2</sub>.

N es una secuencia neutralizante de células B que comienza con un trinucleótido CGG y tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos. Un motivo neutralizante de células B incluye al menos una secuencia CpG en la que la CG está precedida por una C o seguida de una G (Krieg AM y col. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95: 12631-12636) o es una secuencia de ADN que contiene CG en la que la C de la CG está metilada. Los motivos o secuencias neutralizantes tienen cierto grado de capacidad inmunoestimuladora cuando están presentes en un motivo de otro modo no estimulador, pero cuando están presentes en el contexto de otros motivos inmunoestimuladores sirven para reducir el potencial inmunoestimulador de los otros motivos.

P es una secuencia que contiene un palíndromo rico en GC de al menos 10 nucleótidos de longitud.

Como se usa en este documento, "palíndromo" y de forma equivalente "secuencia palindrómica" se referirán a una repetición invertida, es decir, una secuencia tal como ABCDEE'D'C'B'A' en la que A y A', B y B', etc. son bases capaces de formar los pares de bases de Watson-Crick habituales.

Como se usa en este documento, la expresión "palíndromo rico en GC" se referirá a un palíndromo que tiene una composición de bases de al menos dos tercios de G y C. En algunas realizaciones, el dominio rico en GC está preferentemente 3' respecto al "dominio estimulador de células B". En el caso de un palíndromo rico en GC de 10 bases de longitud, el palíndromo contiene por lo tanto al menos 8 G y C. En el caso de un palíndromo rico en GC de 12 bases de longitud, el palíndromo también contiene al menos 8 G y C. En el caso de un palíndromo rico en GC de 14 nucleótidos, al menos 10 bases del palíndromo son G y C. En algunas realizaciones, el palíndromo rico en GC está compuesto exclusivamente por G y C.

En algunas realizaciones el palíndromo rico en GC tiene una composición de bases de al menos el 81 % de G y C. En el caso de dicho palíndromo rico en GC de 10 bases de longitud, el palíndromo está compuesto por lo tanto exclusivamente por G y C. En el caso de dicho palíndromo rico en GC de 12 bases de longitud, se prefiere que al menos diez bases (83 %) del palíndromo sean G y C. En algunas realizaciones preferidas, un palíndromo rico en GC de 12 bases de longitud está compuesto exclusivamente por G y C. En el caso de un palíndromo rico en GC de 14 nucleótidos, al menos doce bases (86 %) del palíndromo son G y C. En algunas realizaciones preferidas, un palíndromo rico en GC de 14 bases de longitud está compuesto exclusivamente por G y C. Las C de un palíndromo rico en GC pueden no estar metiladas o pueden estar metiladas.

En general este dominio tiene al menos 3 C y G, más preferentemente 4 de cada y más preferentemente, 5 o más de cada. El número de C y G en este dominio no tiene que ser idéntico. Se prefiere que las C y G se dispongan de modo que sean capaces de formar un dúplex autocomplementario, o palíndromo, tal como CCGCGCGG. Este puede interrumpirse por A o T pero se prefiere que la autocomplementariedad esté al menos parcialmente conservada, como por ejemplo en los motivos CGACGTTTCGTCG o CGGCGCGGTCGCG. Cuando la complementariedad no está conservada, se prefiere que los pares de bases no complementarias sean TG. En una realización preferida no hay más de 3 bases consecutivas que no son parte del palíndromo, preferentemente no más de 2 y más preferentemente solo 1. En algunas realizaciones, el palíndromo rico en GC incluye al menos un trímero CGG, al menos un trímero CCG, o al menos un tetrámero CGCG. En otras realizaciones, el palíndromo rico en GC no es CCCCCGGGGG o GGGGGCCCCC, CCCCCGGGGG o GGGGGCCCCC.

Al menos una de las G de la región rica en GC puede sustituirse con una inosina (I). En algunas realizaciones, P incluye más de una I.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulador tiene una de las siguientes fórmulas 5' NX<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub> 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub>N 3', 5' PX<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub> 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub>P 3', 5' X<sub>1</sub>CGHX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub> 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHXPX<sub>3</sub> 3', 5' DCGHX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub> 3', 5' TCGHX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub> 3', 5' DCGHPX<sub>3</sub> 3' o 5'DCGHP 3'.

La invención proporciona otros oligonucleótidos inmunoestimuladores definidos mediante una fórmula 5' N<sub>1</sub>PyGN<sub>2</sub>P 3'. N<sub>1</sub> es cualquier secuencia de 1 a 6 nucleótidos de longitud. Py es una pirimidina. G es guanina. N<sub>2</sub> es cualquier secuencia de 0 a 30 nucleótidos de longitud. P es un palíndromo rico en GC que contiene una secuencia de al menos 10 nucleótidos de longitud.

N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> pueden contener más del 50 % de pirimidinas y más preferentemente, más del 50 % de T. N<sub>1</sub> puede incluir una CG, en cuyo caso existe preferentemente una T inmediatamente antes de esta CG. En algunas realizaciones,

N1PyG es TCG y más preferentemente, una TCGN<sub>2</sub>, donde N<sub>2</sub> no es G.

N<sub>1</sub>PyGN<sub>2</sub>P puede incluir uno o más nucleótidos de inosina (I). Bien la C o bien la G en N<sub>1</sub> pueden sustituirse por inosina, pero se prefiere la Cpl a la lpG. Para sustituciones con inosina tales como lpG, la actividad óptima puede conseguirse con el uso de una cadena principal "semiblanda" o quimérica en la que el enlace entre la IG o la CI es fosfodiéster. N1 puede incluir al menos un motivo CI, TCI, IG o TIG.

En ciertas realizaciones, N<sub>1</sub>PyGN<sub>2</sub> es una secuencia seleccionada del grupo constituido por TTTTTCG, TCG, TTCG, TTTTCG, TTTTCG, TCGT, TTCGT, TTTTCGT y TCGTCGT.

En una realización, los oligonucleótidos CpG de "clase C" de la invención tienen la siguiente secuencia de ácido nucleico:

- 10 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 443), o
- 5' TCGTCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 444), o
- 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 445), o
- 5' TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 446), o
- 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 447), o
- 15 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 448), o
- 5' TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 449), o
- 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 450), o
- 5' TCGCGACGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 451), o
- 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 452), o
- 20 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 453), o
- 5' TCGTCGTTTTACGGCGCGCGCCG 3' (SEC ID N°: 454), o
- 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCGT 3' (SEC ID N°: 455).

En cualquiera de estas secuencias, todos los enlaces pueden ser enlaces fosforotioato. En otra realización, en cualquiera de estas secuencias, uno o más de los enlaces pueden ser fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo CpG, generando un oligonucleótido CpG semiblando.

Algunos ejemplos no limitantes de oligonucleótidos de clase C incluyen:

- 5' T\*C\_G\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*TC\*\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\_G\*G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 30 5' T\*C\_G\*G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\_G\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\_G\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 35 5' T\*C\_G\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*A\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*T\*G\*C\*C\*G 3', o
- 5' T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G\*T 3'

40 en los que el \* se refiere a un enlace fosforotioato y el \_ se refiere a un enlace fosfodiéster.

En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno pueden sustituir a la T 5'; los ejemplos de sustituciones con halógeno incluyen pero sin limitación sustituciones con bromo-uridina o yodo-uridina.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG de "clase P" se han descrito en el documento WO2007/095316 y se caracterizan por el hecho de que contienen regiones formadoras de dúplex tales como, por ejemplo, palíndromos

perfectos o imperfectos en o próximos a ambos extremos 5' y 3', proporcionándoles el potencial de formar estructuras de orden superior tales como concatámeros. Estos oligonucleótidos denominados oligonucleótidos de clase P tienen la capacidad en algunos casos de inducir niveles mucho mayores de secreción de IFN- $\alpha$  que la clase C. Los oligonucleótidos de clase P tienen la capacidad de autoensamblarse espontáneamente en concatámeros *in vitro* y/o *in vivo*. Sin ligarse a teoría particular alguna para el procedimiento de acción de estas moléculas, una hipótesis potencial es que esta propiedad dota a los oligonucleótidos de clase P de la capacidad de reticularse más con TLR9 en el interior de ciertas células inmunes, induciendo un patrón diferente de activación inmune en comparación con las clases descritas anteriormente de oligonucleótidos CpG.

En una realización, el oligonucleótido CpG es un oligonucleótido CpG de clase P que contiene un dominio de activación TLR 5' y al menos dos regiones palindrómicas, siendo una región palindrómica una región palindrómica 5' de al menos 6 nucleótidos de longitud y estando conectada con una región palindrómica 3' de al menos 8 nucleótidos de longitud directamente o a través de un espaciador, incluyendo el oligonucleótido al menos un dinucleótido YpR. En una realización, dicho oligonucleótido no es T\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G\*. En una realización, el oligonucleótido CpG de clase P incluye al menos un dinucleótido CpG no metilado. En otra realización, el dominio de activación TLR es TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG, TTT o TTTT. En otra realización más el dominio de activación TLR está en el interior de la región palindrómica 5'. En otra realización el dominio de activación TLR está inmediatamente 5' a la región palindrómica 5'. En otra realización más la región palindrómica 5' tiene al menos 8 nucleótidos de longitud. En otra realización la región palindrómica 3' tiene al menos 10 nucleótidos de longitud. En otra realización la región palindrómica 5' tiene al menos 10 nucleótidos de longitud. En otra realización más la región palindrómica 3' incluye un dinucleótido CpG no metilado. En otra realización la región palindrómica 3' incluye dos dinucleótidos CpG no metilados. En otra realización la región palindrómica 5' incluye un dinucleótido CpG no metilado. En otra realización más la región palindrómica 5' incluye dos dinucleótidos CpG no metilados. En otra realización las regiones palindrómicas 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 25. En otra realización las regiones palindrómicas 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 30. En otra realización las regiones palindrómicas 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 35. En otra realización las regiones palindrómicas 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 40. En otra realización las regiones palindrómicas 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 45. En otra realización las regiones palindrómicas 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 50. En otra realización las regiones palindrómicas 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 55. En otra realización las regiones palindrómicas 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 60. En otra realización las regiones palindrómicas 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 65.

En una realización las dos regiones palindrómicas están conectadas directamente. En otra realización las dos regiones palindrómicas están conectadas por medio de un enlace 3'-3'. En otra realización las dos regiones palindrómicas solapan en un nucleótido. En otra realización más las dos regiones palindrómicas solapan en dos nucleótidos. En otra realización las dos regiones palindrómicas no solapan. En otra realización las dos regiones palindrómicas están conectadas por un espaciador. En una realización el espaciador es un ácido nucleico que tiene una longitud de 1-50 nucleótidos. En otra realización el espaciador es un ácido nucleico que tiene una longitud de 1 nucleótido. En otra realización el espaciador es un espaciador no nucleotídico. En otra realización el espaciador no nucleotídico es un espaciador D. En otra realización el espaciador no nucleotídico es un engarce. En una realización el oligonucleótido tiene la fórmula 5' XP<sub>1</sub>SP<sub>2</sub>T 3', en la que X es el dominio de activación TLR, P<sub>1</sub> es un palíndromo, S es un espaciador, P<sub>2</sub> es un palíndromo y T es una cola 3' de 0-100 nucleótidos de longitud. En una realización X es TCG, TTCG o TTTCG. En otra realización T tiene una longitud de 5-50 nucleótidos. En otra realización más T tiene una longitud de 5-10 nucleótidos. En una realización S es un ácido nucleico que tiene una longitud de 1-50 nucleótidos. En otra realización S es un espaciador no nucleotídico. En una realización el espaciador no nucleotídico es un espaciador D. En otra realización el espaciador no nucleotídico es un engarce. En otra realización, el oligonucleótido no es un oligonucleótido antisentido o ribozima. En una realización P<sub>1</sub> es rico en A y T. En otra realización P<sub>1</sub> incluye al menos 4 T. En otra realización P<sub>2</sub> es un palíndromo perfecto. En otra realización P<sub>2</sub> es rico en G-C. En otra realización más P<sub>2</sub> es CGGCGCX<sub>1</sub>GCGCCG, en la que X<sub>1</sub> es T o nada.

En una realización el oligonucleótido incluye al menos un enlace fosforotioato. En otra realización todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces fosforotioato. En otra realización el oligonucleótido incluye al menos un enlace similar a fosfodiéster. En otra realización el enlace similar a fosfodiéster es un enlace fosfodiéster. En otra realización un grupo lipófilo se conjuga con el oligonucleótido. En una realización el grupo lipófilo es colesterol.

En una realización, el oligonucleótido CpG para uso en la presente invención es un oligonucleótido CpG de clase P con un dominio de activación TLR 5' y al menos dos regiones que contienen complementariedad, una región que contiene complementariedad 5' y 3', teniendo cada región que contiene complementariedad al menos 8 nucleótidos de longitud y conectándose entre sí bien directamente o bien a través de un espaciador, incluyendo el oligonucleótido al menos un dinucleótido de pirimidina-purina (YpR) y en el que al menos una de las regiones que contienen complementariedad no es un palíndromo perfecto. En una realización el oligonucleótido incluye al menos un dinucleótido CpG no metilado. En otra realización el dominio de activación TLR es TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG, TTT o TTTT. En otra realización el dominio de activación TLR está dentro de la región que contiene complementariedad 5'. En otra realización el dominio de activación TLR está inmediatamente 5' a la región que contiene complementariedad 5'. En otra realización la región que contiene complementariedad 3' tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos. En otra realización más la región que contiene complementariedad 5' tiene al menos 10 nucleótidos de longitud. En una realización la región que contiene complementariedad 3' incluye un dinucleótido CpG no metilado. En otra realización la región que contiene complementariedad 3' incluye dos dinucleótidos CpG no metilados. En otra realización más la región que contiene complementariedad 5' incluye un dinucleótido CpG no metilado. En otra realización la región que contiene complementariedad 5' incluye dos dinucleótidos CpG no metilados. En otra realización las regiones que contienen complementariedad incluyen al menos un análogo de nucleótido. En otra realización las regiones que contienen

- complementariedad forman un dúplex intramolecular. En una realización el dúplex intramolecular incluye al menos un par de bases que no son de Watson-Crick. En otra realización el par de bases que no es de Watson-Crick es G-T, G-A, G-G o C-A. En una realización las regiones que contienen complementariedad forman dúplex intermoleculares. En otra realización al menos uno de los dúplex intermoleculares incluye al menos un par de bases que no es de Watson-Crick. En otra realización el par de bases que no es de Watson-Crick es G-T, G-A, G-G o C-A. En otra realización más las regiones que contienen complementariedad contienen un emparejamiento erróneo. En otra realización más las regiones que contienen complementariedad contienen dos emparejamientos erróneos. En otra realización, las regiones que contienen complementariedad contienen un nucleótido intermedio. En otra realización, las regiones que contienen complementariedad contienen dos nucleótidos intermedios.
- En una realización las regiones que contienen complementariedad 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 25. En otra realización las regiones que contienen complementariedad 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 30. En otra realización las regiones que contienen complementariedad 5' y 3' tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 35. En otra realización las regiones que contienen complementariedad tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 40. En otra realización las regiones que contienen complementariedad tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 45. En otra realización las regiones que contienen complementariedad tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 50. En otra realización las regiones que contienen complementariedad tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 55. En otra realización las regiones que contienen complementariedad tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 60. En otra realización las regiones que contienen complementariedad tienen un valor de estabilidad de dúplex de al menos 65.
- En otra realización las dos regiones que contienen complementariedad están conectadas directamente. En otra realización las dos regiones palindrómicas están conectadas mediante un enlace 3'-3'. En otra realización más las dos regiones que contienen complementariedad solapan en un nucleótido. En otra realización las dos regiones que contienen complementariedad solapan en dos nucleótidos. En otra realización las dos regiones que contienen complementariedad no solapan. En otra realización las dos regiones que contienen complementariedad están conectadas por un espaciador. En otra realización el espaciador es un ácido nucleico que tiene una longitud de 1-50 nucleótidos. En otra realización el espaciador es un ácido nucleico que tiene una longitud de 1 nucleótido. En una realización el espaciador es un espaciador no nucleotídico. En otra realización el espaciador no nucleotídico es un espaciador D. En otra realización más el espaciador no nucleotídico es un engarce.
- En una realización el oligonucleótido de clase P tiene la fórmula 5' XNSPT 3', en la que X es el dominio de activación TLR, N es un palíndromo imperfecto, P es un palíndromo, S es un espaciador y T es una cola 3' de 0-100 nucleótidos de longitud. En otra realización X es TCG, TTCG o TTTCG. En otra realización T es de 5-50 nucleótidos de longitud. En otra realización T es de 5-10 nucleótidos de longitud. En otra realización S es un ácido nucleico que tiene una longitud de 1-50 nucleótidos. En otra realización S es un ácido nucleico que tiene una longitud de 1 nucleótido. En otra realización S es un espaciador no nucleotídico. En otra realización el espaciador no nucleotídico es un espaciador D. En otra realización el espaciador no nucleotídico es un engarce. En otra realización el oligonucleótido no es un oligonucleótido antisentido ni una ribozima. En otra realización N es rico en A y T. En otra realización N incluye al menos 4 T. En otra realización P es un palíndromo perfecto. En otra realización P es rico en G-C. En otra realización P es CGGCGCX<sub>1</sub>GCGCCG, donde X<sub>1</sub> es T o nada. En otra realización el oligonucleótido incluye al menos un enlace fosforotioato. En otra realización todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces fosforotioato. En otra realización el oligonucleótido incluye al menos un enlace tipo fosfodiéster. En otra realización el enlace tipo fosfodiéster es un enlace fosfodiéster. En otra realización un grupo lipófilo se conjuga con el oligonucleótido. En una realización el grupo lipófilo es colesterol.
- En una realización los oligonucleótidos CpG de "clase P" de la invención tienen la siguiente secuencia de ácido nucleico: 5' TCGTCGACGATCGGCGCGGCCG 3' (SEC ID N.º: 456).
- En dichas secuencias, todos los enlaces pueden ser enlaces fosforotioato. En otra realización, uno o más de los enlaces pueden ser fosfodiéster, preferentemente entre la "C" y la "G" del motivo CpG generando un oligonucleótido CpG semiblando. En cualquiera de estas secuencias, una etil-uridina o un halógeno pueden sustituir a la T 5'; los ejemplos de sustituciones con halógeno incluyen pero sin limitación sustituciones con bromo-uridina o yodo-uridina.
- Un ejemplo no limitante de oligonucleótidos de Clase P incluye: 5' \*C\_G\*T\*C\_G\*A\*C\_G\*A\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*G 3'
- en el que el \* se refiere a un enlace fosforotioato y el \_ se refiere a un enlace fosfodiéster.
- En una realización, todos los enlaces internucleotídicos de los oligonucleótidos CpG descritos en este documento son enlaces fosfodiéster (oligonucleótidos "blandos", como se describen en la solicitud PCT WO2007/026190). En otra realización, los oligonucleótidos CpG de la invención se vuelven resistentes a la degradación (por ejemplo, se estabilizan). Un "oligonucleótido estabilizado" se refiere a un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, mediante una exo- o endonucleasa). La estabilización de ácidos nucleicos puede lograrse mediante modificaciones de la cadena principal. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato proporcionan una actividad máxima y protegen al oligonucleótido de la degradación por exo- y endonucleasas intracelulares.
- Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden tener una cadena principal quimérica, que tiene combinaciones de enlaces fosfodiéster y fosforotioato. Para los fines de la presente invención, una cadena principal quimérica se refiere a una cadena principal parcialmente estabilizada, en la que al menos un enlace internucleotídico es fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y en la que al menos otro enlace internucleotídico es un enlace internucleotídico estabilizado, en la que el al menos un enlace fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y el al menos un enlace estabilizado son diferentes. Cuando el enlace fosfodiéster se localiza preferentemente en el interior del motivo CpG, dichas moléculas se denominan "semiblandas", como se describe en la solicitud PCT WO2007/026190.

Otros oligonucleótidos modificados incluyen combinaciones de enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato y/o p-etoxi.

Puesto que se ha descrito que los enlaces boranofosfonato están estabilizados respecto a los enlaces fosfodiéster, para los fines de la naturaleza química de la cadena principal, los enlaces boranofosfonato pueden clasificarse como de tipo fosfodiéster o como estabilizados, dependiendo del contexto. Por ejemplo, una cadena principal química de acuerdo con la presente invención podría incluir, en algunas realizaciones, al menos un enlace fosfodiéster (fosfodiéster o de tipo fosfodiéster) y al menos un enlace boranofosfonato (estabilizado). En otras realizaciones, una cadena principal química de acuerdo con la presente invención podría incluir enlaces boranofosfonato (fosfodiéster o de tipo fosfodiéster) y fosforotioato (estabilizado). Un "enlace internucleotídico estabilizado" se referirá a un enlace internucleotídico que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por medio de una exo- o endonucleasa), en comparación con un enlace internucleotídico fosfodiéster. Los enlaces internucleotídicos estabilizados preferidos incluyen, sin limitación, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato y metilfosforotioato. Otros enlaces internucleotídicos estabilizados incluyen, sin limitación, peptídico, alquilo, desfosfo y otros, como se han descrito anteriormente.

Pueden sintetizarse cadenas principales modificadas tales como fosforotioatos usando técnicas automatizadas que emplean químicas de fosforamidoato o H-fosfonato. Pueden generarse aril- y alquil-fosfonatos, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º: 4.469.863; y pueden prepararse alquilfosfotriésteres (en los que el resto oxígeno cargado está alquilado, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º: 5.023.243 y en la Patente Europea N.º: 092.574) mediante síntesis en fase sólida automática usando reactivos disponibles en el mercado. Se han descrito procedimientos para generar otras modificaciones y sustituciones de la cadena principal de ADN. Uhlmann E y col. (1990) Chem Rev 90: 544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165. También se conocen procedimientos para preparar oligonucleótidos químicos. Por ejemplo, las patentes expedidas a Uhlmann y col. han descrito dichas técnicas.

Pueden sintetizarse ODN modificados de cadena principal mixta como se describe en la solicitud PCT WO2007/026190.

Los oligonucleótidos de la invención también pueden incluir otras modificaciones. Estas incluyen análogos de ADN no iónicos tales como alquil- y aril-fosfatos (en los que el oxígeno de fosfonato cargado se sustituye por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquilfosfotriésteres, en los que el resto oxígeno cargado está alquilado. Los ácidos nucleicos que contienen diol, tales como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en cualquier o ambos extremos terminales también se ha demostrado que son sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

El tamaño del oligonucleótido CpG (es decir, el número de restos nucleotídicos a lo largo de la longitud del oligonucleótido) también pueden contribuir a la actividad estimuladora del oligonucleótido. Para facilitar la captación en células, el oligonucleótido CpG de la invención tiene preferentemente una longitud mínima de 6 restos nucleotídicos. Los oligonucleótidos de cualquier tamaño superior a 6 nucleótidos (incluso de muchas kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmune si están presentes suficientes motivos inmunoestimuladores, debido a que los oligonucleótidos de mayor tamaño se degradan en el interior de las células. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos CpG tienen una longitud de 6 a 100 nucleótidos, preferentemente una longitud de 8 a 30 nucleótidos. En realizaciones importantes, los ácidos nucleicos y oligonucleótidos de la invención no son plásmidos o vectores de expresión.

En una realización, el oligonucleótido CpG descrito en este documento comprende sustituciones o modificaciones, tales como en las bases y/o azúcares que se describen en los párrafos 134 a 147 del documento WO2007/026190.

En una realización, el oligonucleótido CpG de la presente invención está químicamente modificado. Los especialistas en la técnica conocen ejemplos de modificaciones químicas y se describen, por ejemplo, en Uhlmann E. y col. (1990), Chem. Rev. 90: 543, S. Agrawai, Ed., Humana Press, Totowa, Estados Unidos 1993; Crooke, S. T. y col. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36: 107-129; y Hunziker J. y col., (1995), Mod. Synth. Methods 7: 331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, localizándose cada modificación en un puente internucleosídico fosfodiéster particular y/o en una unidad de β-D-ribosa particular y/o en una posición de base nucleosídica natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está compuesto por ADN o ARN natural.

En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos que contienen CpG pueden mezclarse simplemente con vehículos inmunogénicos de acuerdo con procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO03/024480).

En una realización particular de la presente invención, cualquiera de las vacunas descritas en este documento comprende de 2 µg a 100 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,1 mg a 50 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,2 mg a 10 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,3 mg a 5 mg de oligonucleótido CpG, preferentemente de 0,3 mg a 5 mg de oligonucleótido CpG, aún preferentemente de 0,5 a 2 mg de oligonucleótido CpG, incluso preferentemente de 0,75 a 1,5 mg de oligonucleótido CpG. En una realización preferida, cualquiera de las vacunas descritas en este documento comprende aproximadamente 1 mg de oligonucleótido CpG.

En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos que contienen CpG pueden mezclarse simplemente con vehículos inmunogénicos de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los especialistas en la técnica (véase por ejemplo el documento WO03/024480). En otras realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos que contienen CpG podrían incluirse en el interior de VLP (véase, por ejemplo, el documento WO03/024481).

Los adyuvantes preferidos en el contexto de la presente invención incluyen alumbre; oligonucleótidos que contienen CpG, preferentemente CpG 7909 (SEC ID N.º: 433) y CpG24555 (SEC ID N.º: 431); y adyuvantes basados en

saponina, preferentemente Iscomatrix, que podrían usarse en solitario o en combinación. Preferentemente, dicho ácido nucleico que contiene CpG comprende uno o más enlaces modificados, preferentemente uno o más enlaces fosforotioato, aún más preferentemente todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces fosforotioato.

5 La divulgación proporciona por lo tanto una composición inmunogénica que comprende un péptido de IgE antigénico, que comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 430, más preferentemente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.ºs: 1 a 153 y 220 a 430, aún más preferentemente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N.º: 220 a 430 y al menos un adyuvante. Dicho péptido de IgE antigénico se une preferentemente a un vehículo inmunogénico como se describe en este documento, preferentemente una VLP, más preferentemente una VLP de HBsAg, HBcAg o Qbeta. En una realización, dicho adyuvante es un adyuvante basado en saponina, preferentemente Iscomatrix. En otra realización, dicho adyuvante es alumbre. En otra realización más, dicho adyuvante es un ácido nucleico que contiene CpG. Preferentemente dicho adyuvante es CpG7909. Más preferentemente dicho adyuvante es CpG24555. Preferentemente, dicho ácido nucleico que contiene CpG comprende uno o más enlaces modificados, preferentemente uno o más enlaces fosforotioato, aún más preferentemente todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces fosforotioato.

10 En otra realización más, dicho al menos un adyuvante comprende dos adyuvantes, preferentemente seleccionados del grupo constituido por alumbre, adyuvantes basados en saponina y ácidos nucleicos que contienen CpG. En una realización preferida, dichos adyuvantes son alumbre y un ácido nucleico que contiene CpG, preferentemente CpG7909 o CpG24555, más preferentemente CpG24555. Preferentemente, dicho ácido nucleico que contiene CpG comprende uno o más enlaces modificados, preferentemente uno o más enlaces fosforotioato, aún más preferentemente todos los enlaces internucleotídicos de los oligonucleótidos son enlaces fosforotioato. En otra realización preferida, dichos adyuvantes son un adyuvante basado en saponina, preferentemente Iscomatrix y un ácido nucleico que contiene CpG, preferentemente CpG7909, más preferentemente CpG24555. Preferentemente, dicho ácido nucleico que contiene CpG comprende uno o más enlaces modificados, preferentemente uno o más enlaces fosforotioato, aún más preferentemente todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces fosforotioato. En otra realización preferida, dichos adyuvantes son alumbre y un adyuvante basado en saponina, preferentemente Iscomatrix.

20 En otra realización más, dicho al menos un adyuvante comprende tres adyuvantes, preferentemente seleccionados del grupo constituido por alumbre, un adyuvante basado en saponina, preferentemente Iscomatrix y ácidos nucleicos que contienen CpG, más preferentemente CpG7909 o CpG24555. Preferentemente, dicho ácido nucleico que contiene CpG comprende uno o más enlaces modificados, preferentemente uno o más enlaces fosforotioato, aún más preferentemente todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces fosforotioato.

### Composiciones farmacéuticas de la invención

35 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido de IgE antigénico de la invención o una composición inmunogénica del mismo en una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente combinado con uno o más adyuvantes (como los adyuvantes descritos anteriormente). El término "excipiente" se usa en este documento para describir cualquier ingrediente distinto del ingrediente activo, es decir el péptido de IgE antigénico de la invención en última instancia acoplado a un vehículo inmunogénico y opcionalmente combinado con uno o más adyuvantes. La selección del excipiente o excipientes dependerá en gran medida de factores tales como el modo de administración particular, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad y la naturaleza de la forma farmacéutica. Como se usa en este documento, la expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones que aumentan la vida útil o eficacia del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y procedimientos para su preparación serán fácilmente evidentes para los especialistas en la técnica. Dichas composiciones y procedimientos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company, 1995). Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferentemente en condiciones de GMP.

40 Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o comercializarse a granel como una dosis unitaria individual, o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se usa en este documento, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo generalmente es igual a la dosificación del ingrediente activo que se administraría a un sujeto o a una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosificación.

Puede emplearse convenientemente cualquier procedimiento para administrar péptidos o proteínas aceptado en la técnica para los péptidos o proteínas de la invención.

55 Las composiciones farmacéuticas de la invención son típicamente adecuadas para administración parenteral. Como se usa en este documento, la expresión "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido, dando como resultado generalmente la administración directa en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. La administración parenteral incluye por lo tanto, pero sin limitación, la administración de una composición farmacéutica por inyección de la composición, por

aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, por aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica penetrante en el tejido y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluye, pero sin limitación, inyección o infusiones subcutáneas, intraperitoneales, intramusculares, intraesternales, intravenosas, intraarteriales, intratecales, intraventriculares, intraurales, intracraneales, intrasinoviales; y técnicas de infusión por diálisis renal. Las realizaciones preferidas incluyen las vías intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular, siendo realizaciones aún más preferidas las vías intramuscular o subcutánea.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuadas para administración parenteral comprenden típicamente generalmente el ingrediente activo combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Dichas formulaciones pueden prepararse, envasarse o comercializarse en una forma adecuada para administración embolada o para administración continua. Las formulaciones inyectables pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma farmacéutica unitaria, tal como en ampollas o en recipientes multidosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero sin limitación, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, pastas y similares. Dichas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero sin limitación, agentes de suspensión, estabilización o dispersión. En una realización de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en forma seca (es decir en polvo o granular) para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo agua apirógena estéril) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las formulaciones parenterales también incluyen soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponantes (preferentemente a un pH de 3 a 9) pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más convenientemente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca que se usará junto con un vehículo adecuado tal como agua apirógena estéril. Las formas de administración parenteral ejemplares incluyen soluciones o suspensiones en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones de propilenglicol o dextrosa acuosas. Dichas formas farmacéuticas pueden tamponarse convenientemente, si se desea. Otras formulaciones que pueden administrarse por vía parenteral que son útiles incluyen las que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, o en una preparación liposomal. Las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retrasada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Por ejemplo, en un aspecto, pueden prepararse soluciones inyectables estériles por incorporación del péptido anti-IgE, preferentemente acoplado a un vehículo inmunogénico, en última instancia en combinación con uno o más adyuvantes, en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones por incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación que dan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lectina, por mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y por el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Una composición farmacéutica no limitante ejemplar de la invención es una formulación como una solución acuosa estéril que tiene un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y que comprende de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de un péptido de la invención, de aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 100 milimolar de tampón de histidina, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80, de aproximadamente 100 milimolar a aproximadamente 400 milimolar de trehalosa y de aproximadamente 0,01 milimolar a aproximadamente 1,0 milimolar de EDTA disódico dihidrato.

Los péptidos de IgE antigénicos de la invención también pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación, típicamente en forma de un polvo seco (bien en solitario, bien como una mezcla o bien como una partícula de componente mixto, por ejemplo, mezclada con un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado) a partir de un inhalador de polvo seco, como una pulverización en aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador (preferentemente un atomizador que use la electrohidrodinámica para producir una neblina fina) o nebulizador con o sin el uso de un propulsor adecuado, o como gotas nasales.

El recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador contiene generalmente una solución o suspensión de un anticuerpo de la invención que comprende, por ejemplo, un agente adecuado para dispersión, solubilización o prolongación de la liberación del ingrediente activo, un propulsor o propulsores como disolvente.

Antes del uso en una formulación de polvo seco o suspensión, el producto farmacológico se microniza generalmente hasta un tamaño adecuado para el suministro por inhalación (típicamente menor de 5 micrómetros). Esto puede conseguirse por cualquier procedimiento de trituración apropiado, tal como molienda de chorro en espiral, molienda de chorro en lecho fluido, procesamiento en fluido supercrítico para formar nanopartículas, homogeneización a alta presión o secado por pulverización.

Pueden formularse cápsulas, blísteres y cartuchos para uso en un inhalador o insuflador para que contengan una mezcla en polvo del compuesto de la invención, una base de polvo adecuada y un modificador del rendimiento.

Una formulación de solución adecuada para usar en un atomizador que usa la electrohidrodinámica para producir una neblina fina puede contener una dosis adecuada del péptido de IgE antigénico de la invención por accionamiento y el volumen de accionamiento puede variar por ejemplo de 1  $\mu$ l a 100  $\mu$ l.

Pueden añadirse saporíferos adecuados tales como mentol y levomentol o edulcorantes tales como sacarina o sacarina sódica a las formulaciones de la invención destinadas para administración inhalada/intranasal.

Las formulaciones para administración inhalada/intranasal pueden formularse para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retrasada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

En el caso de inhaladores y aerosoles de polvo seco, la unidad de dosificación se determina por medio de una válvula que suministra una cantidad medida. Las unidades de acuerdo con la invención se disponen típicamente para administrar una dosis medida o "descarga" de un anticuerpo de la invención. La dosis diaria total se administrará típicamente en una sola dosis o, más habitualmente, como dosis divididas a lo largo del día.

Una composición farmacéutica que comprende un péptido de IgE antigénico también puede formularse para una administración por vía oral. La administración oral puede implicar deglución, de modo que el compuesto entra en el tracto gastrointestinal y/o administración bucal, lingual o sublingual, por las que el compuesto entra directamente en el torrente sanguíneo desde la boca.

Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen sistemas sólidos, semisólidos y líquidos tales como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen multi o nanoparticulados, líquidos o polvos; grageas (incluyendo rellenas de líquido); masticables, geles, formas farmacéuticas de dispersión rápida; películas; óvulos, pulverizaciones; y parches bucales/mucoadhesivos.

Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Dichas formulaciones pueden emplearse como cargas en cápsulas blandas o duras (hechas, por ejemplo, de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa) y típicamente comprenden un vehículo, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa o un aceite adecuado y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Las formulaciones líquidas también pueden prepararse por reconstitución de un sólido, por ejemplo, a partir de un sobrecito.

Las composiciones de la invención pueden usarse para tratar, aliviar o prevenir trastornos o síntomas mediados por IgE en un sujeto en riesgo o que padece dicho trastorno o síntoma por estimulación de una respuesta inmune en dicho sujeto por inmunoterapia. La inmunoterapia puede comprender una inmunización inicial seguida de, por ejemplo, uno, dos, tres o más refuerzos adicionales.

Una "cantidad inmunológicamente eficaz" de un péptido de IgE antigénico de la invención, o composición del mismo es una cantidad que se suministra a un sujeto mamífero, en una sola dosis o como parte de una serie, que es eficaz para inducir una respuesta inmune contra IgE en dicho sujeto. Esta cantidad varía dependiendo del estado de salud y físico del individuo a tratarse, del grupo taxonómico del individuo a tratarse, de la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, de la formulación de la vacuna y de otros factores pertinentes. Se espera que la cantidad esté dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos de rutina.

Una "dosis farmacéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz" es esa dosis necesaria para tratar o prevenir o aliviar uno o más trastornos o síntomas relacionados con IgE en un sujeto. La dosis farmacéuticamente eficaz depende entre otras cosas del compuesto específico a administrar, la gravedad de los síntomas, la susceptibilidad del sujeto a efectos secundarios, el tipo de enfermedad, la composición usada, la vía de administración, el tipo de mamífero que se trata, las características físicas del mamífero específico en consideración tal como estado de salud y físico, la medicación concurrente, la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado y otros factores que reconocerán los especialistas en la técnica médica. Para fines de profilaxis, la cantidad de péptido en cada dosis se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas adecuadamente.

Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular depende de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, momento de administración, vía de administración y velocidad de excreción, combinación farmacológica y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia.

Por ejemplo, péptidos de IgE antigénicos o composición farmacéutica de la invención pueden administrarse a un sujeto a una dosis de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 200 mg, por ejemplo, de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{g}$ , de aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{g}$ , de aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 25  $\mu\text{g}$ , de aproximadamente 25  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{g}$ , de aproximadamente 50  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{g}$ , de aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{g}$ , de aproximadamente 500  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 1 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 mg, con refuerzos opcionales administrados, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, dos meses, tres meses, 6 meses y/o un año después.

En algunas realizaciones, se administra una sola dosis de un péptido de IgE antigénico o composición farmacéutica de acuerdo con la invención. En otras realizaciones, se administran múltiples dosis de un péptido de IgE antigénico o composición farmacéutica de acuerdo con la invención. La frecuencia de administración puede variar dependiendo de cualquiera de una diversidad de factores, por ejemplo, gravedad de los síntomas, grado de inmunoprotección deseado, de si la composición se usa para fines profilácticos o curativos, etc. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un péptido de IgE antigénico o composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos semanas (qow), una vez por semana (qw), dos veces por semana (biw), tres veces por semana (tiw), cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana, día sí día no (qod), diariamente (qd), dos veces al día (qid) o tres veces al día (tid). Cuando la composición de la invención se usa para fines de profilaxis, generalmente se administrará tanto para las dosis de sensibilización como para las

de refuerzo. Se espera que las dosis de refuerzo estén separadas adecuadamente o se administrarán preferentemente anualmente o en los momentos en los que los niveles de anticuerpo circulante caigan por debajo de un nivel deseado. Las dosis de refuerzo pueden estar constituidas por el péptido de IgE antigénico en ausencia de la molécula de vehículo inmunogénica original. Dichas construcciones de refuerzo pueden comprender un vehículo inmunogénico alternativo o pueden carecer de cualquier vehículo. Dichas composiciones de refuerzo pueden formularse con o sin adyuvante.

La duración de la administración de un péptido de IgE antigénico de acuerdo con la invención, por ejemplo, el periodo de tiempo durante el que se administra un péptido de IgE antigénico, puede variar dependiendo de cualquiera de una diversidad de factores, por ejemplo, la respuesta del paciente, etc. Por ejemplo, un péptido de IgE antigénico puede administrarse a lo largo de un periodo de tiempo que varía de aproximadamente un día a aproximadamente una semana, de aproximadamente dos semanas a aproximadamente cuatro semanas, de aproximadamente un mes a aproximadamente dos meses, de aproximadamente dos meses a aproximadamente cuatro meses, de aproximadamente cuatro meses a aproximadamente seis meses, de aproximadamente seis meses a aproximadamente ocho meses, de aproximadamente ocho meses a aproximadamente 1 año, de aproximadamente 1 año a aproximadamente 2 años o de aproximadamente 2 años a aproximadamente 4 años o más.

También se contemplan una diversidad de procedimientos de tratamiento en la presente divulgación, comprendiendo dichos procedimientos administrar un péptido de IgE antigénico de acuerdo con la invención. Los presentes procedimientos de tratamiento incluyen procedimientos de inducción de una respuesta inmune en un individuo contra IgE propia y procedimientos para prevenir, aliviar o tratar un trastorno o síntoma mediado por IgE en un individuo.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar, prevenir o aliviar un trastorno o síntoma relacionado con IgE en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de IgE antigénico de la divulgación, o composición inmunogénica o farmacéutica del mismo, a dicho sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune contra IgE propia en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente o inmunológicamente eficaz de un péptido de IgE antigénico de la divulgación, o una composición inmunogénica o farmacéutica del mismo a dicho sujeto.

Los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento” se refieren a un procedimiento para aliviar o suprimir un trastorno biológico y/o al menos uno de sus síntomas relacionados. Como se usa en este documento, “aliviar” una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o frecuencia de aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Además, las referencias en este documento a “tratamiento” incluyen referencias a tratamiento curativo, paliativo y profiláctico. Dicho sujeto es preferentemente un ser humano y puede ser masculino o femenino de cualquier edad.

Otros aspectos de la invención se refieren a un péptido de IgE antigénico de acuerdo con la invención o a una composición inmunogénica o una composición farmacéutica del mismo, para uso como un medicamento, preferentemente en tratamiento, alivio o profilaxis de trastornos relacionados con IgE.

En otra realización más, la presente invención proporciona el uso de un péptido de IgE antigénico de la invención o de una composición inmunogénica o una composición farmacéutica del mismo en la fabricación de un medicamento, preferentemente para tratar un trastorno mediado por IgE.

En algunos aspectos de los usos o procedimientos de la invención, dicho trastorno mediado por IgE se selecciona del grupo constituido por conjuntivitis, asma alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, anafilaxia, asma, dermatitis de contacto, gastroenteropatía alérgica, aspergilosis pulmonar alérgica, púrpura alérgica, eccema, síndrome de hiper IgE (de Job), hipersensibilidad anafiláctica, mieloma de IgE, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, alergias alimentarias, colitis ulcerosa, colitis indeterminada y colitis infecciosa), urticaria, soriasis, preferentemente del grupo constituido por asma, asma alérgica, rinitis alérgica y alergias alimentarias.

El asma es un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias que causa episodios recurrentes de sibilancias, dificultades para respirar, opresión en el pecho y/o tos en individuos susceptibles. Los especialistas en la técnica distinguen diversos tipos de asma incluyendo: asma alérgica, que se piensa que surge en pacientes que han desarrollado una hipersensibilidad a alérgenos ambientales; asma inducida por fármacos, típicamente desencadenada por sensibilidad a aspirina u otros inhibidores de la COX; asma inducida por el ejercicio; asma casi mortal o hiperaguda; asma nocturna; asma ocupacional, generalmente causada por exposición a ciertos compuestos químicos en el lugar de trabajo. Por lo tanto, el asma puede desencadenarse por diversos estímulos incluyendo: alérgenos del aire tales como ácaros del polvo, polen, caspa animal, esporas fúngicas, plumas... (asma extrínseca); irritantes inespecíficos tales como humo del tabaco, vapores químicos, polución, dióxido de azufre... (asma intrínseca).

La rinitis alérgica implica generalmente un grupo de síntomas, incluyendo síntomas inflamatorios, predeterminadamente en la nariz, los senos y los ojos que aparecen después de la exposición a partículas del aire. Los síntomas incluyen estornudos; obstrucción nasal; moqueo (y ocasionalmente sangrados nasales); tos; cefalea; picor de nariz, boca, ojos, garganta, piel o cualquier área expuesta al alérgeno; olfato alterado (y por lo tanto sensibilidad a sabores); nariz taponada (congestión nasal); conjuntivitis; ojos llorosos; garganta dolorida; y sibilancias.

La rinitis alérgica puede ser perenne y/o estacional. La rinitis alérgica perenne es una rinitis alérgica que dura todo el año. Típicamente está causada por una exposición continua a alérgenos tales como caspa animal, esporas de mohos de interior o ácaros del polvo domésticos. La rinitis alérgica estacional es una rinitis alérgica que se produce

solamente durante ciertos momentos del año. Está comúnmente causada por alergias a polen de árboles, césped y malas hierbas que se producen estacionalmente.

Una alergia alimentaria es una respuesta inmune exagerada desencadenada por huevos, cacahuetes, leche o algún otro alimento específico. Cualquier alimento puede causar una reacción alérgica pero unos pocos alimentos son los principales culpables. En niños las alergias alimentarias más comunes son a huevos, cacahuetes, leche, soja, avellanas, trigo, marisco (camarones, cangrejos, langosta, caracoles, almejas). En niños mayores y adultos, las alergias alimentarias más comunes son: cacahuetes, avellanas, marisco, peces. Los síntomas pueden limitarse principalmente al estómago y los intestinos o pueden implicar a muchas partes del cuerpo después de que se digiera o absorba el alimento. Los síntomas pueden incluir: picor de garganta, anafilaxia (una reacción alérgica corporal completa grave que puede resultar mortal); dolor abdominal; diarrea; náuseas; vómitos; calambres estomacales; picor de la boca, garganta, ojos, piel o de cualquier área; urticaria; angioedema (hinchazón, especialmente de los párpados, cara, labios y lengua); aturdimiento ligero o desmayo; congestión nasal; moqueo; falta de aliento; sibilancias; dificultades para tragar; síndrome de alergia oral. El síndrome de alergia oral comprende generalmente picor en los labios, lengua y garganta y a veces labios hinchados.

En otros aspectos de los usos o procedimientos de la invención, dicho sujeto es un mamífero, preferentemente un sujeto humano.

En aún otros aspectos de los usos o procedimientos de la invención, dicho sujeto padece dicho trastorno mediado por IgE. Como alternativa, dicho sujeto está en riesgo de padecer dicho trastorno mediado por IgE.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los especialistas en la técnica una divulgación completa y una descripción de cómo realizar y usar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos y los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deberían explicarse algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados Celsius y la presión es la o está próxima a la atmosférica. Pueden usarse abreviaturas convencionales, por ejemplo, pb, par(es) de bases; kb, kilobase(s); pl, picolitro(s); s o seg segundo(s); min, minuto(s); h, hora(s); aa, aminoácido(s); kb, kilobase(s), pb, par(es) de bases; nt, nucleótido(s); i.m. intramuscular/por vía intramuscular; i.p., intraperitoneal/por vía intraperitoneal; s.c., subcutánea/por vía subcutánea; y similares.

#### Ejemplo 1. Selección de péptidos de IgE antigénicos

La estructura de los dominios constantes CH3-CH4 de la IgE humana que interaccionan con la subunidad alfa del receptor de alta afinidad de IgE FcεRI se ha resuelto y publicado (Wurzberg BA y col., (2000) *Immunity*, 13 (3), 375-85; Garman SC y col., (2000) *Nature* 20, 406 (6793), 259-66). Esta información estructural se usó junto con la bibliografía que sugiere que hay dos regiones en las que se produce la unión para identificar 4 bucles potenciales como puntos de interacción clave y para diseñar los siguientes 4 péptidos que se corresponderían con áreas de importancia para la interacción de IgE-FcεRI (véase la figura 1).

Morado: ADSNPRGVSA YLSRPSP (SEC ID N.º: 312)

Azul: LWDLAPSKGTVN (SEC ID N.º: 165)

Naranja: STRKEEKQRNGTLTVTSTLP (SEC ID N.º: 1)

Amarillo: QCRVTHPHLPRALMRS (SEC ID N.º: 220).

#### Ejemplo 2 - Preparación de conjugados de Morado-VLP

El péptido morado (SEC ID N.º: 312) en el que se añadió un resto de cisteína terminal para fines de conjugación (secuencia ADSNPRGVSA YLSRPSPC (SEC ID N.º: 434)) se sintetizó usando un protocolo de Fmoc convencional en resina de amida CLEAR. Las reacciones de acoplamiento de aminoácidos se realizaron usando un exceso de 5 veces de aminoácido protegido con Fmoc activado con 1 eq de HBTU (hexafluorofosfato de (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) en presencia de HOBt (hidroxibenzotriazol) y NMM (N-metilmorfolina). La desprotección del grupo Fmoc se consiguió con piperidina al 20 %/DMF. Después se escindió el péptido unido a resina y se eliminaron los grupos protectores de cadena lateral simultáneamente con Reactivo D (TFA/H<sub>2</sub>O/DODT: 89/3/8). El péptido se generó con un extremo N-terminal libre y un extremo C-terminal amidado. El péptido bruto se purificó hasta la homogeneidad por HPLC usando una columna BEH 130 C18 y un gradiente de agua/acetronitrilo en presencia de TFA al 0,1 %. El péptido purificado se secó al vacío usando un liofilizador. El péptido se analizó usando espectrometría de masas (CL-EM) y dio datos satisfactorios (véanse a continuación).

Tabla 1

Péptido	Pureza	Masa Esperada (Da)	Masa Observada (Da)
Morado + Cisteína (SEC ID N.º: 434)	95 %	1877,1	1878,1

El péptido Morado + Cisteína (SEC ID N.º: 434) se conjugó con las partículas similares a virus (VLP) Qβ y Antígeno de Superficie de Hepatitis B (HBsAg) en dos experimentos de conjugación separados. El Qβ usado en este estudio

se produjo por fermentación bacteriana de *E. coli* en una cepa BL21 (DE3) que incorporaba un plásmido pET28 que codifica la proteína monomérica de 14 kD: MAKLETVTLGNIGKDGKQTLVNLPRGVNPTNGVASLSQAGAVPALEKRVTVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPACTA NGSCDPSVTRQAYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLDIAIDQLNPAY (SEC ID N°: 435). La fermentación se induce a una DO600 de 0,8 con IPTG y se deja que se desarrolle durante una noche en caldo Terrific (TB) con kanamicina. La VLP, que se autoensambla en la célula huésped, se purificó después a partir del sedimento celular de fermentación usando el procedimiento descrito en la solicitud de patente EP20050105513 con las siguientes diferencias: después de la ruptura de las células, el homogeneizado aclarado se trató con sulfato de amonio a una saturación del 50 % y el sedimento celular se recuperó por centrifugación. Después, el sedimento se volvió a disolver en tampón HEPES y se dializó contra tampón HEPES antes de proceder a la primera etapa de columna en el procedimiento publicado. Después de las etapas de columna de intercambio iónico y de columna de hidroxilapatita, el material se purificó usando una etapa de columna de intercambio aniónico adicional y se esterilizó por filtración para generar el material a granel de VLP final que se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y microscopía electrónica con resultados aceptables.

El HBsAg (subtipo adw) usado en este estudio se adquirió en Aldevron (ND, Estados Unidos). El HBsAg existe como partículas esféricas de aproximadamente 22 nm de diámetro que están constituidas por múltiples copias de una proteína monomérica de 24 kD embebida en una vesícula de bicapa lipídica. También está disponible una cepa de *S. cerevisiae* para la producción de HBsAg de este tipo en la colección de cultivos ATCC.

Las VLP (tanto de Q $\beta$  como de HBsAg) se activaron usando reactivo de enlace de éster de *N*-gamma-maleimido-butililoxi-succinimida (GMBS). El reactivo GMBS se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a la solución de VLP a un exceso molar de  $\geq 10$  veces. Se dejó que la reacción de activación se desarrollara durante  $\geq 30$  minutos y después la solución se desalinizó usando una columna de desalinización NAP-25 en Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco (DPBS) con EDTA 5 mM. Si era necesario, la solución de proteína se concentró ligeramente usando microconcentradores de centrifuga de 10 kD antes de la siguiente reacción de conjugación.

Antes de la reacción de conjugación, el péptido morado se disolvió en una alícuota de DPBS pH 7,4 con EDTA 5 mM como aditivo. La concentración del péptido en la solución era de 10 mg/ml. El péptido solubilizado se añadió a una alícuota de agente reductor inmovilizado TCEP (Pierce Chemical) que se había lavado en DPBS que contenía EDTA 5 mM. La alícuota de péptidos se incubó con mezcla en presencia del gel TCEP durante aproximadamente 1 hora, tiempo después del que la alícuota se precipitó por centrifugación en una microfuga y se desechó el sedimento sólido. El sobrenadante que contenía péptido reducido se añadió directamente a la VLP activada que se había preparado anteriormente.

Se dejó que la reacción entre las VLP y los péptidos reducidos se desarrollara durante al menos treinta minutos con mezcla muy suave. Al final del tiempo de reacción cada muestra se desalinizó en PBS de Dulbecco (DPBS) usando columnas de desalinización NAP-10 o NAP-25 (GE Healthcare). Los péptidos conjugados desalinizados se analizaron para determinar el contenido de proteína usando el ensayo de Bradford (Azul Brillante de Coomassie, Pierce Chemical), así como mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño. Los productos conjugados se esterilizaron por filtración usando un filtro de 0,22  $\mu$ m y se almacenaron a 2-8°C hasta el uso. Se prestó especial atención a estas muestras durante el almacenamiento para prevenir la congelación o exposición a temperaturas extremas.

El grado de la conjugación para las dos muestras de VLP-péptido se midió usando SDS-PAGE y se observó un aumento de peso molecular para ambas muestras que concordaba con la adición del péptido al monómero de proteína VLP. Además, la muestra de Q $\beta$ -péptido se ensayó en el ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño por HPLC (usando una columna de HPLC Tosoh PWXL5000) y se descubrió que contenía VLP ensamblada en comparación con muestras de VLP no conjugadas. Además, la muestra de Q $\beta$ -péptido se observó usando microscopía electrónica usando un JEOL 1230 TEM con haz de 80 kV y se descubrió que contenía partículas uniformes, ensambladas. La integridad de la partícula de conjugado de HBsAg-péptido se ensayó usando un SDS-PAGE no reducido y puesto que la proteína no se introducía en el gel, se consideró que la muestra contenía especies de alta masa molecular y que era adecuada para el uso *in vivo*.

### **Ejemplo 3. Preparación de conjugados de Naranja, Morado, Amarillo y Azul-VLP, así como de conjugados de VLP con Morado Limitado y Azul Mejorado**

Los péptidos Amarillo, Azul + Cisteína, Morado + Cisteína y Naranja + Cisteína cuyas secuencias de aminoácidos se indican en la Tabla 2 se sintetizaron de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y principalmente de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 2 de la forma siguiente. Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos Symphony con un protocolo de Fmoc-Ser convencional en resina de amida CLEAR, excepto por el péptido Amarillo que se generó en una resina Fmoc-Ser(tBU)-Wang precargada. Véase el Ejemplo 2 para detalles acerca de las reacciones de acoplamiento y la desprotección. Todos los péptidos se generaron con un extremo N-terminal libre y un extremo C-terminal amidado, excepto por el péptido Amarillo, que se generó con un extremo N-terminal acetilado y un extremo C-terminal carboxilado. Los péptidos en bruto se purificaron en un sistema de HPLC con una columna BEH 130 C18 como en el Ejemplo 2. Los péptidos purificados se secaron al vacío usando un liofilizador. Por último, los péptidos se analizaron con CL-EM y todos los péptidos dieron datos satisfactorios (véase la Tabla 3 a continuación).

Los péptidos Azul Mejorado y Morado Limitado se fabricaron por CEM Corporation (Matthews, NC, Estados Unidos). Los péptidos se fabricaron usando técnicas de química de péptidos convencionales y se purificaron usando cromatografía. Los péptidos purificados se analizaron usando CL-EM y se descubrió que tenían una alta pureza ( $>95$  %) (véase la Tabla 3 a continuación).

**Tabla 2.** Secuencias peptídicas

Nombre	Secuencia	SEC ID N.º
Naranja + Cisteína	STRKEEKQRNGTLTVTSTLPC	436
Amarillo	QCRVTHPHLPRALMRS	220
Azul + Cisteína	LVVDLAPSKGTVNC	437
Morado + Cisteína	ADSNPRGVSAYLSPSPC	434
Azul Mejorado	CLVVDLAPSKGTVNGGGGGC	438
Morado Limitado	CADSNPRGVSAYLSPSPC	439

El subrayado indica restos de cisteína añadidos con fines de conjugación y el doble subrayado indica un engarce GC.

**Tabla 3.** Datos de CL-EM de Péptidos.

Péptido	Pureza	Masa Esperada (Da)	Masa Observada (Da)
Naranja + Cisteína	97 %	2349,6	2352
Amarillo	98,7 %	1944,3	1944
Morado + Cisteína	95 %	1877,1	1878,1
Azul + Cisteína	96,6 %	1415,7	1416
Morado Limitado	>95 %	1979,0	1979,4
Azul Mejorado	>95 %	1803,8	1803,2

- 5 Cada péptido se conjugó con la partícula similar a virus (VLP) Q $\beta$  en lotes separados. La Q $\beta$  usada en este estudio se produjo por fermentación bacteriana de *E. coli* y purificación exhaustiva como en el Ejemplo 2.

La VLP (concentración de proteína >1 mg/ml mediante ensayo de Bradford) se activó usando reactivo de enlace de éster de N-gamma-maleimidobutirilo-succinimida (GMBS) de Pierce Chemical como se ha descrito en el Ejemplo 2 anteriormente.

- 10 Antes de la reacción de conjugación, cada péptido se disolvió en una alícuota de Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco (DPBS) pH 7,4 con EDTA 5 mM como aditivo. La concentración de cada péptido en solución estaba en el intervalo de 8-12 mg/ml, véase la tabla 4 a continuación para datos exactos. El péptido solubilizado se añadió a una alícuota de agente reductor inmovilizado TCEP como se ha descrito en el Ejemplo 2 anteriormente.
- 15 El sobrenadante que contenía péptido reducido se añadió directamente a la VLP activada que se había preparado anteriormente. Se dejó que se desarrollara la reacción entre las VLP y los péptidos reducidos durante al menos treinta minutos con mezcla muy suave. Al final del tiempo de reacción cada muestra se desalinizó en PBS de Dulbecco (DPBS) usando columnas de desalinización NAP-10 o NAP-25 (GE Healthcare). Los péptidos conjugados desalinizados se concentraron después usando concentradores de centrifuga MWCO de 10 kD y se analizaron para determinar el contenido de proteína usando el ensayo de Bradford (Azul Brillante de Coomassie, Pierce Chemical), así como mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño, véase a continuación para detalles
- 20 adicionales. Los productos conjugados se esterilizaron por filtración usando un filtro de 0,22  $\mu$ m y se almacenaron a 2-8°C hasta el uso. Se prestó especial atención a estas muestras durante el almacenamiento para evitar la congelación o exposición a temperaturas extremas. Los conjugados de VLP-péptido se analizaron para determinar el grado de conjugación y el ensamblaje de partículas como se ha descrito en el Ejemplo 2 anteriormente (SDS-PAGE
- 25 incluyendo densitometría, microscopía electrónica y HPLC de exclusión por tamaño).

**Tabla 4.** Conjugados de VLP-Péptido

Péptido	Cantidad de Péptido (mg)	Concentración de Péptido en DPBS (mg/ml)	Cantidad aprox. de VLP activada añadida (mg)	Rendimiento final (mg)	Sustitución* ( $\mu$ g de péptido por mg de proteína)
Amarillo	4,5	11,3	5	3,2	54
Naranja + Cisteína	4,5	11,3	5	2,8	70

Azul + Cisteína	3,5	8,8	4	1,9	47
Morado + Cisteína	3,5	8,8	4	2,3	60
Morado Limitado	3	10	3	1,3	62
Azul Mejorado	3	10	3	1,5	48
*Como se determinó mediante SDS-PAGE y cálculos de densitometría					

#### Ejemplo 4: preparación de conjugados de KLH con Naranja, Morado, Amarillo y Azul, así como de conjugados de KLH con Morado Limitado y Azul Mejorado

Los péptidos de la Tabla 2 se conjugaron con KLH adquirido en Pierce Chemical (Rockford, Illinois, Estados Unidos) y se purificaron de la forma siguiente. Los péptidos se prepararon como se ha detallado en los Ejemplos 2 y 3 anteriormente. La KLH usada era KLH activada por maleimida Imject suministrada por Pierce Chemical como un sólido liofilizado. Se reconstituyeron viales de esta KLH con agua de calidad de cultivo tisular antes de la adición de los péptidos. Los péptidos se trataron con gel TCEP como se ha descrito en los Ejemplos 2 y 3 anteriormente y los sobrenadantes que contenían péptidos reducidos se añadieron directamente a alícuotas de la solución de KLH activada y se incubaron con mezcla suave. Se dejó que la reacción de acoplamiento se desarrollara durante dos horas, momento en el que las soluciones se centrifugaron para eliminar los sólidos y se desalinizaron usando columnas de desalinización de goteo por gravedad como anteriormente. Los conjugados desalinizados se analizaron mediante SDS-PAGE, ensayo de proteína de Bradford y digestión con tripsina, seguida de análisis de EM-MALDI. Los conjugados se esterilizaron por filtración usando un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se mantuvieron a 2-8°C hasta el uso, puesto que no se recomienda congelar las soluciones de KLH.

#### Ejemplo 5. Identificación de péptidos de IgE

Este estudio tenía como objetivo evaluar cómo eran de eficaces los péptidos conjugados con una VLP de Qbeta (como se ha detallado en los Ejemplos 2 y 3 anteriores) en la inducción de una respuesta de anticuerpos que puedan unirse a IgE humana. Se inyectó a Balb/c hembra (6-8 semanas) por vía intramuscular (volumen inyectado de 50 microlitros en cada músculo *Tibialis anterior*) los días 0, 19 y 34. La necropsia tuvo lugar el día 46. En la necropsia se extrajo una muestra de sangre de 400-600 microlitros a partir de ratones eutanasiados por punción cardiaca. Se dejó que la sangre coagulara durante una noche y al día siguiente se recogió el suero.

Se investigaron las respuestas de anticuerpos de animales inmunizados para algunos o todos los siguientes ensayos: a) determinación del título de IgG, b) unión a IgE libre en suero, c) unión a IgE unida a Fc $\epsilon$ R1 d) ensayo de desgranulación y e) ensayos de cuantificación de IgE.

##### a) Determinación del título de IgG total

**Sumario:** un ELISA colorimétrico que genera un título recíproco (RT) que representa los niveles de moléculas de IgG total que son específicas para la vacuna. Se prepararon diluciones seriadas de muestras de sueros y se ensayaron en el ensayo. Se usó como control positivo una muestra de suero preparada a partir de muestras de sueros de ratones vacunados con Ce3 combinadas. Se usó como control negativo un suero negativo de Balb/c de Harlan Labs (combinado a partir de 400 animales de Harlan laboratories N.º de Código R-0131D). **Recubrimiento de placas de ensayo:** se recubrieron placas de ensayo de alta unión de 384 pocillos (Corning International N.º de Cat. 3700) con 25  $\mu\text{l}$ /pocillo de reserva de proteína Ce3Ce4 humana diluida a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con PBS 0,01 M pH 7,4 y se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de lavar x2 con PBS pH 7,4, las placas se bloquearon usando 80  $\mu\text{l}$ /pocillo de PBS 0,01 M/BSA al 1 %, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora antes de un lavado final x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %. **Preparación y ensayo de muestras:** al día siguiente, se preparó una dilución seriada semilogarítmica de 8 puntos de cada muestra partiendo de la dilución 1:100 (diluyente PBS/BSA al 1 %), se transfirieron 25  $\mu\text{l}$ /pocillo de la dilución seriada por duplicado a la placa recubierta con Ce3Ce4 humana después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Después de lavar x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %, se añadieron 25  $\mu\text{l}$ /pocillo de anticuerpo de detección de IgG total (Fc de conejo anti-IgG de ratón, N.º de Cat. A90-130A Bethyl Laboratories) 1:6000 con PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %, después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x5 con PBS 0,01 M pH 7,4 Tween 20 al 0,05 %, se añadieron 25  $\mu\text{l}$ /pocillo de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante del kit de Bio-Rad (Bio-Rad N.º de Cat. 172-1019) 1:3000 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 % pH 7,4, después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x4 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 % luego x1 con PBS 0,01 M pH 7,4 solamente, se añadieron 25  $\mu\text{l}$ /pocillo de Sustrato Typer HRP de Ratón (Bio-Rad N.º de Cat.172-1064), luego se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 25  $\mu\text{l}$ /pocillo de ácido oxálico al 2 %, se leyó la Abs 405 nm. **Análisis de datos:** se calculó un valor de corte (Abs 405 nm) tomando la media de las lecturas por duplicado generadas por la concentración más baja del grupo de estudio de control negativo apropiado y multiplicando este valor por 2,5. Se representaron las curvas de titulación para cada muestra de ensayo (título de muestra frente a Abs 405 nm) y se predijo el título de la muestra (que se transformó posteriormente en título recíproco) a partir del valor de corte calculado.

##### b) Título de unión a IgE libre

**Sumario:** un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) que genera un título recíproco (RT) y un valor máximo

para representar los niveles de complejos de IgG de ratón:IgE humana formados después de la incubación de diluciones seriadas de sueros de ensayo durante una noche con una alta concentración de IgE humana. Se usaron muestras de suero preparadas a partir de muestras de sueros de ratones vacunados con Ce3 combinadas como control positivo, junto con un anticuerpo de ratón contra una región del dominio Ce3 de IgE humana (AbD Serotec 0100-0413 (E411 (5H2)) añadido a 50 µg/ml y a 1 mg/ml en suero negativo de Balb/c de Harlan Labs (combinado a partir de 400 animales de Harlan laboratories N.º de Código R-0131D), que también se usó en solitario como control negativo. **Incubación de muestras con IgE humana:** se preparó una dilución seriada semilogarítmica de 8 puntos de cada muestra, incluyendo los controles, comenzando a una dilución 1:3 (diluyente PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %). Se mezclaron volúmenes de 10 µl de cada concentración de muestra con 10 µl de IgE humana 100 µg/ml (diluida a partir de una reserva usando PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %), después las placas se sellaron y se incubaron durante una noche a 4°C. **Recubrimiento de placas de ensayo:** al día siguiente, se recubrieron placas de ensayo de 384 pocillos (unión convencional Meso-Scale Diagnostics (MSD) N.º de Cat. L11XA-1, 0370PA) con 12 µl/pocillo de pAb de oveja contra IgE humana (Gentaur, ICL (Immunology Consultants Lab) N.º de Cat. SE-80A) diluido a 1 µg/ml con PBS 0,01 M pH 7,4, después se incubó en un agitador a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar x3 con PBS 0,01 M pH 7,4 las placas se bloquearon usando 25 µl/pocillo de tampón de bloqueo de partida de Pierce (Pierce Biotech. N.º de Cat. 37538) y se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 40 min, antes de un lavado final x3 con PBS 0,01 M pH 7,4. **Preparación y ensayo de muestras:** se diluyeron volúmenes de 20 µl de la mezcla de incubación durante una noche de sueros con IgE humana 1:5 con 80 µl/pocillo de PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 % y después se transfirieron 12 µl/pocillo por duplicado a las placas de ensayo MSD recubiertas. Después de incubar en un agitador a temperatura ambiente durante 2 horas, las placas se lavaron x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %. Se añadieron 12 µl/pocillo de anticuerpo de detección (pAb de burro contra IgG de ratón H+L Abcam N.º de Cat. ab6707, MSD SULFO-marcado usando MSD N.º de Cat. R91AN-1) 1:5000 con PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %, después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 % se añadieron 50 µl/pocillo de tampón T de lectura MSD (4x) con tensioactivo (MSD N.º de Cat. R92TC) 1:2 con agua MQ. Las placas se leyeron usando un MSD Sector Imager 6000.

**Análisis de datos:** se calculó un valor de corte (píxeles) tomando la media de las lecturas por duplicado generadas por la concentración más baja del grupo de control negativo de estudio apropiado y multiplicando este valor por 5. Se representaron las curvas de titulación para cada muestra de ensayo (título de muestra frente a píxeles) y se predijo el título de la muestra (que se transformó posteriormente en título recíproco) a partir del valor de corte calculado. El valor de pico máximo de las curvas de titulación también se registró.

### c) Unión a IgE unida a receptor

Este ensayo mide si los anticuerpos en suero de ratones vacunados pueden unirse a cierta IgE humana unida al receptor FcεR1 en la superficie de células RBL-THE, los anticuerpos se detectan después mediante un anticuerpo específico anti-Fc de ratón conjugado con ficoeritrina y la fluorescencia se mide mediante citometría de flujo. Se ha usado un anticuerpo anti-IgE humana de Biodesign diluido en suero de BALBc no vacunado como control positivo. **Ensayo:** se descongelaron células RBL-THE congeladas ( $12 \times 10^6$  células/ml) y se lavaron una vez con tampón de ensayo (PBS-suero de cabra al 5 %). Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/pocillo en tampón de bloqueo (PBS-suero de cabra al 5 %-Fab de ratón 0,1 mg/ml (ChromPure IgG de Ratón, fragmento Fab - Jackson Immunoresearch)) en placas de 96 pocillos y se incubaron en un agitador a 4°C durante 1 h 30. Se añadieron 50 µl de IgE humana a 4 µg/ml por pocillo (diluida en tampón de ensayo) (excepto los pocillos de control Biodesign sin IgE, células solamente y aMo-PE) y las placas se incubaron durante 1 h en el agitador a 4°C. Las células se lavaron una vez con tampón de ensayo y se resuspendieron en 30 µl de anti-IgE humana (Biodesign 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml - control positivo) diluida en suero de BALBc al 5 % o con muestras de suero de ratones vacunados diluidas 1:20, 1:40 y 1:80 en tampón de ensayo. Las muestras de suero se sembraron en placas por triplicado y los controles por duplicado. Las placas se incubaron en el agitador a 4°C durante 1 h 30 después se lavaron con tampón de ensayo, se resuspendieron en 100 µl de anticuerpo de cabra específico de PE anti-Fc de ratón (1:200 en tampón de ensayo, cabra Jackson Immunoresearch) y se incubaron durante 45 min en un agitador a 4°C. Las células se lavaron 3 veces con tampón de ensayo, se resuspendieron en 80 µl de paraformaldehído al 2 % en PBS y se incubaron durante una noche a 4°C. Se midió la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. **Análisis de datos:** se usó la intensidad de fluorescencia media de cada muestra para análisis. Se calculó el promedio del control negativo (aMo-PE en solitario) y su valor se restó de cada pocillo. Se calculó el promedio del control positivo y cada muestra se expresó como porcentaje de control positivo (Biodesign) a su dilución de suero respectiva. La dilución de suero 1:40 se extrajo después y se realizó un ANOVA.

### d) Ensayo de desgranulación

Este ensayo mide si el suero de ratones vacunados induce la desgranulación de células RBL-THE por medición de la actividad de la enzima β-hexosaminidasa liberada por células RBL-THE en medios. Se usó E25 (Xolair) diluido en suero de BALBc no vacunado como control negativo (40 µg/ml) y se usó anticuerpo policlonal de cabra de Sigma diluido en suero de BALBc no vacunado como control positivo. **Siembra de células:** se descongelaron RBL-THE p12 congeladas ( $10 \times 10^6$  células/vial; células de leucemia basófila de rata transfectadas de forma estable con FcεR1 humano), se lavaron en medios RBL-P (MEM-Earles complementado con FCS al 15 % y L-Glutamina 2 mM) y se resuspendieron en medios RBL-P a  $8 \times 10^5$  células/ml con IgE humana a 0,25 µg/ml. Se sembraron  $8 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron durante 48 horas a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5 %. **Preparación de muestras y tampones:** el día 3, se preparó tampón de Tyrode 1X (NaCl 135 mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Glucosa 5,6 mM, BSA 1 mg/ml, Hepes 20 mM, pH 7,4). También se prepararon tampón de Tyrode-suero de BALBc al 5 %, tampón de Tyrode-suero de BALBc al 2,5 % y Tritón al 1 % en tampón de Tyrode-suero de BALBc al 5 %. El control positivo (anticuerpo policlonal de cabra anti-IgE (82 mg/ml en PBS) - Sigma, I0632) se diluyó de forma seriada en tampón de Tyrode-suero de BALBc al 5 % (1er pocillo en tampón de Tyrode-suero de BALBc al 5 % y después en tampón de Tyrode) de 10 µg/ml a 2,5 µg/ml. El control negativo (E25) se mantuvo constante a 40 µg/ml en suero de BALBc diluido (dilución de suero 1:20, 1:40 y 1:80). Las muestras de suero de ensayo de ratones vacunados se ensayaron a una dilución de suero 1:20, 1:40 y 1:80. Todos los controles

y muestras de suero de ensayo se ensayaron por triplicado en cada placa. **Ensayo agonista:** el día 3, las placas de células se retiraron de la incubadora. Se retiraron 95 µl de medios de los pocillos y las células se lavaron con 200 µl de tampón de Tyrode 1X, se retiró el tampón de lavado y se añadieron 70 µl de anticuerpos diluidos (control positivo, control negativo o muestra de suero de ensayo). Se incubaron las células a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante 1 hora. Al final de la incubación, las placas se retiraron de la incubadora y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos para sedimentar cualquier célula despegada. Se retiraron 65 µl de sobrenadante y se pusieron en placas de 96 pocillos estériles. Se ensayaron 25 µl del sobrenadante para determinar la actividad de β-hexosaminidasa. **Actividad de β-hexosaminidasa:** se añadieron 25 µl de sobrenadante a una placa de 96 pocillos. Se añadieron 25 µl de NAGA 4 mM en tampón citrato (*N*-acetil-β-*D*-glucosaminida 4 mM (NAGA) (Sigma, N9376) en tampón citrato 50 mM pH 4,5) a todos los pocillos (recién preparada), las placas se incubaron durante 1 h a 37°C y se añadieron 150 µl de glicina 0,2 M para interrumpir la reacción. Las placas se leyeron a 405 nM con Envision. **Análisis de datos:** se expresó la desgranulación como porcentaje de la actividad β-hexosaminidasa total a partir de valores para pocillos totales (tratados con Triton X-100 al 1 %). El % de desgranulación a la dilución 1:40 se extrajo después para análisis y se realizó un ANOVA en las muestras de suero.

#### 15 e) Ensayo de reducción de IgE humana libre

**Sumario:** un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) que cuantifica los niveles de IgE humana libre que permanecen después de una incubación de una noche de alícuotas de sueros de ensayo con una dilución seriada de IgE humana, tiempo durante el que se forman complejos de IgG de ratón:IgE humana. Para asegurar la exactitud del ensayo de cuantificación de IgE humana, es esencial retirar primero cualquier complejo de IgG de ratón:IgE humana usando Dynabeads magnéticas recubiertas de proteína G, que retiran por unión cualesquiera complejos a través de la región Fc de IgG de ratón. Puede calcularse para cada muestra un valor para el % de disminución en los niveles de IgE humana de los grupos de control negativo apropiados. Como control positivo, se añadió Xolair/E25 a 40 µg/ml (dosis de terapia convencional) en suero negativo de Balb/c de Harlan Labs (combinado a partir de 400 animales de Harlan laboratories N.º de Código R-0131D), que también se usó en solitario como control negativo. **Incubación de muestras con IgE humana:** se añadieron volúmenes de 2 µl de cada concentración de una dilución seriada semilogarítmica de 8 puntos de IgE humana (diluyente PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %) a cada uno de 8 x volúmenes de 10 µl de muestras de sueros de ensayo, incluyendo control positivo Xolair/E25 (40 µg/ml), comenzando la IgE a una concentración final de 30 µg/ml. Las placas se sellaron y se incubaron durante una noche a 4°C. **Recubrimiento de placas de ensayo:** al día siguiente, se recubrieron placas de ensayo de 384 pocillos (unión convencional Meso-Scale Diagnostics (MSD) N.º de Cat. L11XA-1, 0370PA) con 12 µl/pocillo de pAb de oveja contra IgE humana (Gentaur, ICL (Immunology Consultants Lab) N.º de Cat. SE-80A) diluido a 5 µg/ml con PBS 0,01 M pH 7,4, después se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar x3 con PBS 0,01 M pH 7,4, las placas se bloquearon usando 25 µl/pocillo de tampón de bloqueo de partida de Pierce (Pierce Biotech. N.º de Cat. 37538) y se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 40 min, antes de un lavado final x3 con PBS 0,01 M pH 7,4. **Preparación de muestra y Dynabead:** se diluyeron volúmenes de 5 µl de la mezcla de sueros de incubación de una noche con IgE humana 1:20 con 95 µl/pocillo de PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 % [nota: también se diluyeron 10 µl de la dilución 1:20 adicionalmente 1:2 con PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 % para ensayar en el ensayo de unión a IgE libre para obtener una medición de los complejos de IgG mu:IgE hu antes de la incubación con perlas de Proteína G]. El volumen necesario de concentración 1x de Dynabeads de Proteína G (Invitrogen N.º de Cat. 10004D) se lavó y se preparó como en el prospecto, después se concentró x4 por resuspensión en 0,25 x el volumen de perlas inicial. **Incubación de muestra con Dynabeads:** se mezclaron 30 µl de cada muestra 1:20 con perlas 4x 15 µl/pocillo, se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminaron las perlas de las muestras usando una placa con barra magnética Dynal (Invitrogen N.º de Cat. 12027) y se mezclaron 40 µl de la muestra restante con 20 µl de mezcla de perlas 4x recién preparada, se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se transfirieron 45 µl/pocillo de la muestra restante en pocillos recién preparados y se centrifugaron 1 min a 1000 rpm, se devolvieron las placas a la placa con barra magnética y se transfirieron 40 µl/pocillo a pocillos recién preparados. [Nota: se usaron 30 µl de muestra restante para ensayar en el ensayo de unión a IgE libre para obtener una medición de los complejos de IgG mu:IgE hu después de la incubación con perlas de Proteína G para asegurar que se habían eliminado todos los complejos]. **Ensayo de cuantificación:** se preparó una curva patrón de dilución seriada semilogarítmica de 12 puntos de IgE humana en diluyente de ensayo de suero de ratón MSD al 80 %/PBS 0,01 M al 20 % pH 7,4/BSA al 1 % partiendo de una concentración de 5 µg/ml. Se diluyó la muestra restante de la incubación con perlas 1:5 usando diluyente de ensayo de suero de ratón MSD (MSD N.º de Cat. R52BB-2). Se transfirieron diluciones seriadas de curva patrón y muestras por triplicado a 12 µl/pocillo en pocillos de MSD recubiertos y se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar las placas x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %, se añadieron 12 µl/pocillo de anticuerpo de detección (anticuerpo de conejo anti-IgE humana específico de cadena épsilon Bethyl N.º de Cat. A80-109A, MSD SULFO-marcado usando MSD N.º de Cat. R91AN-1) 1:300 con PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %, después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después de lavar x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 % se añadieron 50 µl/pocillo de tampón T de lectura MSD (4x) con tensioactivo (MSD N.º de Cat. R92TC) 1:2 con Agua MQ. Las placas se leyeron usando un MSD Sector Imager 6000. [Nota: se procesó un ensayo de unión a IgE libre en tándem con este ensayo de cuantificación para ensayar muestras de antes y de después de la incubación con perlas usando el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente, excepto por el uso del anticuerpo de detección de burro a 1: 2000 con PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 % y el uso de un anticuerpo de detección anti-humano para el control positivo E25/Xolair solamente (de cabra anti-IgG humana SULFO-marcado MSD N.º de Cat. R32AJ-5) 1:4000 con PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %]. **Análisis de datos:** se calculó el logaritmo de los datos sin procesar (Píxeles), se representó la curva patrón (ng/ml de concentración logarítmica de IgE humana frente a píxeles logarítmicos) y se aplicó un ajuste de curva de 5 parámetros asimétrico. Se predijeron las concentraciones logarítmicas de IgE de las muestras de ensayo a partir de la curva patrón y posteriormente se calculó el antilogaritmo y se multiplicó por 200 para obtener las concentraciones de IgE libre restantes reales en ng/ml. Para cada muestra y control se calculó el % de disminución en los niveles de IgE humana en comparación con el grupo de control apropiado y se representó frente a IgE humana (ng/ml) añadida originariamente a la muestra de suero, ambos ejes en escala logarítmica para generar una curva de titulación.

**Resultados**

5 Los resultados se resumen en la tabla 5 a continuación. Más específicamente y sorprendentemente, este estudio mostraba que una combinación de conjugaciones de Qbeta con Amarillo y Morado, cuando se administran por la vía intramuscular a una dosis total de 25 microgramos de conjugado (es decir, 12,5 microgramos de conjugado individual) es la más eficaz y era más eficaz que usar el conjugado de cualquier péptido como solo antígeno a dosis doble. Los presentes inventores han demostrado en este estudio que esta combinación induce una respuesta de anticuerpos con una alta capacidad para unirse a IgE libre así como que estos anticuerpos son capaces de reducir los niveles de IgE hasta el 80 % dependiendo de la dosis de exposición a IgE. Estas respuestas de anticuerpos no eran capaces de unirse a IgE unida a receptor y no causaban la desgranulación de células diana que expresaban receptor. Las combinaciones de Qbeta con los adyuvantes alumbre y CPG24555 (en las que todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido son enlaces fosforotioato) eran altamente eficaces para inducir estas respuestas de anticuerpos. En conjunto, puede concluirse que en términos de inducir anticuerpos de IgE de ratón con una fuerte capacidad para unirse a IgE humana libre, el péptido Amarillo es el péptido más prometedor cuando se administra individualmente o en combinación con conjugados de péptido Morado o Naranja, o con conjugados tanto de péptido Morado como de péptido Naranja inoculados en vacunas a alta dosis y alto volumen.

10

15

**Tabla 5** Resumen de datos del Ejemplo 5

	Título recíproco de IgG	Media geométrica del título de unión a IgE (intervalo de confianza del 95%)	Media del máximo de unión a IgE (± desv. típ.)	% de desgranulación (± desv. típ.)	% de disminución en niveles de IgE a 9186 ng/ml (± desv. típ.)	% de disminución en niveles de IgE a 861 ng/ml (± desv. típ.)	% de disminución en niveles de IgE a 81 ng/ml (± desv. típ.)
Amarillo	34125*	2706(1801-4067)	53698 (± 15329)	10 (± 0,3)	15,4% (± 7,5%)	6,4% (± 8,0%)	34,6% (± 3,8%)
Azul	100*	30*	6361*	15 (± 0,5)			
Naranja	100*	95*	11427*	9 (± 0,4)	14,7% (± 6,3%)	10,8% (± 7,1%)	7,2% (± 3,2%)
Morado	29920*	405(118-1389)	30514 (± 12365)	9 (± 0,1)	6,2% (± 4,1%)	0,1% (± 10,4%)	12,6% (± 5,5%)
Azul mejorado	1137*	30*	4228*	9 (± 0,6)			
Morado limitado	6008*	186(63-546)	26194 (± 10443)	9 (± 0,1)			
Amarillo + Naranja	13192*	1048(350-3136)	41202 (± 19176)	10 (± 0,3)	14,3% (± 2,0%)	29,7% (± 4,5%)	14,8% (± 6,4%)
Amarillo + Morado	7793*	6823(400-1165)	48357 (± 11888)	10 (± 0,4)	34,8% (± 2,6%)	60,0% (± 4,5%)	80,3% (± 2,7%)
Azul + Naranja	4424*	30 (30 - 30)	12259(± 3685)	10 (± 0,3)			
Azul + Morado	7146*	500 (266-39)	32333 (± 8934)	11 (± 1,6)			
Azul mejorado + Morado limitado	384*	30*	10490*	12 (± 0,5)			
Naranja, Amarillo, Azul y Morado	8825*	202(91-451)	26745 (± 10920)	11 (± 1,1)			
Azul mejorado + Morado limitado, Naranja, Amarillo	228*	30*	8286*	11 (± 0,3)			
Control de VLP	100*	30 (30-30)	3650 (± 606)	10 (± 0,3)	0,3% (± 4,2%)	0% (± 2,9%)	0% (± 4,4%)
Azul mejorado + Morado limitado, Naranja, Amarillo	14427*	96 (46-198)	16712 (± 4326)	10 (± 0,1)			

	Título recíproco de IgG	Media geométrica del título de unión a IgE (intervalo de confianza del 95%)	Media del máximo de unión a IgE ( $\pm$ desv. tip.)	% de desgranulación ( $\pm$ desv. tip.)	% de disminución en niveles de IgE a 9186 ng/ml ( $\pm$ desv. tip.)	% de disminución en niveles de IgE a 861 ng/ml ( $\pm$ desv. tip.)	% de disminución en niveles de IgE a 81 ng/ml ( $\pm$ desv. tip.)
Azul mejorado + Morado limitado, Naranja, Amarillo (alta dosis)	38128*	316*	24149*	10 ( $\pm$ 0,2)			
Control de VLP (alta dosis)	100*	30*	2829*	10 ( $\pm$ 0,2)			

N/A: no aplicable  
 La dosis de conjugación total es de 25 microgramos, a menos que se administre una alta dosis siendo la dosis total de 50 microgramos por dosis de inyección los días 0, 19, 34  
 Compañero de conjugación = VLP de Qbeta (partícula similar a virus)  
 Adyuvante: 20  $\mu$ g de CPG 24555 (todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato). Alumbre = ALhydrogel™ al 20% v/v  
 \* n = 1 procesamiento en muestras combinadas

**Ejemplo 6. Estudio de hiperinmunización**

Este estudio tenía como objetivo evaluar el efecto de un programa de inmunización rápida para inducción de anticuerpos de alta afinidad contra IgE. Grupos de 8 ratones Balb/c hembra (6-8 semanas de edad) recibieron inyecciones por vía intraperitoneal y subcutánea con los conjugados de péptido-KLH (como se han detallado en el Ejemplo 4 anteriormente) los días 0, 3, 8 y 11. Se usó una combinación de CPG7909 y Alhydrogel (Alumbre al 1,3 % al 20 % v/v) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) como adyuvantes en este estudio. Todos los péptidos se conjugaron con KLH. La necropsia se realizó el día 22 y se recogió sangre como en el Ejemplo 5.

Se investigaron las respuestas de anticuerpos de animales inmunizados usando bien todos o bien algunos de los siguientes ensayos: a) determinación del título de IgG, b) unión a IgE libre en suero, c) unión a IgE unida a FceRI, d) ensayo de desgranulación y e) ensayos de cuantificación de IgE. Todos los ensayos se describen en detalle en el Ejemplo 5.

**Resultados**

La Tabla 6 resume los datos del Ejemplo 6. Los títulos totales en este estudio eran aproximadamente 10 veces menores que en VRS-IgE-008-003. Los datos de este estudio muestran que los péptidos Morado, Morado limitado, Amarillo y Naranja son inmunogénicos. Sorprendentemente, el péptido Azul era un antígeno muy débil y la limitación del péptido y el aumento de la solubilidad mostraron una inmunogenicidad aumentada, mostrando que puede ser necesario limitar este péptido para que muestre una inmunogenicidad aceptable.

**Tabla 6** Resumen de datos del Ejemplo 6

	Media Geométrica del título recíproco de IgG (intervalo de confianza del 95 %)	Título de unión a IgE	Máximo de unión a IgE	% de unión a IgE-FceRI (± desv. típ.)	% de desgranulación (± desv. típ.)
Amarillo	3118 (475-20470)	66*	19740*	4 (± 1,3)	7 (± 0,3)
Azul	100 (100-100)	30*	11337*	4 (±1,1)	7 (± 0,3)
Azul mejorado	30 (0-6030)	30*	8709*	3 (± 0,6)	5 (±0,1)
Naranja	719 (596-868)	30*	7287*	4 (± 0,7)	4 (± 0,2)
Morado	1189 (673-2102)	30*	11103*	3 (± 0,4)	8 (±0,1)
Morado limitado	1996 (1670-2385)	49*	15789*	3 (± 0,7)	8 (± 0,3)
Mezcla de Naranja, Amarillo, Azul y Morado	1665 (1606-1726)	54*	18349*	5 (± 0,7)	8 (± 0,2)
Control de KLH	100 (100-100)	30*	6496*	4 (± 0,6)	9 (± 0,3)

La dosis de conjugación total es de 25 microgramos por inyección.

Dosis los días 0, 3, 8, 11

Compañero de conjugación = KLH

Adyuvante: 20 µg de CPG 7909 (todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato), Alumbre = Alhydrogel™ al 20 % v/v + IFA (adyuvante incompleto de Freund)

\* n = 1 procesamiento en muestras combinadas

**Ejemplo 7. Eficacia de péptidos conjugados con KLH, HBsAg y Qbeta para inducir respuestas de anticuerpos que pueden unirse a IgE humana**

Este estudio tenía como objetivo evaluar cómo eran de eficaces péptidos conjugados con KLH, HBsAg y Qbeta (como se detalla en los Ejemplos 2, 3 y 4 anteriores) para inducir una respuesta de anticuerpos que puedan unirse a IgE humana. Se inyectaron Balb/c hembra (6-8 semanas) por vía intramuscular (volumen de 50 microlitros inyectados en cada músculo *Tibialis anterior*) los días 0, 19 y 34. La necropsia tuvo lugar el día 46. En la necropsia se obtuvieron muestras de sangre de 400-600 microlitros a partir de ratones eutanasiados por punción cardiaca. Se dejó que la sangre coagulara durante una noche y al día siguiente se recogió el suero.

Se investigaron las respuestas de anticuerpos de animales inmunizados usando bien todos o bien algunos de los siguientes ensayos: a) determinación del título de IgG, b) unión a IgE libre en suero, c) unión a IgE unida al FceRI, d) ensayo de desgranulación y e) ensayos de cuantificación de IgE. Todos los ensayos se describen en detalle en el Ejemplo 5.

**Resultados**

5 Este estudio mostraba que los péptidos morado y amarillo eran altamente inmunogénicos. La conjugación del péptido morado con KLH, Qbeta y HBsAg permitía la inducción de altas respuestas de anticuerpos que eran capaces de unirse a IgE libre en un grado muy alto. Estas respuestas de anticuerpos no eran capaces de unirse a IgE unida a receptor y no causaban la desgranulación de células diana que expresaban receptor. Ambos adyuvantes (AbISCO y combinación de CPG 7909 y alumbre) eran eficaces para inducir altos niveles de respuestas de anticuerpos.

**Tabla 7** Resumen de datos del Ejemplo 7

	Media geométrica del título recíproco de IgG (intervalo de confianza del 95%)	Título de unión a IgE ( $\pm$ desv. tip.)	Máximo de unión a IgE ( $\pm$ desv. tip.)	% de unión a IgE-Fc $\epsilon$ RI ( $\pm$ desv. tip.)	% de desgranulación ( $\pm$ desv. tip.)	% de disminución en niveles de IgE a 9186 ng/ml ( $\pm$ desv. tip.)
Amarillo-KLH (AbISCO)	4777 (3115-7327)	175 (71-427)	33914 ( $\pm$ 17977)	9 ( $\pm$ 4)	7 ( $\pm$ 1)	0 % ( $\pm$ 3,6%)
Azul-KLH (AbISCO)	100*	30 (30-30)	4176 ( $\pm$ 1220)	9 ( $\pm$ 3)	7 ( $\pm$ 1)	0 % ( $\pm$ 4,3%)
Azul mejorado (AbISCO)	998*	31 (28-35)	5338 ( $\pm$ 3226)	12 ( $\pm$ 2)	7 ( $\pm$ 0)	0 % ( $\pm$ 7,3%)
Naranja-KLH (AbISCO)	3656*	30 (30-30)	6896 ( $\pm$ 2078)	10 ( $\pm$ 2)	7 ( $\pm$ 1)	0% ( $\pm$ 2,6%)
Morado-KLH (AbISCO)	2765 (1298-5891)	86 (34-215)	23738 ( $\pm$ 16509)	10 ( $\pm$ 2)	7 ( $\pm$ 0)	0% ( $\pm$ 5,8%)
Morado limitado-KLH (AbISCO)	3011 (1518-5972)	100 (31-325)	15716 ( $\pm$ 9038)	10 ( $\pm$ 3)	6 ( $\pm$ 0,4)	0,8 % ( $\pm$ 5,4%)
Control de KLH (AbISCO)	100 (100-100)	30 (30-30)	3399 ( $\pm$ 244)	6 ( $\pm$ 2)	6 ( $\pm$ 1)	0 % ( $\pm$ 8,3%)
Morado-KLH (3 dosis) (AbISCO)	25964 (6713-100415)	335 (80-1405)	29032 ( $\pm$ 18281)	7 ( $\pm$ 0,4)	10 ( $\pm$ 1)	22,6 % ( $\pm$ 2,8%)
Control de KLH (3 dosis) (AbISCO)	424 (289-623)	34 (25-47)	8377 ( $\pm$ 4475)	9 ( $\pm$ 3)	8 ( $\pm$ 1)	0 % ( $\pm$ 4,1%)
Morado-KLH (CPG + Alumbre)	3791 (1493-9626)	113 (40-315)	18207 ( $\pm$ 14530)	11 ( $\pm$ 1)	9 ( $\pm$ 1)	0 % ( $\pm$ 6,5%)
Morado-VLP de Q $\beta$ (CPG + Alumbre)	11286 (4517-28197)	137 (61-305)	23288 ( $\pm$ 16580)	9 ( $\pm$ 4)	6 ( $\pm$ 2)	0 % ( $\pm$ 3,4%)
Morado-VLP de Q $\beta$ (CPG + AbISCO)	3792 (2149- 6690)	478 (142-1608)	39125 ( $\pm$ 19461)	7 ( $\pm$ 3)	7 ( $\pm$ 1)	15,3 % ( $\pm$ 3,8%)
Morado-HBsAg (CPG + Alumbre)	36063 (9378-138680)	2310 (921-5792)	42383 ( $\pm$ 16438)	6 ( $\pm$ 2)	6 ( $\pm$ 2)	9 % ( $\pm$ 4,1%)
Control de Qbeta (CPG + Alumbre)	100*	30 (30-30)	4425 ( $\pm$ 650)	11 ( $\pm$ 1)	8 ( $\pm$ 1)	0 % ( $\pm$ 0,5%)
Control de KLH (CPG + Alumbre)	100*	30 (30-30)	2981 ( $\pm$ 357)	5 ( $\pm$ 1)	7 ( $\pm$ 1)	0 % ( $\pm$ 1,6%)

	Media geométrica del título recíproco de IgG (intervalo de confianza del 95%)	Título de unión a IgE ( $\pm$ desv. típ.)	Máximo de unión a IgE ( $\pm$ desv. típ.)	% de unión a IgE-Fc $\epsilon$ RI ( $\pm$ desv. típ.)	% de desgranulación ( $\pm$ desv. típ.)	% de disminución en niveles de IgE a 9186 ng/ml ( $\pm$ desv. típ.)
Control de Qbeta (CPG + AbISCO)	100 (100-100)	30 (30-30)	4234 ( $\pm$ 278)	13 ( $\pm$ 3)	7 ( $\pm$ 2)	0 % ( $\pm$ 12,1%)
CPG + AbISCO	100 (100-100)	30 (30-30)	1941 ( $\pm$ 588)	2 ( $\pm$ 1)	5 ( $\pm$ 1)	0 % ( $\pm$ 7,8%)

La dosis de conjugación total es de 25 microgramos por inyección

Dosis los días 0, 21

Compañero de conjugación = KLH, VLP de Q beta o HbsAg

Ayudante: 20  $\mu$ g de CPG 24555 (todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato) + alumbre = Alhydrogel™ al 20% v/v o 12  $\mu$ g de AbISCO

### Ejemplo 8: combinación de inmunógenos peptídicos en KLH

5 Este estudio tenía como objetivo evaluar cómo era de eficaz una combinación de péptidos conjugados con KLH (como se ha detallado en el Ejemplo 4 anterior) para inducir una respuesta de anticuerpos que puedan unirse a IgE humana. Balb/c hembra (6-8 semanas) recibieron inyecciones por vía intramuscular (volumen inyectado de 50 microlitros en cada músculo *Tibialis anterior*) los días 0, 19 y 34. La necropsia tuvo lugar el día 46. En la necropsia se obtuvieron muestras de sangre de 400-600 microlitros a partir de ratones eutanasiados por punción cardiaca. Se dejó que la sangre coagulara durante una noche y al día siguiente se recogió el suero.

10 Se investigaron las respuestas de anticuerpos de animales inmunizados para el uso en todos o algunos de los siguientes ensayos: a) determinación de título de IgG, b) unión a IgE libre en suero, c) unión a Ig unida a Fc $\epsilon$ RI, d) ensayo de desgranulación y e) ensayos de cuantificación de IgE. Todos los ensayos se describen en detalle en el Ejemplo 5.

### Resultados

15 Este estudio mostraba que una combinación de Amarillo y Naranja, Azul y Morado, Amarillo y Morado es altamente inmunogénica e induce respuestas de anticuerpos que pueden unirse eficazmente a IgE libre a pesar de las bajas dosis usadas en este estudio debido a la cantidad limitada de péptidos disponible. Estas respuestas de anticuerpos no eran capaces de unirse a IgE unida a receptor y no causaban la desgranulación de células diana que expresaban receptor.

**Tabla 8** Resumen de los datos del Ejemplo 8

	Título recíproco de IgG	Media geométrica del título de unión a IgE (intervalo de confianza del 95 %)	Máximo de unión a IgE ( $\pm$ desv. típ.)	% de unión a IgE-Fc $\epsilon$ RI ( $\pm$ desv. típ.)	% de desgranulación ( $\pm$ desv. típ.)
Amarillo + Naranja	15063*	60 (39-93)	10793 ( $\pm$ 6959)	4 ( $\pm$ 3)	10 ( $\pm$ 0,2)
Azul + Morado	23670*	220 (124-391)	21928 ( $\pm$ 11019)	2 ( $\pm$ 1)	9 ( $\pm$ 0,3)
Amarillo + Morado	22560*	415 (307-561)	35473 ( $\pm$ 12824)	3 ( $\pm$ 2)	9 ( $\pm$ 0,7)
Azul + Naranja	8876*	38 (31-46)	6861 ( $\pm$ 3428)	3 ( $\pm$ 1)	9 ( $\pm$ 0,2)
Péptidos Peng	14229*	107 (81-142)	17931 ( $\pm$ 5715)	2 ( $\pm$ 1)	10 ( $\pm$ 0,2)
Control de ayudante	100*	30 (30-30)	1897 ( $\pm$ 232)	11 ( $\pm$ 13)	9 ( $\pm$ 0,4)

Dosis de amarillo: 16 microgramos por dosis
Dosis de naranja: 20,3 microgramos por dosis
Dosis de azul: 0,5 microgramos por dosis
Dosis de morado: 25,3 microgramos por dosis
Dosis los días 0, 21
Compañero de conjugación = KLH
Adyuvante: 12 ug de AbISCO

### Ejemplo 9: eficacia de vacuna de conjugado para romper la tolerancia *in vivo* (modelo animal)

5 La capacidad de vacunas de péptido de IgE para reducir los niveles de IgE *in vivo* se evaluó en modelos animales, usando especies que expresan de forma natural niveles de IgE aumentados (por ejemplo por alergias) o induciendo niveles de IgE aumentados experimentalmente usando alérgenos de modelo o reales para inmunizar animales. Por ejemplo, se inmunizaron ratones con ovoalbúmina sin endotoxina (OVA) como un antígeno de modelo formulado con alumbre para inducir una respuesta de IgE contra OVA (referencia ejemplar Lloyd C y col, J, Immunol 2001, 166, págs. 2033-2040). Después de la inducción de respuestas de IgE los ratones se vacunan con péptidos antigénicos acoplados a vehículo y formulados con adyuvantes. Pueden usarse péptidos de regiones homólogas de la IgE de ratón (en ratones), regiones homólogas de otras especies en especies animales respectivas, así como péptidos de IgE humanos para primates no humanos. La eficacia de las vacunaciones para disminuir los niveles de IgE puede controlarse después midiendo los niveles de IgE en sueros pre- y post-vacunación. Además, la capacidad de los péptidos para disminuir respuestas inflamatorias alérgicas puede controlarse por exposición de ratones a OVA intranasal o intratraqueal (por ejemplo, a lo largo de 2-5 días secuenciales) y evaluación de la respuesta inflamatoria alérgica en los pulmones por recuento de infiltración de subconjuntos de leucocitos en muestras de lavado pulmonar y por evaluación histológica del reclutamiento de eosinófilos hacia el parénquima pulmonar así como de la metaplasia de células caliciformes y de la producción de moco (por ejemplo, Coyle A. y col, 1996 J, Exp, Med, 183, 1303-1310).

### 20 Ejemplo 10: eficacia e idoneidad de péptidos lineales y limitados químicamente conjugados con Qbeta o HbsAg en la inducción de anticuerpos que puedan unirse a IgE humana

25 Uno de los desafíos de usar péptidos lineales cortos como inmunógenos para inducir respuestas anti-IgE es representar con exactitud la estructura secundaria de IgE, asegurando de este modo que los anticuerpos generados por la vacunación reconozcan eficazmente IgE circulante, libre. La limitación química para introducir una estructura secundaria adecuada en las secuencias de aminoácidos precursoras lineales puede proporcionar inmunógenos alternativos para inducir respuestas de anticuerpos contra IgE.

30 El análisis de la estructura tridimensional de los dominios C<sub>ε</sub>3C<sub>ε</sub>4 de la IgE presente en PDB 1F6A (Garman y col, 2000 Nature 406: págs. 259-266) pusieron de manifiesto que algunas de las secuencias diana en la interfaz entre C<sub>ε</sub>3C<sub>ε</sub>4 y el receptor FC<sub>ε</sub>RI adoptan disposiciones no lineales que pueden no estar bien representadas por las secuencias lineales detalladas en la tabla 9. Por lo tanto se identificaron secuencias que eran candidatas para limitación química en un intento por evaluar la capacidad de péptidos limitados para inducir anticuerpos anti-IgE (después de la administración *in vivo*) detectables en un ensayo de unión a IgE libre.

35 Se limitaron por separado variantes de las secuencias tanto de Amarillo (SEC ID N.º: 220) como de Naranja + Cisteína (SEC ID N.º: 436) mediante dos procedimientos diferentes: un procedimiento implicaba el uso de química "clic" para introducir un resto triazol al otro lado de dos átomos adyacentes de la secuencia peptídica. El grado de limitación ejercida sobre la secuencia peptídica mediante este procedimiento puede ajustarse por adición de grupos metileno al resto triazol (se produjeron mediante este procedimiento Naranja 046, Naranja 047, Amarillo 043, Amarillo 044). El segundo procedimiento implicaba ciclación a través del efecto de plantilla de una unidad de diprolina heteroquiral (D-Pro-L-Pro) que se señala en la bibliografía que tiene potencial inductor de giros β (Spath y col, 1998, Helvetica Chimica Acta 81, págs. 1726-1738); (se produjeron mediante este procedimiento Naranja 044, Naranja 045, Amarillo 040, Amarillo 041, Amarillo 042). Se presentan en la Tabla 9 las estructuras químicas de estos péptidos limitados.

40 Se realizaron varios estudios para evaluar la inducción de respuestas inmunes anti-IgE humana bien por péptidos lineales o bien por péptidos limitados de diferente longitud conjugados con HBsAg y Qbeta (conjugaciones como se detallan en los Ejemplos 2 y 3).

45 Los péptidos limitados Naranja + Cisteína (SEC ID N.º: 436), Amarillo (SEC ID N.º: 220), Naranja 044, Naranja 045, Naranja 046, Naranja 047, Amarillo 040, Amarillo 041, Amarillo 042, Amarillo 043 y Amarillo 044 se conjugaron con partículas similares a virus de Qbeta usando química de succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato (SMPH) a un exceso molar 1,5X y se usaron como inmunógenos en ratones. Balb/c hembra (6-8 semanas) recibieron inyecciones por vía intramuscular (50 μl inyectados en cada músculo *Tibialis anterior*) con antígeno y adyuvantes Alhydrogel más CpG-24555 (todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato) los días que se describen a continuación en la Tabla 9. Los sueros preparados 1 semana después del refuerzo final se ensayaron para determinar la actividad de anticuerpos anti-IgE en el ensayo de unión a IgE como se ha descrito en el Ejemplo 5.

**Resultados**

Los estudios resumidos en la Tabla 9 mostraban que los péptidos lineales derivados de los péptidos morado, naranja y amarillo conjugados con Qbeta y HBsAg y suministrados con los adyuvantes combinados Alhydrogel y CpG24555 inducían respuestas de anticuerpos que eran capaces de unirse a IgE libre.

- 5 Además, los inmunógenos peptídicos más limitados inducían antisueros capaces de unirse a IgE humana libre. Sorprendentemente el Azul, 003, 004 y 005 solo inducía respuestas anti-IgE débiles. Naranja 047 y Naranja 048 no inducían anticuerpos anti-IgE, por encima de los niveles de fondo.

**Tabla 9** Resumen de los datos del Ejemplo 10

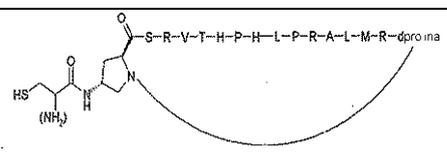
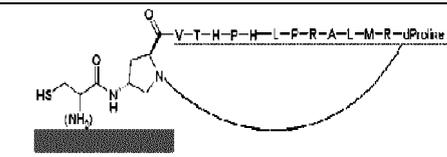
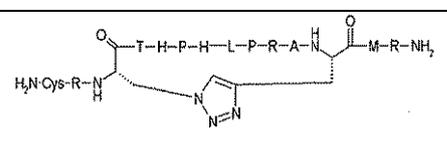
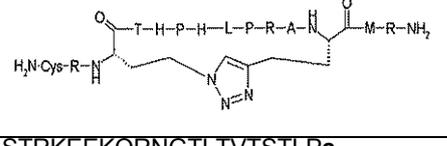
<b>Secuencia</b>	<b>Nombre</b>	<b>Media de máximos de unión a IgE (± desv. típ.)</b>
ADSNPRGVSAAYLSRPSPc*	MORADO 001	12018 (± 6900)
ADSNPRGVSAAYLSRPSPc*	MORADO 001	17809 (± 8042)
ADSNPRGVSAAYLSRPSPggc**	MORADO 003	33548 (± 19309)
<b>cgg</b> ADSNPRGVSAAYLSRPSP**	MORADO 004	30400 (± 27654)
ADSNPRGVggc**	MORADO 005	3707 (± 286)
ADSNPRGVSAAYLSRPSPggc	MORADO 014	5737 (± 1954)
ADSNPRGVSAAYLSRPSPggc*	MORADO 015	9097 (± 3135)
ADSNPRGVSAAYLSRPSPggc	MORADO 015	7602 (± 3104)
ADSNPRGVSAAYLSRPggc	MORADO 016	6087 (± 1176)
ADSNPRGVSAAYLSRggc*	MORADO 017	9453 (± 2650)
ADSNPRGVSAAYLSRggc	MORADO 017	19078 (± 17703)
ADSNPRGVSAAYLSggc	MORADO 018	5717 (± 2531)
ADSNPRGVSAAYLggc	MORADO 019	5507 (± 273)
ADSNPRGVSAAYggc	MORADO 020	4742 (± 601)
ADSNPRGVSAggc*	MORADO 021	13890 (± 9311)
ADSNPRGVSAggc	MORADO 021	9028 (± 10144)
ADSNPRGVSPggc	MORADO 022	4701 (± 414)
ADSNPRGVggc	MORADO 023	5169 (± 494)
ADSNPRGggc	MORADO 024	4256 (± 480)
ADSNPRggc	MORADO 025	4679 (± 541)
ADSNPggc	MORADO 026	4969 (± 393)
DSNPRGVSAAYLSRPSPggc*	MORADO 027	10197 (± 5102)
DSNPRGVSAAYLSRPSPggc*	MORADO 027	9047 (± 1509)
SNPRGVSAAYLSRPSPggc*	MORADO 028	12685 (± 5655)
NPRGVSAAYLSRPSPggc*	MORADO 029	19549 (± 10976)
NPRGVSAAYLSRPSPggc*	MORADO 029	10323 (± 7495)
PRGVSAAYLSRPSPggc*	MORADO 030	7485 (± 1494)
RGVSAAYLSRPSPggc*	MORADO 031	29423 (± 42261)
RGVSAAYLSRPSPggc*	MORADO 031	9595 (± 3569)
GVSAYLSRPSPggc*	MORADO 032	9102 (± 3114)

ES 2 622 562 T3

Secuencia	Nombre	Media de máximos de unión a IgE (± desv. tip.)
GVSAYLSRPSPggc*	MORADO 032	9137 (± 6945)
VSAYLSRPSPggc*	MORADO 033	8901 (± 2718)
VSAYLSRPSPggc*	MORADO 033	8249 (± 3741)
SAYLSRPSPggc*	MORADO 034	11229 (± 11683)
SAYLSRPSPggc*	MORADO 034	9347 (± 9239)
AYLSRPSPggc*	MORADO 035	8132 (± 652)
AYLSRPSPggc*	MORADO 035	7360 (± 1660)
YLSRPSPggc*	MORADO 036	8139 (± 1924)
YLSRPSPggc*	MORADO 036	6872 (± 1239)
cggDSNPRGVSAAYLSRPSP*	MORADO 037	6358 (± 1702)
cggDSNPRGVSAAYLSRPSP*	MORADO 037	8767 (± 3064)
egg SN PRGVSAAYLSRPSP*	MORADO 038	6470 (± 1666)
cggNPRGVSAAYLSRPSP*	MORADO 039	7835 (± 3446)
cggNPRGVSAAYLSRPSP*	MORADO 039	8783 (± 3331)
cggPRGVSAAYLSRPSP*	MORADO 040	10233 (± 7119)
cggRGVSAAYLSRPSP*	MORADO 041	11954 (± 11540)
cggRGVSAAYLSRPSP*	MORADO 041	6544 (± 1341)
cggGVSAAYLSRPSP*	MORADO 042	4931 (± 1274)
cggGVSAAYLSRPSP*	MORADO 042	5392 (± 1608)
cggVSAAYLRPS*	MORADO 043	6418 (± 816)
cggVSAAYLRPS*	MORADO 043	3447 (± 970)
cggSAYLSRPSP*	MORADO 044	6328 (± 2224)
cggSAYLSRPSP*	MORADO 044	5584 (± 1328)
cggAYLSRPSP*	MORADO 045	5870 (± 1647)
cggAYLSRPSP*	MORADO 045	5716 (± 1510)
cggYLSRPSP*	MORADO 046	6228 (± 1102)
cggYLSRPSP*	MORADO 046	5947 (± 1042)
cggADSNPRGVSAAYLRPS*	MORADO 047	9446 (± 3755)
cggADSNPRGVSAAYLRPS*	MORADO 047	6658 (± 3006)
cggADSNPRGVSAAYLRP*	MORADO 048	14972 (± 16875)
cggADSNPRGVSAAYLRP*	MORADO 048	10134 (± 12441)
cggADSNPRGVSAAYLSR*	MORADO 049	4949 (± 835)
cggADSNPRGVSAAYLSR*	MORADO 049	5183 (± 615)
cggADSNPRGVSAAYLS*	MORADO 050	5903 (± 1790)
cggADSNPRGVSAAYLS*	MORADO 050	4934 (± 793)
cggADSNPRGVSAAYL*	MORADO 051	6060 (± 479)

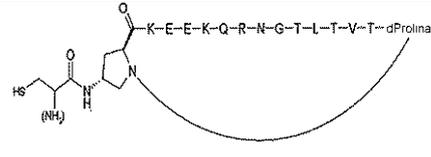
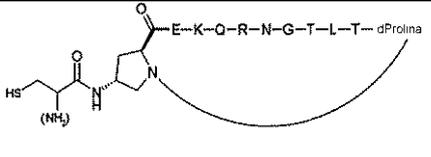
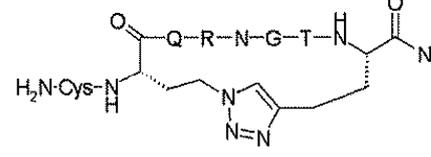
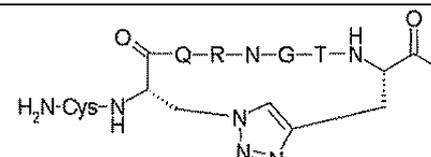
ES 2 622 562 T3

Secuencia	Nombre	Media de máximos de unión a IgE (± desv. tip.)
<b>cgg</b> ADSNPRGV SAYL*	MORADO 051	4566 (± 1162)
<b>cgg</b> ADSNPRGV SAY*	MORADO 052	7496 (± 5251)
<b>cgg</b> ADSNPRGV SA*	MORADO 053	5406 (± 1117)
<b>cgg</b> ADSNPRGV SA*	MORADO 053	5534 (± 527)
<b>cgg</b> ADSNPRGV S*	MORADO 054	5952 (± 722)
<b>cgg</b> ADSNPRGV*	MORADO 055	6536 (± 1019)
<b>cgg</b> ADSNPRGV*	MORADO 055	8022 (± 8108)
<b>cgg</b> AYLSRPSPFDL FIRKS*	MORADO 056	45475 (± 18743)
<b>cgg</b> AYLSRPSPFDL*	MORADO 057	5726 (± 1757)
<b>cgg</b> AYLSRPSPFDL*	MORADO 057	6185 (± 1002)
QCRVTHPHLPRALMRS	AMARILLO 001	7193 (± 1900)
QCRVTHPHLPRALMRS	AMARILLO 001	6482 (± 1531)
QCRVTHPHLPRALMRS	AMARILLO 001	8544 (± 3058)
QCRVTHPHLPRALMRS <sup>^</sup>	AMARILLO 001	51567 (± 32315)
QCRVTHPHLPRALMRS*	AMARILLO 001	6449 (± 3586)
QCRVTHPHLPRALMRS <sup>^^</sup>	AMARILLO 001	46265 (± 15556)
RVTHPHLPRALMRS <b>ggc</b> **	AMARILLO 002	60067 (± 51724)
<b>cgg</b> RVTHPHLPRALMRS **	AMARILLO 003	67569 (± 22134)
RVTHPHLPRALMR <b>ggc</b>	AMARILLO 009	8350 (± 4658)
RVTHPHLPRALMR <b>ggc</b> *	AMARILLO 009	29546 (± 10133)
RVTHPHLPRALM <b>ggc</b>	AMARILLO 010	11706 (± 8804)
RVTHPHLPRALM <b>ggc</b> *	AMARILLO 010	27517 (± 13701)
RVTHPHLPRAL <b>ggc</b>	AMARILLO 011	7570 (± 1980)
RVTHPHLPRAL <b>ggc</b>	AMARILLO 012	6695 (± 601)
<b>cgg</b> RVTHPHLPRALMR	AMARILLO 013	7500 (± 1440)
<b>cgg</b> RVTHPHLPRALM	AMARILLO 014	9790 (± 3374)
<b>cgg</b> RVTHPHLPRALM*	AMARILLO 014	27898 (± 8203)
<b>cgg</b> RVTHPHLPRALM	AMARILLO 014	25321 (± 21324)
<b>cgg</b> RVTHPHLPRAL	AMARILLO 015	5312 (± 890)
<b>cgg</b> RVTHPHLPRAL	AMARILLO 016	8679 (± 5297)
<b>cgg</b> RVTHPHLPRAL*	AMARILLO 016	13419 (± 4677)
RVTHPHLPRALMRS <b>ggc</b>	AMARILLO 017	12415 (± 7279)
RVTHPHLPRALMR <b>ggc</b> *	AMARILLO 017	15306 (± 5774)
VTHPHLPRALMRS <b>ggc</b>	AMARILLO 018	4842 (± 824)
THPHLPRALMRS <b>ggc</b>	AMARILLO 019	6766 (± 2621)
<b>cgg</b> RVTHPHLPRALMRS	AMARILLO 020	12381 (± 5181)

Secuencia	Nombre	Media de máximos de unión a IgE (± desv. tip.)
<b>cggRVTHPHLPRALMRS*</b>	AMARILLO 020	21246 (± 14412)
<b>cggVTHPHLPRALMRS</b>	AMARILLO 021	7082 (± 2453)
<b>cggTHPHLPRALMRS</b>	AMARILLO 022	4941 (± 536)
<b>VTHPHLPRALggc</b>	AMARILLO 024	4655 (± 1022)
<b>THPHLPRAggc</b>	AMARILLO 025	7201 (± 4374)
<b>cggVTHPHLPRAL</b>	AMARILLO 027	6952 (± 2459)
<b>cggVTHPHLPRA</b>	AMARILLO 028	6045 (± 1431)
<b>QCRVTHPHLPSALMSS*</b>	AMARILLO 029	5281 (± 358)
<b>QCRVTHPHLPRALMSS*</b>	AMARILLO 030	6486 (± 1954)
<b>QCRVTHPHLPSALMRS*</b>	AMARILLO 031	5637 (± 1069)
<b>QCRVTHPHLP-Cit-ALM-Cit-S*</b>	AMARILLO 032	5090 (± 501)
<b>QCRVTHPHLPRALM-Cit-S*</b>	AMARILLO 033	5641 (± 801)
<b>QCRVTHPHLP-Cit-ALMRS*</b>	AMARILLO 034	6528 (± 1437)
<b>cddddRVTHPHLPRALMRS^</b>	AMARILLO 035	38979 (± 20434)
<b>cddddRVTHPHLPRALM^</b>	AMARILLO 036	25851 (± 15732)
<b>cddddVTHPHLPRALMRS^</b>	AMARILLO 037	18637 (± 6978)
<b>cddddVTHPHLPRALM^</b>	AMARILLO 038	15365 (± 2986)
<b>Cyc-QCRVTHPHLPRALMRS-DPro-LPro-Cyc</b>	AMARILLO 040	35761 (± 6293)
	AMARILLO 041	55855 (± 19382)
	AMARILLO 042	31595 (± 9368)
	AMARILLO 043	19465 (± 14660)
	AMARILLO 044	11435 (± 8674)
<b>STRKEEKQRNGTLTVTSTLPc</b>	NARANJA 001	5295 (± 645)
<b>STRKEEKQRNGTLTVTSTLPc</b>	NARANJA 001	8754 (± 2808)
<b>STRKEEKQRNGTLTVTSTLPc</b>	NARANJA 002	5074 (± 336)
<b>STRKEEKQRNGTLTVTSTLPggc^A^</b>	NARANJA 002	6715 (± 1063)
<b>STRKEEKQRNGTLTVTSTLPggc^A</b>	NARANJA 002	8448 (± 2700)

ES 2 622 562 T3

Secuencia	Nombre	Media de máximos de unión a IgE ( $\pm$ desv. tip.)
STRKEEKQRNGTLTVTSTLPggc**	NARANJA 002	14637 ( $\pm$ 13062)
cggSTRKEEKQRNGTLTVTSTLP**	NARANJA 003	5747 ( $\pm$ 3695)
kggCQRNGTC	NARANJA 004	6121 ( $\pm$ 2590)
kggCQRNGTC**	NARANJA 004	3621 ( $\pm$ 238)
kggCEE-Cit-QRNGTLVC	NARANJA 005	6035 (+711)
kggCEE-Cit-QRNGTLVC**	NARANJA 005	3807 ( $\pm$ 681)
STRKEEKQRNGTLTVTSTggc	NARANJA 008	5778 ( $\pm$ 1059)
STRKEEKQRNGTLTVTSggc	NARANJA 009	5822 ( $\pm$ 953)
STRKEEKQRNGTLTVTggc	NARANJA 010	5493 ( $\pm$ 860)
STRKEEKQRNGTLTVggc	NARANJA 011	5727 ( $\pm$ 720)
STRKEEKQRNGTLTggc	NARANJA 012	5210 ( $\pm$ 891)
STRKEEKQRNGTLggc	NARANJA 013	5854 ( $\pm$ 861)
cggSTRKEEKQRNGTLTVTST	NARANJA 014	5661 ( $\pm$ 770)
cggSTRKEEKQRNGTLTVTS	NARANJA 015	5613 ( $\pm$ 962)
cggSTRKEEKQRNGTLTVT	NARANJA 016	5452 ( $\pm$ 772)
cggSTRKEEKGRNGTLTV	NARANJA 017	6362 ( $\pm$ 1950)
cggSTRKEEKQRNGTLT	NARANJA 018	5277 ( $\pm$ 578)
cggSTRKEEKQRNGTL	NARANJA 019	7611 ( $\pm$ 4748)
TRKEEKQRNGTLTVTSTggc	NARANJA 021	5282 ( $\pm$ 603)
RKEEKQRNGTLTVTSTggc	NARANJA 022	5262 ( $\pm$ 575)
KEEKQRNGTLTVTSTggc	NARANJA 023	6344 ( $\pm$ 1990)
EEKQRNGTLTVTSTggc	NARANJA 024	5005 ( $\pm$ 773)
EKGRNGTLTVTSTggc	NARANJA 025	5173 ( $\pm$ 882)
cggTRKEEKQRNGTLTVTST^	NARANJA 027	7344 ( $\pm$ 1926)
cggRKEEKQRNGTLTVTST^	NARANJA 028	7768 ( $\pm$ 1821)
cggKEEKQRNGTLTVTST^	NARANJA 029	7374 ( $\pm$ 1985)
cggEEKQRNGTLTVTST^	NARANJA 030	7187 ( $\pm$ 5429)
cggEKQRNGTLTVTST^	NARANJA 031	8397 ( $\pm$ 3778)
TRKEEKQRNGTLTVTSggc^	NARANJA 033	9604 ( $\pm$ 4122)
RKEEKQRNGTLTVTggc^	NARANJA 034	9805 ( $\pm$ 5228)
KEEKQRNGTLTVggc^	NARANJA 035	7339 ( $\pm$ 2516)
EEKQRNGTLTggc^	NARANJA 036	9965 ( $\pm$ 5327)
EKQRNGTLggc	NARANJA 037	4607 ( $\pm$ 332)
cggTRKEEKQRNGTLTVTS	NARANJA 039	7214 ( $\pm$ 1842)
cggRKEEKGRNGTLTVP	NARANJA 040	6500 ( $\pm$ 2302)
cggKEEKGRNGTLTV	NARANJA 041	6973 ( $\pm$ 2437)

Secuencia	Nombre	Media de máximos de unión a IgE (± desv. típ.)
<b>cggEEKQRNGTLT</b>	NARANJA 042	8758 (± 3602)
<b>Cyc-STRKEEKQRNGTLTVTSTLPC-DPro-Lpro</b>	NARANJA 044	ND
	NARANJA 045	5826 (± 2164)
	NARANJA 046	7991 (± 4270)
	NARANJA 047	2528 (± 656)
	NARANJA 048	2506 (± 515)
<b>LWDLAPSKGTVNggc**</b>	AZUL 003	4684 (± 796)
<b>cggLWDLAPSKGTVN**</b>	AZUL-004	8010 (± 6572)
<b>cggGGSDLAPSKGTVSGGggc**</b>	AZUL-005	3777 (± 525)
N/A	VLP de Qb desnuda	6132 (± 491)
N/A	VLP de Qb desnuda	3922 (± 647)
N/A	VLP de Qb desnuda	4830 (± 323)
N/A	VLP de Qb desnuda	4935 (± 540)
N/A^	VLP de Qb desnuda	7550 (± 1723)
N/A*	VLP de Qb desnuda	6393 (± 830)
N/A	VLP de Qb desnuda	3779 (± 403)
N/A**	Alumbre CpG 24555	5098 (± 2925)
N/A**	HBsAg desnuda	3724 (± 434)

La dosis de conjugado total es de 25 microgramos por inyección administrada dos veces por vía intramuscular en ratones BALB/c hembra los días 0 y 14 aparte de los grupos marcados por \* que se dosificaron con una dosis de conjugación de 50 microgramos y los grupos marcados con ^ que se dosificaron 3 veces los días 0, 14 y 28. Los péptidos limitados y grupos marcados con ^^ se dosificaron 3 veces los días 0, 21 y 42.

Compañero de conjugación = VLP de Q beta o HBsAg (marcado con \*\*)

Adyuvante: 20 µg de CPG 24555 (todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato) + Alhydrogel™ al 20 % v/v.

ND = No realizado

Nota - **c**, **cgg**, **gcc**, **cdddd** y **kgg** son engarces añadidos a secuencias peptídicas de IgE para fines de conjugación.

### Ejemplo 11: eficacia de los péptidos conjugados con Qbeta, HBsAg y DT en la inducción de una respuesta de anticuerpos que puedan unirse a IgE humana

- 5 Este estudio tenía como objetivo evaluar cómo eran de eficaces péptidos conjugados con una diversidad de vehículos tales como DT, CRM197, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, HBsAg y Qbeta (como se han detallado en los ejemplos anteriores) en la inducción de una respuesta de anticuerpos que puedan unirse a IgE humana. Para la generación de conjugados con DT se derivatizó toxina diftérica (concentración de 3 mg/ml) con succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato (SMPH, Thermo Fisher Scientific Inc) a un exceso molar de 10 veces. Después de esta etapa de activación, se eliminó el reactivo SMPH en exceso usando una columna de desalinización NAP-25 (GE Healthcare) en Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco (DPBS) con EDTA 5 mM. Después se añadió sólido de péptido liofilizado directamente al toxoide diftérico activado con maleimida y se incubó con mezcla suave durante 90 minutos. Después de lo cual la muestra se aplicó a una columna de desalinización NAP-25 (GE Healthcare) y se eluyó en Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco (DPBS) para eliminar el péptido libre. Después de esto, la solución de proteína se concentró usando microconcentradores de centrífuga de 10 kD y se esterilizó usando un filtro de 0,22 µm y se mantuvo a -80°C hasta el uso. Se produjeron conjugados Qb-péptido y HbsAg-péptido de la forma siguiente: se activaron VLP (tanto Qβ como HBsAg) usando reactivo de enlace de éster de N-gamma-maleimido-butililoxi-succinimida (GMBS) o succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato(SMPH), obteniéndose ambos de Thermo Fisher Scientific Inc. El reactivo GMBS o SMPH se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a la solución de VLP a un exceso molar de ≥5 veces. Se dejó que la reacción de activación se desarrollara durante ≥30 minutos y después la solución se desalinizó usando una columna de desalinización NAP-25 (GE Healthcare) en Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco (DPBS) con EDTA 5 mM. Después de esto, se añadió una cantidad apropiada de péptido liofilizado sólido directamente a la VLP activada con maleimida y se dejó que se desarrollara la reacción entre las VLP y los péptidos durante al menos treinta minutos con agitación muy suave. Al final del tiempo de reacción cada muestra se desalinizó en PBS de Dulbecco (DPBS) usando columnas de desalinización NAP-25 (GE Healthcare). Los péptidos conjugados desalinizados se analizaron para determinar el contenido de proteína usando el ensayo de Bradford (azul brillante de Coomassie, Thermo Fisher Scientific Inc,) o el ensayo de proteína de BCA (ácido bicinónico, Thermo Fisher Scientific Inc.), así como mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaño.
- 30 Balb/c hembra (6-8 semanas) recibieron inyecciones por vía intramuscular (50 µl inyectados en cada músculo *Tibialis anterior*) con péptidos conjugados con Qbeta, antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) o toxoide diftérico (DT) con adyuvantes Alhydrogel más CpG los días 0, 19 y 34 como se describe a continuación en la Tabla 10. Sueros preparados 1 semana después del refuerzo final se ensayaron para determinar la actividad de anticuerpos anti-IgE en el ensayo de unión a IgE como se describe en el Ejemplo 5. Las respuestas se muestran en la Tabla 10.

### Resultados

Este estudio (Tabla 10) mostraba que los péptidos MORADO 001 y AMARILLO 001 (secuencias que se muestran en la Tabla 9) podían inducir anticuerpos anti-IgE humana cuando se conjugaban con DT, Qbeta o HbsAg. Se indujeron anticuerpos anti-IgE humana usando el engarce de GMBS o el engarce de SMPH.

40 **Tabla 10.** Resumen de los datos del Ejemplo 11

Ag Peptídico + Vehículo	Dosis de conjugado total (microgramos)	Densidad de epítipo (péptido por monómero o equivalente)	Media de máximos de unión a IgE (± desv. típ.)
AMARILLO 001 VLP de Qbeta (GMBS)	50	~0,5	5421 (± 624)
MORADO 001 VLP de Qbeta (GMBS)	50	~0,5	4465 (±199)
AMARILLO 001 VLP de Qbeta	50	~0,5	13792 (± 5544)

Ag Peptídico + Vehículo	Dosis de conjugado total (microgramos)	Densidad de epítotope (péptido por monómero o equivalente)	Media de máximos de unión a IgE (± desv. típ.)
(SMPH)			
AMARILLO 001 VLP de Qbeta (SMPH)	50	~1,0	37108 (± 13782)
AMARILLO 001 VLP de Qbeta (SMPH)	5	>1,5	37742 (± 7018)
AMARILLO 001 VLP de Qbeta (SMPH)	50	>1,5	34802 (± 13636)
MORADO 001 VLP de Qbeta (SMPH)	50	~0,5	10653 (± 2915)
MORADO 001 VLP de Qbeta (SMPH)	50	~1,0	29546 (± 10133)
MORADO 001 VLP de Qbeta (SMPH)	5	>1,5	27517 (± 13701)
MORADO 001 VLP de Qbeta (SMPH)	50	>1,5	27898 (± 8203)
AMARILLO 001 HBsAg (SMPH)	5	>1,5	13419 (± 4677)
AMARILLO 001 HBsAg (SMPH)	50	>1,5	15306 (± 5774)
MORADO 001 HBsAg (SMPH)	5	>1,5	21246 (± 14412)
MORADO 001 HBsAg (SMPH)	50	>1,5	11484(± 7349)
AMARILLO 001 DT (SMPH)	50	>1,5	9038 (± 2209)
AMARILLO 001 DT (SMPH)	50	>1,5	11484 (± 2097)
MORADO 001 DT (SMPH)	5	>1,5	13052 (± 4841)
MORADO 001 DT (SMPH)	50	>1,5	17762 (± 9906)
Control de Qbeta	50	N/A	5646 (± 105)
Control de HbSAg	50	N/A	5781 (± 346)
Control de DT	50	N/A	5181 (± 840)

Se inmunizaron ratones Balb/c hembra los días 0 y 14. Se recogieron sueros y se analizaron el día 21. Compañero de conjugación = VLP de Qbeta, DT o HBsAg (como por la tabla anterior) usando SMPH y GMBS como se han descrito en la tabla anterior. Adyuvante: 20 µg de CPG 24555 (todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato) + Alhydrogel™ al 20 % v/v.

Tabla 11. Resumen de los datos del Ejemplo 12

Ag Peptídico (véanse las secuencias en la Tabla 9)	ADYUVANTES	Máximo de unión a IgE después de la 2ª dosis: Media (± desv. típ.)	Máximo de unión a IgE después de la 3ª dosis: Media (± desv. típ.)	% de desgranulación después de la 3ª dosis (± desv. típ.)	% de disminución en los niveles de IgE después de la 3ª dosis (± desv. típ.)
MORADO 014 <sup>^</sup>	ALUMBRE	25051 (± 7485)	40132 (± 7125)	9,5 (2,1)	-15,53 (13,27)
MORADO 014 <sup>*</sup>	ALUMBRE	35825 (± 8690)	39276 (± 15943)	9,7 (2)	-10,75 (12,32)
AMARILLO 001 <sup>^</sup>	ALUMBRE	46380 (± 15316)	47442 (± 8052)	12,9 (5,6)	0,619 (12,46)
AMARILLO 001 <sup>*</sup>	ALUMBRE	49695 (± 13050)	44900 (± 13597)	10,4 (2,5)	-8,27 (7,6)
AMARILLO 014 <sup>^</sup>	ALUMBRE	22800 (± 12361)	47982 (± 28244)	ND	ND

ES 2 622 562 T3

Ag Peptídico (véanse las secuencias en la Tabla 9)	ADYUVANTES	Máximo de unión a IgE después de la 2ª dosis: Media (± desv. típ.)	Máximo de unión a IgE después de la 3ª dosis: Media (± desv. típ.)	% de desgranulación después de la 3ª dosis (± desv. típ.)	% de disminución en los niveles de IgE después de la 3ª dosis (± desv. típ.)
AMARILLO 014*	ALUMBRE	24976 (± 8424)	28969 (± 6456)	ND	ND
MORADO 014 <sup>^</sup> + AMARILLO 001 <sup>^</sup>	ALUMBRE	55655 (± 20653)	58342 (± 14712)	9,5 (1,5)	33,23 (49,96)
MORADO 014* + AMARILLO 001*	ALUMBRE	79572 (± 22961)	71068 (± 19829)	10,1 (2,1)	18,8 (31,9)
MORADO 014 <sup>^</sup> + AMARILLO 014 <sup>^</sup>	ALUMBRE	47695 (± 10489)	62932 (± 13579)	ND	ND
MORADO 014* + AMARILLO 014*	ALUMBRE	44089 (± 16271)	45506 (± 8253)	ND	ND
VLP de Qb desnuda**	ALUMBRE	2468 (± 497)	3018 (± 270)	11,4 (5,5)	-11,8 (8,03)
MORADO 014 <sup>^</sup>	ALUMBRE + CpG-24555	36667 (± 13720)	36947 (± 15325)	10,1 (2,7)	-0,108 (27,67)
MORADO 014*	ALUMBRE + CpG-24555	33429 (± 9511)	42935 (± 19555)	9,9 (2,7)	-10,42 (5,46)
AMARILLO 001 <sup>^</sup>	ALUMBRE + CpG-24555	74180 (± 20978)	80789 (±12783)	9,3 (1,8)	2,84 (19,68)
AMARILLO 001*	ALUMBRE + CpG-24555	75703 (± 18385)	65831 (± 21843)	9,8 (1,7)	-6,07 (10,1)
AMARILLO 014 <sup>^</sup>	ALUMBRE + CpG-24555	31477 (± 13045)	27621 (± 9763)	ND	ND
AMARILLO 014*	ALUMBRE + CpG-24555	51564 (± 30634)	51346 (± 22522)	ND	ND
MORADO 014 <sup>^</sup> + AMARILLO 001 <sup>^</sup>	ALUMBRE + CpG-24555	78604 (± 25881)	68086 (± 22146)	10,7 (2,2)	15,24 (34,44)
MORADO 014* + AMARILLO 001*	ALUMBRE + CpG-24555	75617 (± 26964)	69765 (± 19017)	10 (1,5)	23,31 (37,4)
MORADO 014 <sup>^</sup> + AMARILLO 014 <sup>^</sup>	ALUMBRE + CpG-24555	63775 (± 23432)	42457 (± 9704)	ND	ND
MORADO 014* + AMARILLO 014*	ALUMBRE + CpG-24555	52660 (± 27718)	54023 (± 26129)	ND	ND
VLP de Qb desnuda**	ALUMBRE + CpG-24555	2932 (+ 3361)	3266 (± 942)	11,6 (1,9)	-17,61 (14,461)

Ag Peptídico (véanse las secuencias en la Tabla 9)	ADYUVANTES	Máximo de unión a IgE después de la 2ª dosis: Media (± desv. típ.)	Máximo de unión a IgE después de la 3ª dosis: Media (± desv. típ.)	% de desgranulación después de la 3ª dosis (± desv. típ.)	% de disminución en los niveles de IgE después de la 3ª dosis (± desv. típ.)
<p>^ = dosis de 20 microgramos</p> <p>* = dosis de 100 microgramos</p> <p>** = dosis de 200 microgramos</p> <p>Compañero de conjugación = VLP de Qbeta</p> <p>Dosificación de ratones Balb/c hembra cada 4 semanas a las semanas 0, 4 y 8. Muestras tomadas para ensayo 7 días después de la 2ª y 3ª dosis.</p> <p>La dosis de Alhydrogel equivale a la dosis de vacuna como anteriormente</p> <p>El CpG-24555 (todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato) se dosificó a 100 microgramos</p> <p>La actividad de reducción de IgE se ensayó usando IgE humana 1000 ng/ml añadida a suero de Balb/c normal (véase el Ejemplo 5 para detalles).</p>					

**Ejemplo 12: la eficacia de una combinación de péptidos es mayor que usar péptidos individuales conjugados con Qbeta en la inducción de respuestas de anticuerpos que puedan unirse a IgE humana.**

Se realizaron varios estudios que tenían como objetivo evaluar cómo eran péptidos conjugados con Qbeta (como se ha detallado en los Ejemplos anteriores) en la inducción de una respuesta de anticuerpos que puedan unirse a IgE humana. Se inmunizaron Balb/c hembra (6-8 semanas) por vía intramuscular como se ha descrito en el Ejemplo 5, con detalles de administración temporal específicos como se indican en las tablas. Se midieron las respuestas anti-IgE, la actividad de inducción de desgranulación y la actividad de reducción de IgE como se detalla en el Ejemplo 5.

**Resultados**

Como se muestra en la Tabla 11, la conjugación de los péptidos (véanse las secuencias en la Tabla 9) con Qbeta inducía respuestas de anticuerpos que eran capaces de unirse a IgE libre sin causar desgranulación por encima del valor de control. El uso de Alhydrogel como único adyuvante es eficaz y una combinación de péptidos morados y péptidos amarillos inducía mayores respuestas de anticuerpos de unión a IgE. Además, la combinación de péptidos inducía respuestas de anticuerpos que eran más potentes en la unión y reducción de IgE. La adición de CPG 24555 a la formulación de Alhydrogel aumentaba las respuestas de anticuerpos anti-IgE adicionalmente sin inducir actividad de desgranulación.

**Ejemplo 13: inducción de respuestas anti-IgE propia por un homólogo murino de MORADO 001 y AMARILLO 001**

Se evaluó la capacidad de vacunas de péptido de IgE para inducir anticuerpos IgG anti-IgE propia y reducir los niveles de IgE *in vivo* en ratones con niveles de IgE aumentados (inducidos por inmunización previa con ovoalbúmina sin endotoxina (OVA) como antígeno de modelo formulado con alumbre - referencia ejemplar, Lloyd C y col, J. Immunol 2001, 166, págs. 2033-2040). Después de la inducción de respuestas de IgE anti-OVA, los ratones se vacunaron con péptidos antigénicos acoplados a vehículo de Qbeta y se formularon con adyuvantes. Se usaron péptidos de las regiones homólogas de IgE de ratón (amarillo 001 murino = QCIVDHPDFPKPIVRS (SEC ID N.º: 458); morado 001 murino = PDHEPRGVITYLIPSPC (SEC ID N.º: 459)). La eficacia de las vacunaciones en la disminución de los niveles de IgE se controló midiendo los niveles de IgE anti-OVA en sueros antes y después de la vacunación.

**a) Ensayo de cuantificación de IgE específica de ovoalbúmina**

**Resumen:** un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) que determina una concentración de IgE murina específica de OVA. Se usó un anticuerpo monoclonal de IgE específica de OVA (AbD Serotec N.º de Cat. PMP68) como control positivo con diluciones semilogarítmicas de 12 puntos cuantitativas de este patrón (añadido a una concentración superior de 30 µg/ml en suero negativo de Balb/c de Harlan Labs (combinado a partir de 400 animales de Harlan Laboratories N.º de Código R-0131D) ensayado en cada ensayo. Este suero normal combinado se usó también en solitario como control negativo. **Recubrimiento de placas de ensayo:** se recubrieron placas de ensayo de 384 pocillos (unión convencional Meso-Scale Diagnostics (MSD) N.º de Cat.: L11XA-1,0370PA) con 12 µl/pocillo de pAb de rata contra IgE de ratón - Invitrogen N.º de Cat. 04700 diluido a 15 µg/ml con PBS 0,01 M pH 7,4, después se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar x3 con PBS 0,01 M pH 7,4, se bloquearon las placas usando 25 µl/pocillo de tampón de bloqueo de partida de Pierce (Pierce Biotech, N.º de Cat. 37538) y se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 40 min, antes de un lavado final x3 con PBS 0,01 M pH 7,4. **Preparación y ensayo de muestras:** cada muestra de suero se diluyó 1 en 200 y 1 en 500 (diluyente PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %) y se añadieron 12 µl de cada dilución, por triplicado, a las placas MSD recubiertas, con diluciones de patrón ensayadas en paralelo. Después de la incubación en un agitador a temperatura ambiente durante 2 horas, las placas se lavaron x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %. Se añadieron 12 µl/pocillo, de ovoalbúmina de detección SULFO-marcada, 1:300 con PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %, después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 % se añadieron 50 µl/pocillo de tampón T de lectura MSD (4x) con tensioactivo (MSD N.º de

Cat. R92TC) 1:2 con agua MQ. Las placas se leyeron usando un MSD Sector Imager 6000. **Análisis de datos:** se calculó el logaritmo de los datos sin procesar (píxeles), se representó la curva patrón (ng/ml de concentración logarítmica de IgE de ratón anti-OVA frente a píxeles logarítmicos) y se aplicó un ajuste de curva de 5 parámetros asimétrico. Se predijeron las concentraciones logarítmicas de IgE de las muestras de ensayo a partir de la curva patrón y posteriormente se calculó el antilogaritmo y se multiplicó por 200 o 500 para obtener las concentraciones de IgE reales en ng/ml.

**b) Determinación del título de IgG total anti-IgE murina**

**Resumen:** un ELISA colorimétrico que genera un título recíproco (RT) que representa los niveles de moléculas de IgG total que son específicas para IgE murina. Se prepararon diluciones seriadas de muestras de sueros y se ensayaron en el ensayo. Se usó pAb de rata contra IgE de ratón - Invitrogen N.º de Cat. 04700 añadido en suero negativo de Balb/c de Harlan Labs a 10 µg/ml y titulado en una dilución seriada semilogarítmica de 8 puntos como control positivo. Se usó suero negativo de Balb/c de Harlan Labs como control negativo (combinado a partir de 400 animales de Harlan Laboratories N.º de Código R-0131D), junto con una muestra combinada del grupo de estudio negativo (tratado igual que las muestras). **Recubrimiento de placas de ensayo:** se recubrieron placas de ensayo de alta unión de 384 pocillos (Corning International N.º de Cat. 3700) con 25 µl/pocillo de reserva de IgE de ratón contra OVA (AbD Serotec N.º de Cat. PMP68) diluido a 5 µg/ml con PBS 0,01 M pH 7,4 y se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar x2 con PBS pH 7,4, las placas se bloquearon usando 80 µl/pocillo de PBS 0,01 M/BSA al 1 %, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora antes de un lavado final x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %. **Preparación y ensayo de muestras:** se preparó una dilución seriada 1/10 de 8 puntos de cada muestra partiendo de una dilución 1:10 (diluente PBS/BSA al 1 %), se transfirieron 25 µl/pocillo de la dilución seriada por duplicado a la placa recubierta con IgE de ratón después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Después de lavar x3 con PBS a 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %, se añadieron 25 µl/pocillo de anticuerpos de detección de IgG total (Fc de conejo anti-IgG de ratón, N.º de Cat. A90-130A Bethyl Laboratories) 1:6000 con PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %, después se incubaron a agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x5 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %, se añadieron 25 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano picante del kit de Bio-Rad (Bio-Rad N.º de Cat. 172-019) 1:3000 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 % pH 7,4, después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x4 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween al 0,05 %, después x1 con PBS a 0,01 M pH 7,4 solamente, se añadió sustrato Typer HRP de ratón a 25 µl/pocillo (Bio-Rad N.º de Cat. 172 -1064), después se incubó a temperatura ambiente durante 30 min antes de añadir 25 µl/pocillo de ácido oxálico al 2 % para interrumpir la reacción y leer la absorbancia a 405 nm. **Análisis de datos:** se representaron las curvas de titulación para cada muestra de ensayo (título de muestra frente a Abs 405 nm) y se predijo el título de la muestra (posteriormente transformado en título recíproco) a partir de un valor de corte de DO1.

**Resultados**

Dos estudios (Tabla 12) mostraban que una combinación del homólogo murino de Amarillo 001 (mAmarillo-001 = QCIVDHPDFPKPIVRS (SEC ID N.º: 458)) y el homólogo murino de Morado 001 (mMorado-001 = PDHEPRGVITYLIPPSPC (SEC ID N.º: 459)) puede inducir respuestas de anticuerpos anti-IgE propia que pueden disminuir eficazmente los niveles endógenos de IgE (en comparación con los niveles en controles inmunizados con VLP de Qbeta). Por lo tanto se lograron pruebas del mecanismo mostrando que un conjugado de péptido de IgE puede romper la tolerancia de células B a la molécula de IgE endógena y que esto se correlaciona con una reducción en los niveles de IgE endógena.

**Tabla 12.** Resumen de datos del Ejemplo 13

	<b>Título recíproco de IgG anti-IgE de ratón (intervalo de confianza del 95 %) después de 3 vacunaciones</b>	<b>IgE específica de ovoalbúmina total (ng/ml, (desv. típ.)) después de 3 vacunaciones</b>
mMorado-001 y mAmarillo-001**	237641 (15100-3740000)	ND
mMorado-001 y mAmarillo-001	540947 (225419-1298000)	4425 (± 3455)
Control de VLP de Qbeta	10 (10-10)	ND
Control de VLP de Qbeta	33 (15-75)	15735 (± 8212)
Se sensibilizaron ratones Balb/c con ovoalbúmina las semanas 0 y 1 para aumentar los niveles endógenos de IgE.		
Los ratones se vacunaron con 200 microgramos de la combinación de morado 001 y amarillo 001 murinos (es decir, 100 microgramos de cada) las semanas 3, 7 y 11 y se ensayaron 1 semana después de la 3ª inmunización.		
Compañero de conjugación = VLP de Q beta usando SMPH.		
Adyuvante: 20 µg de CPG 24555 (todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato) + Alhydrogel™ al 20 % v/v.		
ND = no realizado		

**Ejemplo 14: vacunación de macaco Cynomolgus con morado 014 y amarillo 001 o amarillo 014**

Se evaluó la capacidad de vacunas de péptido de IgE humano para romper la tolerancia contra IgE propia *in vivo* en macacos Cynomolgus vacunados con péptidos antigénicos acoplados a vehículo (VLP de Qbeta) y formulados con adyuvantes. Se usaron péptidos de IgE humana. La eficacia de las vacunaciones para inducir respuestas inmunes anti-IgE propia se controló después midiendo los niveles de IgG anti-IgE en sueros antes y después de la vacunación.

**Ensayo de macacos Cynomolgus**

**a) Determinación del título de IgG total para IgG específica para los siguientes antígenos/VLP: dominio Cε2-Cε4 de IgE de macaco Cynomolgus, dominio Cε3Cε4 de IgE humana, péptidos individuales (amarillo y morado) conjugados con KLH y con Qbeta.**

**Resumen:** un ensayo electroquimioluminiscencia (ECL) que genera un título recíproco (RT) para representar los niveles de moléculas de IgG total que son específicas para la vacuna o VLP. Se prepararon diluciones seriadas de muestras de suero y se ensayaron en el ensayo. Se usó suero de macaco Cynomolgus al que se le añadió anticuerpo monoclonal anti-IgE humanizado (E25, Xolair) a 40 µg/ml como control positivo. Se usaron sueros de macacos Cynomolgus sin adición como control negativo. **Recubrimiento de placas de ensayo:** se recubrieron placas de ensayo de 384 pocillos (recubiertas con estreptavidina Meso-Scale Diagnostics (MSD) N.º de Cat. L21SA-1) con 12 µl/pocillo de Cε2-Cε4 de IgE de macaco Cynomolgus biotinilada o Cε3Cε4 de IgE humana diluido a 1 µg/ml con PBS 0,01 M pH 7,4/BSA al 1 %. Se recubrieron placas de ensayo de 384 pocillos (unión convencional Meso-Scale Diagnostics (MSD) N.º de Cat L11XA-1, 0370PA) con 12 µl/pocillo de péptido individual (conjugado con KLH) diluido a 1 µg/ml o Qbeta diluido a 2-5 µg/ml con PBS 0,01 M pH 7,4 (sin BSA). Después las placas se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x3 con PBS 0,01 M pH 7,4 las placas se bloquearon usando 25 µl/pocillo de tampón de bloqueo de partida de Pierce (Pierce Biotech, N.º de Cat. 37538) y se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 40 min antes de un lavado final x3 con PBS 0,01 M pH 7,4. **Preparación y ensayo de muestras:** se preparó una dilución seriada semilogarítmica de 8 puntos de cada muestra incluyendo los controles partiendo de una dilución 1:20 (diluyente PBS/BSA al 1 %), se transfirieron 12 µl/pocillo de la dilución seriada a pocillos de placas recubiertas con el antígeno de ensayo/VLP después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %, se añadió proteína G SULFO-marcada diluida a 0,02 µg/ml (diluyente PBS/BSA al 1 %) a las placas (12 µl/pocillo). Las placas se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora después se lavaron x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %. Se añadieron 50 µl/pocillo de tampón T de lectura MSD (4x) con tensoactivo (MSD N.º de Cat. R92TC) 1:2 con agua MQ. Se leyeron las placas usando un MSD Sector Imager 6000. **Análisis de datos:** se representaron las curvas de titulación para cada muestra de ensayo (título de muestra frente a píxeles) y se predijo el título de la muestra (que se transformó posteriormente en título recíproco) a partir de un valor de corte (píxeles).

**b) Ensayo de avidéz de anticuerpos de macacos Cynomolgus**

**Resumen:** un ELISA colorimétrico que genera un índice de avidéz (AI) para representar la fuerza de unión de moléculas de IgG totales que son específicas para Cε3Cε4 humano. El anticuerpo anti-IgE humanizado Xolair (E25) se añadió a un suero de macaco Cynomolgus combinado (preparado a partir del grupo de control con VLP de Qb de este estudio) a 40 y 4 µg/ml y se tituló en una dilución seriada semilogarítmica de 12 puntos como control positivo. Se usó suero de macaco Cynomolgus del grupo de estudio con VLP de Qb como control negativo, junto con suero de macaco Cynomolgus comercial. **Recubrimiento de placas de ensayo:** se recubrieron placas de 384 pocillos transparentes de HBC recubiertas con estreptavidina Reacti-Bind™ con tampón de bloqueo SuperBlock (Fisher Scientific Co Ltd P15504) con 12 µl/pocillo de Cε3Cε4 humano biotinilado a 1 µg/ml en PBS 0,01 M pH 7,4 y se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x3 con PBS pH 7,4 las placas se bloquearon usando 25 µl/pocillo de PBS 0,01 M/BSA al 1 %, se incubaron a temperatura ambiente durante 40 min antes de un lavado final x3 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %. **Preparación y ensayo de muestras:** las muestras se diluyeron con PBS 0,01 M/BSA al 1 %. Cada muestra tenía una curva de titulación generada y de esta curva se usó un valor de píxeles de 180.000 para calcular una dilución de título recíproco (RT) individual para usar para cada muestra. Este RT se usó para diluir cada muestra para asegurar que se usaran niveles similares de anticuerpos de cada muestra en el ensayo de avidéz. Se añadieron 12 µl de cada muestra diluida a 24 pocillos de las placas de 384 pocillos recubiertas y se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x5 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %, se añadió tiocianato de amonio a la placa a concentraciones diferentes a 12 µl/pocillo después se incubó en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. (Se usaron 12 concentraciones de tiocianato de amonio: 12, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 y 0 M se añadieron a muestras por duplicado). Después de lavar x4 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %, se añadieron 12 µl/pocillo de anticuerpo de ratón anti-IgG humana marcado con HRP (Southern Biotech 9042-05) con PBS 0,01 M/BSA al 1 %, después se incubaron en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar x5 con PBS 0,01 M pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %, se añadieron 25 µl/pocillo de sustrato TMB (Sigma P-8665), después se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Para interrumpir la reacción, se añadieron 25 µl/pocillo de ácido oxálico al 2 % y las placas se leyeron a Abs 450 nm. **Análisis de datos:** se calculó el % de reducción para cada muestra para cada concentración de tiocianato de amonio usando la Abs 405 nm media para las muestras de tiocianato de amonio 0 M como reducción del 0 %. Después se representaron las curvas de titulación para cada muestra de ensayo (% de reducción frente a Abs 450 nm) y se predijo el AI a partir de un valor de corte de reducción del 50 %.

**Resultados:**

Este estudio (Tabla 13) mostraba que una combinación del Amarillo 001 o Amarillo 014 con Morado 014 (véase la secuencia en la Tabla 9) es inmunogénica e induce respuestas de anticuerpos anti-IgE propia (macaco *Cynomolgus*) y anti-IgE humana que se correlacionan con respuestas contra los péptidos específicos. Además demuestra que la avidez de las respuestas de anticuerpos puede aumentarse por dosificación repetida en el macaco *Cynomolgus*.

5

**Tabla 13.** Resumen de datos del Ejemplo 14.

	Título recíproco de IgG contra IgE de <i>Cynomolgus</i> (intervalo de confianza del 95 %)	Título recíproco de IgG contra secuencia de amarillo (intervalo de confianza del 95 %)	Título recíproco de IgG contra secuencia de morado (intervalo de confianza del 95 %)	Título recíproco de IgG contra IgE humana (intervalo de confianza del 95 %)	Índice de avidez (media y Desv. Típ.)
Amarillo-001 + Morado-014 2 semanas después de la dosis 1	20	400 (203-786)	588 (313-1106)	20	1,693 (± 0,05636)
Amarillo-001 + Morado-014 2 semanas después de la dosis 2	840 (374-1888)	2013 (1052-3855)	2145 (1469-3133)	1521 (641-3610)	5,191 (± 1,305)
Amarillo-001 + Morado-014 2 semanas después de la dosis 3	1139 (170-3507)	1716 (1213-2429)	2125 (1706-2647)	1802 (980-3316)	6,757 (± 0,8725)
Amarillo-001 + Morado-014 2 semanas después de la dosis 1	22 (16-32)	400 (203-786)	588 (313-1106)	20	1,693 (± 0,05636)
Amarillo-001 + Morado-014 2 semanas después de la dosis 2	385 (98-1505)	ND	ND	761 (205-2819)	5,191 (± 1,305)
Control de Qbeta 2 semanas después de la dosis 1	ND	20 (20-20)	20 (20-20)	20	ND
Control de Qbeta 2 semanas después de la dosis 2	34 (6-194)	20 (20-20)	20 (20-20)	20	ND

ES 2 622 562 T3

	Título recíproco de IgG contra IgE de Cynomolgus (intervalo de confianza del 95 %)	Título recíproco de IgG contra secuencia de amarillo (intervalo de confianza del 95 %)	Título recíproco de IgG contra secuencia de morado (intervalo de confianza del 95 %)	Título recíproco de IgG contra IgE humana (intervalo de confianza del 95 %)	Índice de avidéz (media y Desv. Típ.)
Control de Qbeta  2 semanas después de la dosis 3	33 (7-161)	20 (20-20)	20 (20-20)	20	ND
<p>Se vacunaron macacos Cynomolgus con 600 microgramos de la combinación de morado 014 y amarillo 001 o amarillo 014 (es decir 300 microgramos de cada) en las semanas 0,4 y 8 y se ensayaron la semana 12.</p> <p>Compañero de conjugación = VLP de Qbeta usando SMPH.</p> <p>Ayudante: 500 µg de CPG 24555 (todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato) + Alhydrogel™ a 600 microgramos.</p> <p>ND = No realizado</p>					

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	1	STRKEEKQRNGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	2	TRKEEKQRNGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	3	RKEEKQRNGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	4	KEEKQRNGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	5	EEKQRNGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	6	EKQRNGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	7	KQRNGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	8	QRNGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	9	RNGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	10	NGTLTVTSTLP
SEC ID N.º	11	GTLTVTSTLP
SEC ID N.º	12	TLTVTSTLP
SEC ID N.º	13	LTVTSTLP
SEC ID N.º	14	TVTSTLP
SEC ID N.º	15	VTSTLP
SEC ID N.º	16	TSTLP
SEC ID N.º	17	STLP
SEC ID N.º	18	STRKEEKQRNGTLTVTSTL
SEC ID N.º	19	TRKEEKQRNGTLTVTSTL
SEC ID N.º	20	RKEEKQRNGTLTVTSTL
SEC ID N.º	21	KEEKQRNGTLTVTSTL
SEC ID N.º	22	EEKQRNGTLTVTSTL

ES 2 622 562 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	23	EKQRNGTLTVTSTL
SEC ID N.º	24	KQRNGTLTVTSTL
SEC ID N.º	25	QRNGTLTVTSTL
SEC ID N.º	26	RNGTLTVTSTL
SEC ID N.º	27	NGTLTVTSTL
SEC ID N.º	28	GTLTVTSTL
SEC ID N.º	29	TLTVTSTL
SEC ID N.º	30	LTVTSTL
SEC ID N.º	31	TVTSTL
SEC ID N.º	32	VTSTL
SEC ID N.º	33	TSTL
SEC ID N.º	34	STRKEEKQRNGTLTVTST
SEC ID N.º	35	TRKEEKQRNGTLTVTST
SEC ID N.º	36	RKEEKQRNGTLTVTST
SEC ID N.º	37	KEEKQRNGTLTVTST
SEC ID N.º	38	EEKQRNGTLTVTST
SEC ID N.º	39	EKQRNGTLTVTST
SEC ID N.º	40	KQRNGTLTVTST
SEC ID N.º	41	QRNGTLTVTST
SEC ID N.º	42	RNGTLTVTST
SEC ID N.º	43	NGTLTVTST
SEC ID N.º	44	GTLTVTST
SEC ID N.º	45	TLTVTST
SEC ID N.º	46	LTVTST
SEC ID N.º	47	TVTST
SEC ID N.º	48	VTST
SEC ID N.º	49	STRKEEKQRNGTLTVTS
SEC ID N.º	50	TRKEEKQRNGTLTVTS
SEC ID N.º	51	RKEEKQRNGTLTVTS
SEC ID N.º	52	KEEKQRNGTLTVTS
SEC ID N.º	53	EEKQRNGTLTVTS
SEC ID N.º	54	EKQRNGTLTVTS
SEC ID N.º	55	KQRNGTLTVTS
SEC ID N.º	56	QRNGTLTVTS
SEC ID N.º	57	RNGTLTVTS
SEC ID N.º	58	NGTLTVTS

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	59	GTLTVTS
SEC ID N.º	60	TLTVTS
SEC ID N.º	61	LTVTS
SEC ID N.º	62	TVTS
SEC ID N.º	63	STRKEEKQRNGTLTVT
SEC ID N.º	64	TRKEEKQRNGTLTVT
SEC ID N.º	65	RKEEKQRNGTLTVT
SEC ID N.º	66	KEEKQRNGTLTVT
SEC ID N.º	67	EKQRNGTLTVT
SEC ID N.º	68	EKQRNGTLTVT
SEC ID N.º	69	KQRNGTLTVT
SEC ID N.º	70	QRNGTLTVT
SEC ID N.º	71	RNGTLTVT
SEC ID N.º	72	NGTLTVT
SEC ID N.º	73	GTLTVT
SEC ID N.º	74	TLTVT
SEC ID N.º	75	LTVT
SEC ID N.º	76	STRKEEKQRNGTLTV
SEC ID N.º	77	TRKEEKQRNGTLTV
SEC ID N.º	78	RKEEKQRNGTLTV
SEC ID N.º	79	KEEKQRNGTLTV
SEC ID N.º	80	EKQRNGTLTV
SEC ID N.º	81	EKQRNGTLTV
SEC ID N.º	82	KQRNGTLTV
SEC ID N.º	83	QRNGTLTV
SEC ID N.º	84	RNGTLTV
SEC ID N.º	85	NGTLTV
SEC ID N.º	86	GTLTV
SEC ID N.º	87	TLTV
SEC ID N.º	88	STRKEEKQRNGTLT
SEC ID N.º	89	TRKEEKQRNGTLT
SEC ID N.º	90	RKEEKQRNGTLT
SEC ID N.º	91	KEEKQRNGTLT
SEC ID N.º	92	EKQRNGTLT
SEC ID N.º	93	EKQRNGTLT
SEC ID N.º	94	KQRNGTLT

---

LISTA DE SECUENCIAS

---

SEC ID N.º	95	QRNGTLT
SEC ID N.º	96	RNGTLT
SEC ID N.º	97	NGTLT
SEC ID N.º	98	GTLT
SEC ID N.º	99	STRKEEKQRNGTL
SEC ID N.º	100	TRKEEKQRNGTL
SEC ID N.º	101	RKEEKQRNGTL
SEC ID N.º	102	KEEKQRNGTL
SEC ID N.º	103	EEKQRNGTL
SEC ID N.º	104	EKQRNGTL
SEC ID N.º	105	KQRNGTL
SEC ID N.º	106	QRNGTL
SEC ID N.º	107	RNGTL
SEC ID N.º	108	NGTL
SEC ID N.º	109	STRKEEKQRNGT
SEC ID N.º	110	TRKEEKQRNGT
SEC ID N.º	111	RKEEKQRNGT
SEC ID N.º	112	KEEKQRNGT
SEC ID N.º	113	EEKQRNGT
SEC ID N.º	114	EKQRNGT
SEC ID N.º	115	KQRNGT
SEC ID N.º	116	QRNGT
SEC ID N.º	117	RNGT
SEC ID N.º	118	STRKEEKQRNG
SEC ID N.º	119	TRKEEKQRNG
SEC ID N.º	120	RKEEKQRNG
SEC ID N.º	121	KEEKQRNG
SEC ID N.º	122	EEKQRNG
SEC ID N.º	123	EKQRNG
SEC ID N.º	124	KQRNG
SEC ID N.º	125	QRNG
SEC ID N.º	126	STRKEEKQRN
SEC ID N.º	127	TRKEEKQRN
SEC ID N.º	128	RKEEKQRN
SEC ID N.º	129	KEEKQRN
SEC ID N.º	130	EEKQRN

---

ES 2 622 562 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	131	EKQRN
SEC ID N.º	132	KQRN
SEC ID N.º	133	STRKEEKQR
SEC ID N.º	134	TRKEEKQR
SEC ID N.º	135	RKEEKQR
SEC ID N.º	136	KEEKQR
SEC ID N.º	137	EEKQR
SEC ID N.º	138	EKQR
SEC ID N.º	139	STRKEEKQ
SEC ID N.º	140	TRKEEKQ
SEC ID N.º	141	RKEEKQ
SEC ID N.º	142	KEEKQ
SEC ID N.º	143	EEKQ
SEC ID N.º	144	STRKEEK
SEC ID N.º	145	TRKEEK
SEC ID N.º	146	RKEEK
SEC ID N.º	147	KEEK
SEC ID N.º	148	STRKEE
SEC ID N.º	149	TRKEE
SEC ID N.º	150	RKEE
SEC ID N.º	151	STRKE
SEC ID N.º	152	TRKE
SEC ID N.º	153	STRK
SEC ID N.º	154	CLWDLAPSKGTVN
SEC ID N.º	155	CLVVDLAPSKGTV
SEC ID N.º	156	CLVVDLAPSKGT
SEC ID N.º	157	CLVVDLAPSKG
SEC ID N.º	158	CLVVDLAPSK
SEC ID N.º	159	CLVVDLAPS
SEC ID N.º	160	CLVVDLAP
SEC ID N.º	161	CLWDLA
SEC ID N.º	162	CLWDL
SEC ID N.º	163	CLVVD
SEC ID N.º	164	CLW
SEC ID N.º	165	LWDLAPSKGTVN
SEC ID N.º	166	LWDLAPSKGTV

ES 2 622 562 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	167	LWDLAPSKGT
SEC ID N.º	168	LWDLAPSKG
SEC ID N.º	169	LWDLAPSK
SEC ID N.º	170	LVVDLAPS
SEC ID N.º	171	LWDLAP
SEC ID N.º	172	LWDLA
SEC ID N.º	173	LWDL
SEC ID N.º	174	LWD
SEC ID N.º	175	WDLAPSKGTVN
SEC ID N.º	176	WDLAPSKGTV
SEC ID N.º	177	WDLAPSKGT
SEC ID N.º	178	WDLAPSKG
SEC ID N.º	179	WDLAPSK
SEC ID N.º	180	WDLAPS
SEC ID N.º	181	WDLAP
SEC ID N.º	182	WDLA
SEC ID N.º	183	WDL
SEC ID N.º	184	VDLAPSKGTVN
SEC ID N.º	185	VDLAPSKGTV
SEC ID N.º	186	VDLAPSKGT
SEC ID N.º	187	VDLAPSKG
SEC ID N.º	188	VDLAPSK
SEC ID N.º	189	VDLAPS
SEC ID N.º	190	VDLAP
SEC ID N.º	191	VDLA
SEC ID N.º	192	DLAPSKGTVN
SEC ID N.º	193	DLAPSKGTV
SEC ID N.º	194	DLAPSKGT
SEC ID N.º	195	DLAPSKG
SEC ID N.º	196	DLAPSK
SEC ID N.º	197	DLAPS
SEC ID N.º	198	DLAP
SEC ID N.º	199	LAPSKGTVN
SEC ID N.º	200	LAPSKGTV
SEC ID N.º	201	LAPSKGT
SEC ID N.º	202	LAPSKG

ES 2 622 562 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	203	LAPSK
SEC ID N.º	204	LAPS
SEC ID N.º	205	APSKGTVN
SEC ID N.º	206	APSKGTV
SEC ID N.º	207	APSKGT
SEC ID N.º	208	APSKG
SEC ID N.º	209	APSK
SEC ID N.º	210	PSKGTVN
SEC ID N.º	211	PSKGTV
SEC ID N.º	212	PSKGT
SEC ID N.º	213	PSKG
SEC ID N.º	214	SKGTVN
SEC ID N.º	215	SKGTV
SEC ID N.º	216	SKGT
SEC ID N.º	217	KGTVN
SEC ID N.º	218	KGTV
SEC ID N.º	219	GTVN
SEC ID N.º	220	QCRVTHPHLPRALMRS
SEC ID N.º	221	CRVTHPHLPRALMRS
SEC ID N.º	222	RVTHPHLPRALMRS
SEC ID N.º	223	VTHPHLPRALMRS
SEC ID N.º	224	THPHLPRALMRS
SEC ID N.º	225	HPHLPRALMRS
SEC ID N.º	226	PHLPRALMRS
SEC ID N.º	227	HLPRALMRS
SEC ID N.º	228	LPRALMRS
SEC ID N.º	229	PRALMRS
SEC ID N.º	230	RALMRS
SEC ID N.º	231	ALMRS
SEC ID N.º	232	LMRS
SEC ID N.º	233	QCRVTHPHLPRALMR
SEC ID N.º	234	CRVTHPHLPRALMR
SEC ID N.º	235	RVTHPBLPRALMR
SEC ID N.º	236	VTHPHLPRALMR
SEC ID N.º	237	THPHLPRALMR
SEC ID N.º	238	HPHLPRALMR

## LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	239	PHLPRALMR
SEC ID N.º	240	HLPRALMR
SEC ID N.º	241	LPRALMR
SEC ID N.º	242	PRALMR
SEC ID N.º	243	RALMR
SEC ID N.º	244	ALMR
SEC ID N.º	245	QCRVTHPHLPRALM
SEC ID N.º	246	CRVTHPHLPRALM
SEC ID N.º	247	RVTHPHLPRALM
SEC ID N.º	248	VTHPHLPRALM
SEC ID N.º	249	THPHLPRALM
SEC ID N.º	250	HPHLPRALM
SEC ID N.º	251	PHLPRALM
SEC ID N.º	252	HLPRALM
SEC ID N.º	253	LPRALM
SEC ID N.º	254	PRALM
SEC ID N.º	255	RALM
SEC ID N.º	256	QCRVTHPHLPRAL
SEC ID N.º	257	CRVTHPHLPRAL
SEC ID N.º	258	RVTHPHLPRAL
SEC ID N.º	259	VTHPHLPRAL
SEC ID N.º	260	THPHLPRAL
SEC ID N.º	261	HPHLPRAL
SEC ID N.º	262	PHLPRAL
SEC ID N.º	263	HLPRAL
SEC ID N.º	264	LPRAL
SEC ID N.º	265	PRAL
SEC ID N.º	266	QCRVTHPHLPRA
SEC ID N.º	267	CRVTHPHLPRA
SEC ID N.º	268	RVTHPHLPRA
SEC ID N.º	269	VTHPHLPRA
SEC ID N.º	270	THPHLPRA
SEC ID N.º	271	HPHLPRA
SEC ID N.º	272	PHLPRA
SEC ID N.º	273	HLPRA
SEC ID N.º	274	LPRA

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	275	QCRVTHPHLPR
SEC ID N.º	276	CRVTHPHLPR
SEC ID N.º	277	RVTHPHLPR
SEC ID N.º	278	VTHPHLPR
SEC ID N.º	279	THPHLPR
SEC ID N.º	280	HPHLPR
SEC ID N.º	281	PHLPR
SEC ID N.º	282	HLPR
SEC ID N.º	283	QCRVTHPHLP
SEC ID N.º	284	CRVTHPHLP
SEC ID N.º	285	RVTHPHLP
SEC ID N.º	286	VTHPHLP
SEC ID N.º	287	THPHLP
SEC ID N.º	288	HPHLP
SEC ID N.º	289	PHLP
SEC ID N.º	290	QCRVTHPHL
SEC ID N.º	291	CRVTBPHL
SEC ID N.º	292	RVTHPHL
SEC ID N.º	293	VTHPHL
SEC ID N.º	294	THPHL
SEC ID N.º	295	HPHL
SEC ID N.º	296	QCRVTHPH
SEC ID N.º	297	CRVTHPH
SEC ID N.º	298	RVTHPH
SEC ID N.º	299	VTHPH
SEC ID N.º	300	THPH
SEC ID N.º	301	QCRVTHP
SEC ID N.º	302	CRVTHP
SEC ID N.º	303	RVTHP
SEC ID N.º	304	VTHP
SEC ID N.º	305	QCRVTH
SEC ID N.º	306	CRVTH
SEC ID N.º	307	RVTH
SEC ID N.º	308	QCRVT
SEC ID N.º	309	CRVT
SEC ID N.º	310	QCRV

ES 2 622 562 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	311	CADSNPRGVSAYLSRPSP
SEC ID N.º	312	ADSNPRGVSAYLSRPSP
SEC ID N.º	313	DSNPRGVSAYLSRPSP
SEC ID N.º	314	SNPRGVSAYLSRPSP
SEC ID N.º	315	NPRGVSAYLSRPSP
SEC ID N.º	316	PRGVSAYLSRPSP
SEC ID N.º	317	RGVSAYLSRPSP
SEC ID N.º	318	GVSAYLSRPSP
SEC ID N.º	319	VSAYLSRPSP
SEC ID N.º	320	SAYLSRPSP
SEC ID N.º	321	AYLSRPSP
SEC ID N.º	322	YLSRPSP
SEC ID N.º	323	LSRPSP
SEC ID N.º	324	SRPSP
SEC ID N.º	325	RPSP
SEC ID N.º	326	CADSNPRGVSAYLSRPS
SEC ID N.º	327	ADSNPRGVSAYLSRPS
SEC ID N.º	328	DSNPRGVSAYLSRPS
SEC ID N.º	329	SNPRGVSAYLSRPS
SEC ID N.º	330	NPRGVSAYLSRPS
SEC ID N.º	331	PRGVSAYLSRPS
SEC ID N.º	332	RGVSAYLSRPS
SEC ID N.º	333	GVSAYLSRPS
SEC ID N.º	334	VSAYLSRPS
SEC ID N.º	335	SAYLSRPS
SEC ID N.º	336	AYLSRPS
SEC ID N.º	337	YLSRPS
SEC ID N.º	338	LSRPS
SEC ID N.º	339	SRPS
SEC ID N.º	340	CADSNPRGVSAYLSRP
SEC ID N.º	341	ADSNPRGVSAYLSRP
SEC ID N.º	342	DSNPRGVSAYLSRP
SEC ID N.º	343	SNPRGVSAYLSRP
SEC ID N.º	344	NPRGVSAYLSRP
SEC ID N.º	345	PRGVSAYLSRP
SEC ID N.º	346	RGVSAYLSRP

---

LISTA DE SECUENCIAS

---

SEC ID N.º	347	GVSAYLSRP
SEC ID N.º	348	VSAYLSRP
SEC ID N.º	349	SAYLSRP
SEC ID N.º	350	AYLSRP
SEC ID N.º	351	YLSRP
SEC ID N.º	352	LSRP
SEC ID N.º	353	CADSNPRGVSAYLSR
SEC ID N.º	354	ADSNPRGVSAYLSR
SEC ID N.º	355	DSNPRGVSAYLSR
SEC ID N.º	356	SNPRGVSAYLSR
SEC ID N.º	357	NPRGVSAYLSR
SEC ID N.º	358	PRGVSAYLSR
SEC ID N.º	359	RGVSAYLSR
SEC ID N.º	360	GVSAYLSR
SEC ID N.º	361	VSAYLSR
SEC ID N.º	362	SAYLSR
SEC ID N.º	363	AYLSR
SEC ID N.º	364	YLSR
SEC ID N.º	365	CADSNPRGVSAYLS
SEC ID N.º	366	ADSNPRGVSAYLS
SEC ID N.º	367	DSNPRGVSAYLS
SEC ID N.º	368	SNPRGVSAYLS
SEC ID N.º	369	NPRGVSAYLS
SEC ID N.º	370	PRGVSAYLS
SEC ID N.º	371	RGVSAYLS
SEC ID N.º	372	GVSAYLS
SEC ID N.º	373	VSAYLS
SEC ID N.º	374	SAYLS
SEC ID N.º	375	AYLS
SEC ID N.º	376	CADSNPRGVSAYL
SEC ID N.º	377	ADSNPRGVSAYL
SEC ID N.º	378	DSNPRGVSAYL
SEC ID N.º	379	SNPRGVSAYL
SEC ID N.º	380	NPRGVSAYL
SEC ID N.º	381	PRGVSAYL
SEC ID N.º	382	RGVSAYL

---

## LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	383	GVSAYL
SEC ID N.º	384	VSAYL
SEC ID N.º	385	SAYL
SEC ID N.º	386	CADSNPRGVSAY
SEC ID N.º	387	ADSNPRGVSAY
SEC ID N.º	388	DSNPRGVSAY
SEC ID N.º	389	SNPRGVSAY
SEC ID N.º	390	NPRGVSAY
SEC ID N.º	391	PRGVSAY
SEC ID N.º	392	RGVSAY
SEC ID N.º	393	GVSAY
SEC ID N.º	394	VSAY
SEC ID N.º	395	CADSNPRGVSA
SEC ID N.º	396	ADSNPRGVSA
SEC ID N.º	397	DSNPRGVSA
SEC ID N.º	398	SNPRGVSA
SEC ID N.º	399	NPRGVSA
SEC ID N.º	400	PRGVSA
SEC ID N.º	401	RGVSA
SEC ID N.º	402	GVSA
SEC ID N.º	403	CADSNPRGVS
SEC ID N.º	404	ADSNPRGVS
SEC ID N.º	405	DSNPRGVS
SEC ID N.º	406	SNPRGVS
SEC ID N.º	407	NPRGVS
SEC ID N.º	408	PRGVS
SEC ID N.º	409	RGVS
SEC ID N.º	410	CADSNPRGV
SEC ID N.º	411	ADSNPRGV
SEC ID N.º	412	DSNPRGV
SEC ID N.º	413	SNPRGV
SEC ID N.º	414	NPRGV
SEC ID N.º	415	PRGV
SEC ID N.º	416	CADSNPRG
SEC ID N.º	417	ADSNPRG
SEC ID N.º	418	DSNPRG

ES 2 622 562 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID N.º	419	SNPRG
SEC ID N.º	420	NPRG
SEC ID N.º	421	CADSNPR
SEC ID N.º	422	ADSNPR
SEC ID N.º	423	DSNPR
SEC ID N.º	424	SNPR
SEC ID N.º	425	CADSNP
SEC ID N.º	426	ADSNP
SEC ID N.º	427	DSNP
SEC ID N.º	428	CADSN
SEC ID N.º	429	ADSN
SEC ID N.º	430	CADS
SEC ID N.º	431	TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT
SEC ID N.º	432	TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT
SEC ID N.º	433	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
SEC ID N.º	434	ADSNPRGVSAYLSRPSPC
SEC ID N.º	435	MAKLETVTLGNIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVPALEKR VTVSVSQPSRNRKKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQAYADVTF SFTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY
SEC ID N.º	436	STRKEEKQRNGTLTSTLPC
SEC ID N.º	437	LWDLAPSKGTVNC
SEC ID N.º	438	CLVVDLAPSKGTVNGGGGGC
SEC ID N.º	439	CADSNPRGVSAYLSRPSPC
SEC ID N.º	440	GGGGACGACGTCGTGGGGGGG
SEC ID N.º	441	TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT
SEC ID N.º	442	TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTTCGA
SEC ID N.º	443	TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG
SEC ID N.º	444	TCGTCGACGTTTCGGCGCGCGCCG
SEC ID N.º	445	TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG
SEC ID N.º	446	TCGGACGTTTCGGCGCGCGCCG
SEC ID N.º	447	TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG
SEC ID N.º	448	TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG
SEC ID N.º	449	TCGACGTTTCGGCGCGCGCCG
SEC ID N.º	450	TCGCGTCGTTTCGGCGCGCCG
SEC ID N.º	451	TCGCGACGTTTCGGCGCGCGCCG
SEC ID N.º	452	TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGGCG
SEC ID N.º	453	TCGTCGTTTTTCGGCGGCGCGCCG

---

LISTA DE SECUENCIAS

---

---

SEC ID N.º      454      TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG

---

SEC ID N.º      455      TCGTCGTTTTCGGGCGCGCCGT

---

SEC ID N.º      456      TCGTCGACGATCGGGCGCGCCG

---

SEC ID N.º      457      ADSNPRGVSA YLSRPS PGGC

---

SEC ID N.º      458      QCIVDHPDFPKPIVRS

---

SEC ID N.º      459      PDHEPRGVITYLIPPSPC

---

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende dos inmunógenos en la que:
- el primer inmunógeno consiste en un inmunógeno que comprende al menos un péptido de IgE antigénico unido a un vehículo inmunogénico, en el que dicho péptido de IgE antigénico consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N.<sup>os</sup>: 311, 312, 313, 314, 326, 327, 328, 340, 341 y 353 y
  - el segundo inmunógeno consiste en un inmunógeno que comprende al menos un péptido de IgE antigénico unido a un vehículo inmunogénico, en el que dicho péptido de IgE antigénico consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N.<sup>os</sup>: 220, 221, 222, 233, 234, 235, 245, 246 y 247.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho péptido antigénico de IgE del primer inmunógeno comprende además cualquiera de:
- en su extremo C-terminal un engarce que tiene la fórmula  $(G)_nC$  en la que n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 (cuando n es igual a 0 dicha fórmula representa una cisteína) o;
  - en su extremo N-terminal un engarce que tiene la fórmula  $C(G)_n$ , en la que n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 (cuando n es igual a 0, la fórmula representa una cisteína) o;
  - en su extremo C-terminal un engarce que tiene la fórmula  $(G)_nC$ , en la que n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 (cuando n es igual a 0 dicha fórmula representa una cisteína) y en su extremo N-terminal un engarce que tiene la fórmula  $C(G)_n$ , en la que n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 (cuando n es igual a 0, la fórmula representa una cisteína).
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho péptido antigénico de IgE del primer inmunógeno comprende además cualquiera de:
- en su extremo C-terminal un engarce que tiene la fórmula  $(G)_nC$  en la que n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2 y 3 (cuando n es igual a 0 dicha fórmula representa una cisteína) o;
  - en su extremo N-terminal un engarce que tiene la fórmula  $C(G)_n$  en la que n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2 y 3 (cuando n es igual a 0, la fórmula representa una cisteína) o;
  - en su extremo C-terminal un engarce que tiene la fórmula  $(G)_nC$  en la que n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2 y 3 (cuando n es igual a 0 dicha fórmula representa una cisteína) y en su extremo N-terminal un engarce que tiene la fórmula  $C(G)_n$ , en la que n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2 y 3 (cuando n es igual a 0, la fórmula representa una cisteína).
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dichos péptidos de IgE antigénicos están unidos a un vehículo inmunógeno seleccionado del grupo que consiste en albúminas séricas, albúmina sérica bovina (BSA); globulinas; tiroglobulinas; hemoglobinas; hemocianinas, hemocianina de lapa Californiana, proteínas extraídas de ascárides, toxinas o toxoides bacterianos inactivados, toxina tetánica, toxina diftérica, CRM197, el derivado proteico purificado de tuberculina (PPD), Proteína D de *Haemophilus influenzae* o fragmentos recombinantes de la misma, pollisina; ácido poliglutámico; copolímeros de lisina-ácido glutámico; copolímeros que contienen lisina u ornitina y vehículos liposomales.
5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dichos péptidos de IgE antigénicos están unidos a un vehículo inmunogénico seleccionado del grupo que consiste en VLP de HBcAg, HBsAg y Qbeta.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en la que dichos péptidos de IgE antigénicos están químicamente reticulados con dichos vehículos inmunogénicos.
7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la que dichos péptidos de IgE antigénicos están conformacionalmente limitados.
8. La composición de la reivindicación 1, en la que el primer inmunógeno consiste en un polipéptido de SEC ID N.<sup>o</sup>: 457 químicamente reticulado con dicha partícula similar a virus de Qbeta de SEC ID N.<sup>o</sup>: 435 por medio de un enlace tioéter usando SMPH (succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato) como reticulante, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la partícula similar a virus y el resto de cisteína de dicho polipéptido.
9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la que el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.<sup>o</sup>: 312.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la que el péptido de IgE antigénico del primer inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.<sup>o</sup>: 312 y el péptido de IgE antigénico del segundo inmunógeno consiste en una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.<sup>o</sup>: 220.
11. Una composición que comprende dos inmunógenos en la que cada uno de estos inmunógenos consisten

en un péptido de IgE antigénico conjugado individualmente a una partícula similar a virus de Qbeta en la que:

- 5 - el primer inmunógeno comprende un péptido de IgE antigénico de la SEC ID N.º: 220 reticulado químicamente con una partícula similar a virus de Qbeta de la SEC ID N.º: 435 mediante un enlace tioéter usando SMPH (succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato) como reticulante, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la partícula similar a virus y el resto de cisteína de dicho péptido de IgE antigénico y;
- el segundo inmunógeno comprende un polipéptido de la SEC ID N.º: 457 reticulado químicamente con una partícula similar a virus de Qbeta de la SEC ID N.º: 435 mediante un enlace tioéter usando SMPH (succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato) como reticulante, siendo dicho enlace entre un resto de lisina de la partícula similar a virus y el resto de cisteína de dicho polipéptido.
- 10 12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente al menos un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en alumbre, oligonucleótidos que contienen CpG y adyuvantes basados en saponina.
- 15 13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que al menos un adyuvante es un oligonucleótido que contiene CpG seleccionado del grupo que consiste en CpG7909 (SEC ID N.º: 433), CpG 10103 (SEC ID N.º: 432) y CpG24555 (SEC ID N.º: 431).
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicho al menos un adyuvante es un adyuvante basado en saponina.
- 20 15. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente al menos dos adyuvantes seleccionados del grupo que consiste en alumbre, oligonucleótidos que contienen CpG y adyuvantes basados en saponina.
16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dichos dos adyuvantes son alumbre y CpG24555 (SEC ID N.º: 431).
17. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o la composición farmacéutica de la reivindicación 17 para su uso como un medicamento.
19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o la composición farmacéutica de la reivindicación 17 para su uso en un procedimiento para prevenir, aliviar o tratar un trastorno mediado por IgE.
- 30 20. La composición o composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 19, en el que dicho trastorno mediado por IgE es asma.

**FIG. 1**  
**Interacción de C3C4 de IgE con FCER1**

