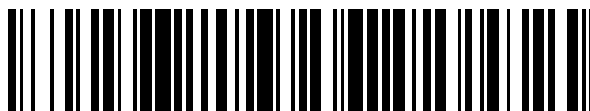


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 525**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 39/36 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2007** E 15161237 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** EP 2924047

54 Título: **Transportador de vacuna**

30 Prioridad:

09.06.2006 AT 9942006

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

05.02.2019

73 Titular/es:

**BIOMAY AG (100.0%)
Lazarettgasse 19 Top 1
1090 Wien, AT**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 698 525 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

Transportador de vacuna

5 La presente invención se refiere a nuevas moléculas hipoalérgicas y a usos de las mismas.

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

15 Probablemente, la única forma etiológica de tratamiento de la alergia es la inmunoterapia específica de alérgeno, que se basa en la administración repetida de cantidades crecientes de extractos de alérgenos para la mayoría de las fuentes. Numerosos estudios clínicos han documentado la eficacia clínica de la inmunoterapia por inyección y existen pruebas de varios mecanismos inmunitarios subyacentes a este tratamiento. Debido a la dificultad de preparar extractos de alérgenos de alta calidad para ciertas fuentes de alérgenos y al hecho de que la administración de alérgenos a pacientes puede provocar efectos secundarios graves, la inmunoterapia específica de alérgeno solo puede recomendarse para determinados grupos de pacientes y manifestaciones de enfermedad. Es especialmente difícil tratar a los pacientes con co-sensibilizaciones a varias fuentes de alérgenos diferentes y a los pacientes que padecen manifestaciones de enfermedades graves tales como el asma alérgica. El asma alérgica es una de las manifestaciones más vigorosas de la alergia, ya que afecta gravemente a la calidad de la vida diaria, provoca una alta tasa de ingresos hospitalarios y puede manifestarse en formas graves y potencialmente mortales que requieren un cuidado intensivo del paciente.

30 Los extractos de alérgenos preparados a partir de fuentes de alérgenos naturales están en bruto en su naturaleza y es imposible influir en la calidad y las cantidades de alérgenos individuales en dichas preparaciones por medios técnicos. También contienen numerosos componentes no alérgicos no definidos y varios estudios recientes indican la mala calidad de dichos extractos y documentan su gran heterogeneidad.

35 En la última década se han logrado grandes avances en el campo de la caracterización de alérgenos moleculares utilizando tecnología de ADN recombinante. Un gran número de los alérgenos que desencadenan enfermedades más importantes se ha caracterizado hasta el nivel molecular y se han producido alérgenos recombinantes que imitan la complejidad de epítipo de extractos de alérgenos naturales. Además, varios grupos de investigación han utilizado el conocimiento con respecto a las estructuras de alérgenos para desarrollar nuevas vacunas para alergias definidas. La ingeniería genética, la química de péptidos sintéticos y la conjugación de alérgenos con secuencias de ADN inmunoestimuladoras se han utilizado para reducir la actividad alérgica de las nuevas vacunas y, por tanto, la tasa de efectos secundarios inducidos por la terapia. Los primeros estudios clínicos prometedores se realizaron con dichos derivados alérgicos. Curiosamente, resultó que, aunque la reactividad de IgE de alérgenos recombinantes genéticamente modificados y péptidos que contienen epítopos de linfocitos T sintéticos derivados de alérgenos podría reducirse fuertemente o incluso eliminarse, estos derivados todavía podrían inducir efectos secundarios sistémicos que aparecen varias horas después de la inyección. Por ejemplo, se informó que los péptidos de epítopos de linfocitos T del principal alérgeno de los gatos, Fel d 1, indujeron asma e hiperreactividad bronquial varias horas después de la inyección intracutánea y hay pruebas sólidas de que este efecto está mediado por linfocitos T y está restringido por el CMH.

50 Estos resultados indican que la eliminación de la reactividad de IgE disminuye los efectos secundarios mediados por IgE puesto que no se registraron reacciones inmediatas en el curso de estos estudios de inmunoterapia. Sin embargo, los epítopos de linfocitos T específicos de alérgenos que se han conservado en los derivados de alérgenos recombinantes, así como en las mezclas de péptidos, son responsables de los efectos secundarios tardíos (por ejemplo, la dermatitis muy problemática o atópica, la manifestación cutánea alérgica mediada por linfocitos T crónica). Los efectos secundarios provocados en el caso de derivados de alérgenos recombinantes fueron relativamente leves y en el caso de las vacunas de péptidos de linfocitos T pueden superarse con una dosificación adecuada. Los dos nuevos enfoques, por tanto, parecen ser muy prometedores para la inmunoterapia de la rinoconjuntivitis alérgica, pero pueden tener limitaciones cuando se trata del tratamiento de formas graves de asma alérgica, donde la inducción de efectos secundarios tardíos en el pulmón puede ser muy problemática.

60 Con el fin de administrar y, en consecuencia, provocar una respuesta inmunitaria eficaz contra péptidos, polipéptidos y proteínas, se usan normalmente adyuvantes y/o transportadores. El adyuvante completo de Freund, por ejemplo, es uno de los adyuvantes más potentes disponibles. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios, su uso no está aprobado para seres humanos. Por tanto, existe una necesidad de composiciones de vacuna capaces de inducir fuertes respuestas inmunitarias contra péptidos y polipéptidos derivados de alérgenos y, por supuesto, de otros antígenos evitando el uso de adyuvante completo de Freund. Además, aunque se ha utilizado BSA

- satisfactoriamente como transportador en modelos animales, puede no ser apropiado para su uso en composiciones de vacunas humanas debido al riesgo de reacciones adversas como el riesgo de transmisión de una enfermedad priónica (variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob). Un desafío adicional para el desarrollo de una vacuna eficaz contra los alérgenos es la necesidad de una respuesta inmunitaria capaz de disminuir rápidamente los alérgenos en un individuo o animal. Por tanto, se necesitan altas concentraciones de anticuerpos específicos de alérgenos en la sangre, que son principalmente del subtipo IgG. En las superficies mucosas, los anticuerpos IgA son el subtipo primario.
- La toxina colérica, una proteína transportadora conocida en la técnica, también se usa regularmente como adyuvante, eliminando la necesidad de adyuvante completo de Freund en una composición de vacuna. Sin embargo, la toxina colérica aumenta los niveles de anticuerpo IgE totales y específicos y conduce a reacciones inflamatorias asociadas a IgE.
- Debido a los efectos secundarios provocados por la mayoría de las proteínas transportadoras utilizadas para la vacunación, existe la necesidad de sistemas transportadores que sean capaces de estimular respuestas inmunitarias contra los alérgenos u otros antígenos, sin usar adyuvantes tóxicos, sin usar proteínas transportadoras mal toleradas y, en ciertas situaciones, sin estimulación de respuestas inmunitarias potencialmente patológicas. Pueden usarse nuevos sistemas transportadores que cumplan con estas especificaciones para la formación de nuevos conjugados y composiciones adecuados para el tratamiento o la prevención de enfermedades como las enfermedades alérgicas.
- En Bohle B. et al. (*J. Immunol.* 172 (11) (2004): 6642-6648) se describe una proteína de fusión recombinante que comprende un resto de proteína de la capa S y un resto Bet v 1. Esta molécula comprende la proteína Bet v 1 hiperalérgica nativa.
- El documento WO 2004/004761 se refiere a partículas similares a virus que se fusionan con un inmunógeno y que pueden usarse para la inmunización.
- En el documento WO 2004/003143 se desvela el uso de proteínas de fusión que comprenden una partícula similar a un virus y una molécula hiperalérgica como inmunógeno para la vacunación.
- Un objeto de la presente invención es proporcionar medicamentos y transportadores que superen los inconvenientes mencionados anteriormente y permitan una vacunación de alérgenos con efectos secundarios reducidos.
- Por tanto, la presente invención se refiere a una molécula hipoalérgica derivada de Ph1 p 5 y que consiste en la secuencia de aminoácidos GAASNKAF A E G L S G E P K G A A E S S S K A A L T S K, A D L G Y G P A T P A A P A A G Y T P A T P A A P A E A A P A G K o T V A T A P E V K Y T V F E T A L K K A I T A M S E A Q K A A K.
- Para provocar una respuesta inmunitaria potenciada contra una molécula, en particular de una molécula hipoalérgica de acuerdo con la presente invención, dicha molécula se fusiona (mediante ingeniería genética) con un transportador.
- La segunda proteína (el "transportador" o "proteína transportadora") que se fusionará con una molécula hipoalérgica de la invención no deriva de un alérgeno ("no alérgico"). Sin embargo, la proteína transportadora utilizada en la presente invención puede presentar reactividad de linfocitos T y/o provocar una respuesta inmunitaria contra sí misma y la molécula hipoalérgica fusionada o conjugada con ella cuando se administra a un cuerpo animal o humano. En consecuencia, si la proteína transportadora deriva de un patógeno (por ejemplo, virus, bacterias, etc.), se producen anticuerpos (protectores) dirigidos a dicho transportador y patógenos.
- Como se usa en el presente documento, "proteína hipoalérgica" significa una proteína/polipéptido de fusión de un transportador de una fuente no alérgica con una molécula hipoalérgica.
- "Hipoalérgico" como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas con potencial alérgico reducido. Dichas moléculas tienen una capacidad reducida para provocar reacciones alérgicas en un individuo en comparación con la proteína de tipo silvestre de la que derivan estas moléculas.
- Las moléculas hipoalérgicas presentan una reactividad de IgE reducida. Estas moléculas están diseñadas para excluir los epítomos de linfocitos T que pueden causar efectos secundarios mediados por linfocitos T. Los epítomos de linfocitos T y las moléculas que presentan una respuesta de linfocitos T reducida pueden determinarse e identificarse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, Bercovici N. et al., *Clin Diagn Lab Immunol.* (2000) 7: 859-864).
- Se descubrió que es posible diseñar vacunas peptídicas derivadas de alérgenos como los principales alérgenos del polen de gramíneas, por ejemplo, Phl p 1, y para el principal alérgeno del polen de abedul, Bet v 1, usando péptidos expuestos en la superficie. Los datos obtenidos muestran que dichas vacunas peptídicas pueden producirse para cualquier alérgeno cuya estructura primaria se conozca de acuerdo con el cartografiado del epítomo de la IgE, los

datos de la estructura tridimensional o la predicción asistida por ordenador de los dominios expuestos a la superficie. Sin embargo, la selección de péptidos adecuados que pueden usarse para la vacunación sigue siendo crucial, porque no todos los péptidos identificados con estos métodos pueden emplearse en la vacunación. Los péptidos utilizados de manera adecuada con fines de vacunación deberían presentar una capacidad reducida de unión a IgE y, con el fin de reducir o evitar los efectos secundarios tardíos, deberían presentar una reactividad de linfocitos T reducida.

La expresión "derivado de un alérgeno", como se usa en el presente documento, significa que las moléculas hipoalérgicas de acuerdo con la presente invención se obtienen directamente de un alérgeno por fragmentación o truncamiento.

Las moléculas truncadas de acuerdo con la presente invención pueden definirse como partes del alérgeno completo que inducen una menor activación de los linfocitos T específicos del alérgeno que el alérgeno completo de tipo silvestre (una reducción preferentemente de al menos el 30 %, más preferentemente de al menos el 50 %, mucho más preferentemente de al menos el 70 %), presentan una actividad alérgica reducida en más del 50 % (preferentemente más del 70 %) según se evalúa mediante ensayos de unión a IgE y capacidad para inducir la activación celular mediada por IgE y cuando se acoplan a un transportador como los descritos inducen anticuerpos IgG que inhiben la unión de IgE policlonal de pacientes alérgicos al alérgeno de tipo silvestre completo.

Los péptidos deben contener secuencias de los alérgenos para evitar solapamientos con los mimótopos. Los mimótopos, sin embargo, que son pequeños peptidomiméticos (menos de 15 aminoácidos) de trozos de antígeno y se obtienen de bibliotecas de péptidos aleatorios no representan moléculas originales derivadas de alérgenos como se definen en el presente documento. No pueden usarse de acuerdo con la invención porque son demasiado pequeños para inducir una respuesta de IgG bloqueante robusta.

La molécula hipoalérgica puede comprender preferentemente al menos dos moléculas de alérgeno truncadas derivadas de al menos un alérgeno, en las que el orden de los fragmentos alérgicos truncados difiere del orden de los fragmentos en el alérgeno de tipo silvestre si las al menos dos moléculas derivan del mismo alérgeno.

La molécula hipoalérgica de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más moléculas hipoalérgicas (preferentemente al menos 2, más preferentemente al menos 3) como se definen en el presente documento, dando como resultado, por tanto, una proteína de fusión. Las moléculas hipoalérgicas únicas de la proteína de fusión, que, por supuesto, también carecen de capacidad de unión a IgE y carecen de epítomos de linfocitos T, pueden derivar de alérgenos del mismo origen y/o de origen diferente. Si las moléculas derivan del mismo alérgeno, el orden en la proteína de fusión hipoalérgica no debe ser idéntico al orden en el alérgeno de tipo silvestre (esto evita la reconstitución y formación de sitios de unión a IgE) (véase, por ejemplo, el documento WO2004/065414 Linhart B y Valenta R (*Int Arch Allergy Immunol.* (2004) 134: 324-31)).

De acuerdo con la presente invención, la molécula hipoalérgica se fusiona con el extremo N y/o el extremo C de dicha al menos una proteína de la cápside vírica.

Si la molécula hipoalérgica se fusiona con el extremo N o C del transportador, se emplean métodos recombinantes.

De acuerdo con la presente invención, la al menos una proteína vírica es preferentemente una proteína vírica de ARN o ADN.

La al menos una proteína vírica ("transportador") puede ser de cualquiera de los orígenes mencionados anteriormente. Sin embargo, en particular se prefiere usar proteínas que provocan una respuesta inmunitaria contra la proteína en sí y la molécula hipoalérgica fusionada con la misma. Debido a la inducción de la formación de anticuerpos (protectores) dirigidos también a la proteína vírica, la proteína hipoalérgica de acuerdo con la presente invención también puede emplearse como vacuna para dicha segunda proteína y su fuente de origen (es decir, virus).

La proteína vírica de acuerdo con la presente invención es una proteína de la cápside.

Las proteínas de la cápside vírica son especialmente adecuadas porque inducen actividad antivírica, provocan la formación de anticuerpos que bloquean la adhesión de virus, por ejemplo, rinovirus, a las células epiteliales, presentan una actividad inmunomoduladora hacia una respuesta Th1, aumentan la inmunogenia del péptido (es decir, anti-péptido superior y, por tanto, niveles más altos de anticuerpos IgG protectores), son adecuadas y están probadas para la vacunación profiláctica (vacunación contra virus) y son seguras, cuando las proteínas de la cápside se usan para seres humanos están continuamente expuestas (por ejemplo, rinovirus).

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, la al menos una proteína de la cápside vírica deriva de un virus patógeno humano, preferentemente un virus de la familia picornaviridae.

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

5 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la molécula hipoadérgica presenta una capacidad de unión a IgE reducida.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, la molécula hipoadérgica presenta una reactividad de linfocitos T reducida.

10 Sin embargo, también pueden usarse fragmentos de alérgenos que comprenden al menos un epítipo de linfocito T en la proteína hipoadérgica de acuerdo con la presente invención.

15 "Presentar capacidad de unión a IgE reducida", como se usa en el presente documento, significa que las moléculas de acuerdo con la presente invención muestran una capacidad o actividad de unión a IgE significativamente reducida (al menos un 50 % menos, preferentemente al menos un 70 % menos, más preferentemente al menos un 80 % menos, incluso más preferentemente al menos un 90 % menos, más preferentemente al menos un 95 % menos capacidad de unión en comparación con el alérgeno de tipo silvestre) o incluso carecen de ellas.

20 La actividad/capacidad de unión a IgE de moléculas como péptidos y proteínas puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando, por ejemplo, sueros obtenidos de un sujeto (es decir, un sujeto alérgico) que se ha expuesto previamente al alérgeno de tipo silvestre. Brevemente, un péptido que se ha de ensayar se aplica como recubrimiento sobre los pocillos de una placa de microtitulación. Después de lavar y bloquear los pocillos, se incuba en los pocillos una solución de anticuerpos que consiste en el plasma de un sujeto alérgico, que ha estado expuesto al péptido que se somete a ensayo o la proteína de la que derivó. Se añade un anticuerpo secundario marcado a los pocillos y se incuba. Después, la cantidad de unión de IgE se cuantifica y se compara con la cantidad de IgE unida por un alérgeno de tipo silvestre purificado.

30 Como alternativa, la actividad de unión de un péptido puede determinarse por análisis de transferencia Western. Por ejemplo, un péptido que se ha de someter a ensayo se desarrolla en un gel de poliacrilamida usando SDS-PAGE. Después, el péptido se transfiere a nitrocelulosa y posteriormente se incuba con suero de un sujeto alérgico. Después de la incubación con el anticuerpo secundario marcado, se determina y cuantifica la cantidad de IgE unida.

35 Otro ensayo que puede usarse para determinar la actividad de unión a IgE de un péptido es un ensayo ELISA de competición. Brevemente, se genera un conjunto de anticuerpos IgE combinando plasma de sujetos alérgicos que se ha demostrado mediante ELISA directo que son reactivos por IgE con el alérgeno de tipo silvestre. Este conjunto se usa en ensayos de competición ELISA para comparar la unión de IgE al alérgeno de tipo silvestre con el péptido sometido a ensayo. Se determina y cuantifica la unión a IgE para el alérgeno de tipo silvestre y el péptido que se somete a ensayo.

40 Un "epítipo de linfocitos T" significa una proteína (por ejemplo, un alérgeno) o un fragmento de la misma, para la que un linfocito T tiene un sitio de unión específico al antígeno, el resultado de la unión a dicho sitio de unión activa el linfocito T. La expresión "que presenta una reactividad de linfocitos T reducida", como se usa en el presente documento, se refiere a las moléculas que muestran una reactividad de linfocitos T que está significativamente reducida en comparación con la estimulación inducida por el alérgeno de tipo silvestre del que deriva la molécula hipoadérgica usando cantidades equimolares en ensayos convencionales conocidos en la técnica (reactividad reducida de linfocitos T significa al menos un 30 %, preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 70 %, mucho más preferentemente al menos un 90 % menos de estimulación de moléculas hipoadérgicas en comparación con el alérgeno de tipo silvestre en cantidades equimolares). En una realización particular preferida de la presente invención, las moléculas pueden "carecer" de epítipos de linfocitos T y, por tanto, la molécula muestra una reactividad reducida de los linfocitos T en el individuo o individuos que se tratan (es decir, quién ha de recibir una molécula de plataforma de valencia de presentación de epítipo). Es probable que, por ejemplo, una molécula derivada de alérgeno carezca de uno o varios epítipos de linfocitos T con respecto a un individuo o un grupo de individuos, a la vez que posea un epítipo o epítipos de linfocitos T con respecto a otro u otros individuos. Se conocen en la técnica métodos para detectar la presencia de un epítipo de linfocitos T e incluyen ensayos que detectan la proliferación de linfocitos T (tal como la incorporación de timidina). En general se considera que los inmunógenos que no inducen la incorporación estadísticamente significativa de timidina de los antecedentes anteriores (es decir, generalmente p inferior a 0,05 usando métodos estadísticos convencionales) carecen de epítipos de linfocitos T, aunque se apreciará que la cantidad cuantitativa de incorporación de timidina puede variar, dependiendo del inmunógeno que se esté sometiendo a ensayo (véase, por ejemplo, Zhen L. et al., *Infect Immun.* (2003) 71: 3920-3926)). En general, un índice de estimulación por debajo de aproximadamente 2-3, más preferentemente inferior a aproximadamente 1, indica falta de reactividad de linfocitos T y epítipos. La presencia de epítipos de linfocitos T también puede determinarse midiendo la secreción de linfocinas derivadas de linfocitos T de acuerdo con los métodos convencionales. El índice de estimulación (IE) puede calcularse dividiendo la tasa de proliferación (captación de timidina) de las células estimuladas entre la tasa de proliferación de células no estimuladas en medio solo. $IE = 1$ significa que no hay estimulación, $IE < 1$ indica efectos tóxicos e $IE > 1$ indica

ES 2 698 525 T3

estimulación de células. La ubicación y el contenido de epítomos de linfocitos T, si están presentes, pueden determinarse empíricamente.

5 La secreción de citocinas puede determinarse además de la estimulación de linfocitos T. Por ejemplo, el IFN-gamma ha sido reconocido como una citocina dañina. Otros ejemplos pueden ser TNF-alfa, IL-5, IL-4, IL-8, etc.

10 El fragmento de alérgeno puede estar compuesto por los aminoácidos 151 a 177, 87 a 117, 1 a 30, 43 a 70 o 212 a 241 de Phl p 1, los aminoácidos 93 a 128, 98 a 128, 26 a 53, 26 a 58, 132 a 162, 217 a 246, 252 a 283 o 176 a 212 de Phl p 5, los aminoácidos 1 a 34 o 35 a 70 de la cadena 1 de Fel d 1, los aminoácidos 1 a 34, 35 a 63 o 64 a 92 de la cadena 2 de Fel d 1, los aminoácidos 30 a 59, 50 a 79 o 75 a 104 de Bet v 1, los aminoácidos 1 a 33, 21 a 51, 42 a 73, 62 a 103 o 98 a 129 de Der p 2, los aminoácidos 1 a 30, 20 a 50, 50 a 80, 90 a 125, 125 a 155 o 165 a 198 de Der p 7, los aminoácidos 1-35, 36-70, 71-110, 111-145, 140-170, 175-205, 210-250 o 250-284 de Der p 10, los aminoácidos 1 a 35, 35 a 72, 70 a 100 o 90 a 122 de Der p 21, los aminoácidos 1 a 32, 15 a 48 o 32 a 70 de Clon 30, los aminoácidos 19 a 58, 59 a 95, 91 a 120 o 121 a 157 de Alt a 1, los aminoácidos 31 a 60, 45 a 80, 60 a 96 o 97 a 133 de Par j 2, aminoácidos 1 a 40, 36 a 66, 63 a 99, 86 a 120 o 107 a 145 de Ole e 1, aminoácidos 25 a 58, 99 a 133, 154 a 183, 277 a 307, 334 a 363, 373 a 402, 544 a 573, 579 a 608, 58 a 99, 125 a 165, 183 a 224, 224 a 261, 252 a 289, 303 a 340, 416 a 457, 460 a 500 o 501 a 542 de Fel d 2, aminoácidos 19 a 58, 52 a 91, 82 a 119, 106 a 144 o 139 a 180 de Can f 2, aminoácidos 19 a 56, 51 a 90, 78 a 118, 106 a 145 o 135-174 de Can f 1, aminoácidos 27 a 70, 70 a 100 o 92 a 132 del Art v 1, aminoácidos 31 a 70, 80 a 120, 125 a 155, 160 a 200, 225 a 263, 264 a 300, 305 a 350 o 356 a 396 de Amb a 1, aminoácidos 1 a 34, 35 a 74, 74 a 115, 125 a 165, 174 a 213, 241 a 280, 294 a 333, 361 a 400 o 401 a 438 de Alt a 6, aminoácidos 1 a 40, 41 a 80, 81 a 120, 121 a 160 de Alt a 2 o fragmentos o variaciones de secuencia de los mismos.

25 Las secuencias de aminoácidos específicas de las moléculas derivadas de alérgeno anteriormente identificadas son:

Péptido	Posición	Secuencia	SEQ ID No.
Pep Alt a 1.1	19-58	APLESRQDTASCPVTTEGDYVWKISEFYGRKPEGTYYNLSL	23
Pep Alt a 1.2	59-95	GFNIKATNGGTLDFCSAQADKLEDHKWYSCGENSFM	24
Pep Alt a 1.3	91-120	ENSFMDFSFSDRSGLLLKQKVSDDITYVA	25
Pep Alt a 1.4	121-157	TATLPNYCRAGGMGPKDFVCQGVADAYITLVTLPKSS	26
Pep Alt a 2.1	1-40	MHSSNNFFKDNIFRSLSKEDPDYSRNIIEGQVIRLHWDWAQ	27
Pep Alt a 2.2	41-80	LLMLSAKRMKVAFLDIEKDQRVWDRCTADDLKGRNGFKR	28
Pep Alt a 2.3	81-120	CLQFTLYRPRDLLSLLNEAFFSAFRENRETIINTDLEYAA	29
Pep Alt a 2.4	121-160	KSISMARLEDLWKEYQKIFPSIQVITSAFRSIEPELTVYT	30
Pep Alt a 2.5	161-190	CLKKIEASFELIEENGDPKITSEIQLLKAS	31
Pep Alt a 6.1	1-34	MTITKIHARSVYDSRGNPTVEVDIVTETGLHRAI	32
Pep Alt a 6.2	35-74	VTETGLHRAIVPSGASTGSHEACELRDGDKSKWGGKGVTK	33
Pep Alt a 6.3	74-115	APALIKEKLDVKDQSAVDAFLNKLGDGTTNKTNLGANAILGVS	34
Pep Alt a 6.4	125-165	EKGVPLYAHISDLAGTKKPYVLPVFPQNVLNGGSHAGGRLA	35
Pep Alt a 6.5	174-213	CEAPTFSEAMRQGAEVYQKLKALAKKTYGQSAGNVGDEGG	36
Pep Alt a 6.6	241-280	IKIAMDVASSEFYKADEECKYDLDFKNPDSKSKWLYEQL	37
Pep Alt a 6.7	294-333	VSIEDPFAEDDWEAWSYFFKTYDQIVGDDLTVTNPEFIK	38
Pep Alt a 6.8	361-400	AKDAFGAGWGMVSHRSGETEDVTIADIVVGLRSGQIKTG	39
Pep Alt a 6.9	401-438	APARSERLAKLNQILRIEELGDNAVYAGNNFRTAVNL	40
Pep Amb a 1.1	31-70	EILPVNETRRLTTSGAYNIIDGCWRGKADWAENRKALADC	41
Pep Amb a 1.2	80-120	GGKDGDIYTVTSELDDVANPKEGTLRFGAAQNRPLWIIFE	42
Pep Amb a 1.3	125-155	IRLDKEMVNSDKTIDGRGAKVEIINAGFTL	43
Pep Amb a 1.4	160-200	NVIIHNINMHDVKVNPGLIKSNDGPAAPRAGSDGDAISIS	44
Pep Amb a 1.5	225-263	GTTRLTVSNLFTQHQFVLLFGAGDENIEDRGMLATVAF	45
Pep Amb a 1.6	264-300	NTFTDNVDQRMPCRHRGFFQVNNNYDKWGSYAIGGS	46
Pep Amb a 1.7	305-350	ILSQGNRFCAPDERSKKNVLGRHGEEAAESMKWNWRTNKDVLNGA	47
Pep Amb a 1.8	356-396	GVDPVLTPEQSAGMIPAEPGESALSLSAGVLSQPAPGAPC	48
Pep Artv 1.1	27 -70	SKLCEKTSKTYSGKCDNKKCDKCKIEWEKAQHGACHKREAGKES	49
Pep Artv 10.2	70-100	SCFCYFDCKSPPGATPAPPGAAPPPAAGGS	50
Pep Artv 1.3	92-132	APPPAAGGSPSPPADGGSPPPADGGSPVDGGSPPPPSTH	51
Can f 1 Pep 1	19-56	QDTPALGKDTVAVSGKWYLKAMTADQEVPEKPDVTPM	52
Can f 1 Pep 2	51-90	DSVTPMILKAQKGGNLEAKITMLTNGQCQNITWLHKTSE	53
Can f 1 Pep 3	78-118	CQNITWLHKTSEPGKYTAYEGQRVVFQSPVRDHYILYC	54

ES 2 698 525 T3

Péptido	Posición	Secuencia	SEQ ID No.
Can f 1 Pep 4	106-145	QPSPVRDHYILYCEGELHGRQIRMAKLLGRDPEQSQEALE	55
Can f 1 Pep 5	135-174	RDPEQSQEALEDREFRSRAKGLNQEILELAQSETCSPGGQ	56
Can f 2 Pep 1	19-58	QEGNHEEPQGGLEELSGRWHSVALASNKSDLIKPWGHRV	57
Can f 2 Pep 2	52-91	PWGHRVFIHMSAKDGNLHGDILIPQDGGQCEKVSLTAFK	58
Can f 2 Pep 3	82-119	CEKVSLTAFKTATSNTKFDLEYWGHNDLYLAEVDPKSYL	59
Can f 2 Pep 4	106-144	NDLYLAEVDPKSYLILYMINQYNDTSLVAHLMVRDLR	60
Can f 2 Pep 5	139-180	VRDLRQQDFLPAPFESVCEDIGLHKDQIVVLSDDDRCCQSRD	61
Fel d 2 Pep 1	25-58	EAHQSEXAHRFNLDGEEHFRGLVLFVAFSQYLQQC	62
Fel d 2 Pep 2	99-133	CTVASLRDKYGEMADCCEKKEPERNECFLQHKDDN	63
Fel d 2 Pep 3	154-183	NEORFLGKYLYEIARRHPYFYAPELLYYAE	64
Fel d 2 Pep 4	277-307	CADDRADLAKYICENQDSISTKLKECCGKPV	65
Fel d 2 Pep 5	334-363	VEDKEVCKNYQEAKDVFLGTFLYEYSRRHP	66
Fel d 2 Pep 6	373-402	LAKEYEATLEKCCATDDPPACYAHVFDEFK	67
Fel d 2 Pep 7	544-573	EKQIKKQSALVELLKHKPKATEEQKTVHG	68
Fel d 2 Pep 8	579-608	VDKCCAAEDKEACFAEEGPKLVAAAQAALA	69
Fel d 2 Pep 9	58-99	CPFEDHVKL VNEVTEFAKGCVADQSAANCEKSLHELLGDKLC	70
Fel d 2 Pep 10	125-165	CFLQHKDDNPGFQGLVTPEADAMCTAFHENEQRFLGKYLYE	71
Fel d 2 Pep 11	183 a 224	EEYKGVFTECCEAADKAACTPKVDALREKVLASSAKERLKC	72
Fel d 2 Pep 12	224 a 261	CASLQKFGERAFKAWSVARLSQKFKAEFAEISKLVTD	73
Fel d 2 Pep 13	252-289	FAEISKLVTDLAKIHKECCHGDILLECADDRADLAKYIO	74
Fel d 2 Pep 14	303-340	CGKPVLEKSHLCEVERDELPA DLPLAVDFVEDKEVC	75
Fel d 2 Pep 15	416-457	CELFEKLGEGYGFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRSLGKV	76
Fel d 2 Pep 16	460-500	CTHPEAERLSCAEDYLSVNLRLCVLHEKTPVSEVTKC	77
Fel d 2 Pep 17	501-542	CTESLVNRRPCFSALQVDETYVPKEFSAETFTFHADLCTLPE	78
Pep Ole e 1.1	1-40	EDIPQPPVSQFHIQQQVYCDTCRAGFITELSEFIPGASLR	79
Pep Ole e 1.2	36-66	GASRLRQCKDKENGDVTFTEVGYTRAEGLYS	80
Pep Ole e 1.3	63-99	GLYSMLVERDHKNEFCEITLISSGRKDCNEIPTEGWA	81
Pep Ole e 1.4	86-120	GRKDCNEIPTEGWAKPSLKFKLNTVNGTTRTVNPL	82
Pep Ole e 1.5	107-145	LNTVNGTTRTVNPLGFFKKEALPKCAQVYNKLGMYPPNM	83
Pep Par j 2.1	31-60	GEEACGKVVQDIMPCLHFVKGEEKEPSKEC	84
Pep Par j 2.2	45-80	CLHFVKGEEKEPSKECCSGTKLSEEVKTTEQKREA	85
Pep Par j 2.3	60-96	CCSGTKLSEEVKTTEQKREACKIVRATKGISGIKN	86
Pep Par j 2.4	97-133	ELVAEVPKCKDIKTTLPITADFDCKSIQSTIFRGYY	87
Der p 1 Pep 1	1-30	TNACSINGNAPAEIDLRQMRTVTPIRMQGG	88
Der p 1 Pep 2	52-84	NQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQ	89
Der p 1 Pep 3	85-115	HNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQRFGISN	90
Der p 1 Pep 4	39-135	REQSCRRPMQRFGISNYCQLYPPNVNKIREALAQTH	91
Der p 1 Pep 5	145-175	KDLDAFRHYDGRITIIQRDNGYQPNYHAVNIV	92
Der p 1 Pep 6	155-187	GRTIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVVDYWI	93
Der p 1 Pep 7	175-208	VGYSNAQGVVDYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAANI	94
Der p 1 Pep 8	188-222	VRNSWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL	95
Der p 2 Pep 1	1-33	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGK	96
Der p 2 Pep 2	21-51	CHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNSKTAK	97
Der p 2 Pep 3	42-73	EANQNSKTAKIEIKASIEGLEVDVPGIDPNAC	98
Der p 2 Pep 4	62-103	EVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYDIKYTWIVPKIAPKSEN	99
Der p 2 Pep 5	98-129	APKSENVVVTVKVMGDNGVLACAIATHAKIRD	100
Der p 5 Pep 1	1-35	MEDKKHDYQNEFDLLMERICHEQIKKGELALFYLQ	101
Der p 5 Pep 2	25-60	KKGELALFYLQEQINHFEKPTKEMKDKIVAEMDTI	102
Der p 5 Pep 3	65-95	DGVRGVLDRMLQQRKDLDFEQYNLEMAKSG	103
Der p 5 Pep 4	78-114	DLDFEQYNLEMAKSGDILERDLKKEEARVKKIEV	104
Der p 7 Pep 1	1-30	DPIHYDKITEEINKAVDEAVAAIEKSETFD	105
Der p 7 Pep 2	20-50	VAAIEKSETFDPMKVPDHSKDFERHIGIIDL	106

Péptido	Posición	Secuencia	SEQ ID No.
Der p 7 Pep 3	50-80	LKGELDMRNIQVRGLKQMKRVGDANVKSSEDG	107
Der p 7 Pep 4	90-125	VHDDWSMEYDLAYKLGDLHPNTHVISDIQDFWEL	108
Der p 7 Pep 5	125-155	LSLEVSEEGNMTLTSFEVRQFANVVNHIGGL	109
Der p 7 Pep 6	165-198	LSDVLTAFQDTVRAEMTKVLAPAFKKELERNNQ	110
Der p 10 Pep 1	1-35	MEAIKMKMQAMKLEKDNAIDRAEIAEQKARDANLR	111
Der p 10 Pep 2	36-70	AEKSEEEVRALQKKIQIENELDQVQEQLSAANTK	112
Der p 10 Pep 3	71-110	LEEKEALQTAEGDVAALNRRIQLIEEDLERSEERLKIAT	113
Der p 10 pep 4	111-145	AKLEEASQSADESERMRKMLEHRSITDEERMEGLE	114
Der p 10 Pep 5	140-170	RMEGLENQLKEARMMADADRKYDEVARKLA	115
Der p 10 Pep 6	175-205	DLERAEERAETGESKIVELEELRWGNLKL	116
Der p 10 Pep 7	210-250	SEEKAQQREEAHEQQIRIMTTKLKEAEARAEFAERSVQKLQ	117
Der p 10 Pep 8	250-284	QKEVDRLEDELVHEKEKYKSISDELDTFAELTGY	118
Der p 21 Pep 1	1-35	MFIVGDKKEDEWRMAFDRLMMELETKIDQVEKGL	119
Der p 21 Pep 2	35-72	LHLSQYKELEKTKSKELKEQILRELTIGENFMKGAL	120
Der p 21 Pep 3	70-100	GALKFFEMEAKRTDLNMFERYNYEFALESJK	121
Der p 21 Pep 4	90-122	YNYEFALESIKLLIKKLDLAKKVKAVNPDEYY	122
Clon 30 Pep 1	1-32	MANDNDDPTTTVHPTTTEQPDDKFECPSRFG	123
Clon 30 Pep 2	15-48	PTTTEQPDDKFECPSRFGYFADPKDPHKFYICSN	124
Clon 30 Pep 3	32-70	GYFADPKDPHKFYICSNWEAVHKDCPGNTRWNEDEETCT	125
Bet v 1 Pep 1	30-59	LFPKVAPQAISVENIEGNGGPGTIKKISF	126
Bet v 1 Pep 2	50-79	GPGTIKKISFPEGFPKYVKDRVDEVDHTN	127
Bet v 1 Pep 3	75-104	VDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK	128
Fel d 1 cadena 1 Pep 1	1-34	EICPAVKRDVDLFLTGTPDEYVEQVAQYKALPWC	129
Fel d 1 cadena 1 Pep 2	35-70	LENARILKNCVDAKMTEEDKENALSLLDKIYTSPLC	130
Fel d 1 cadena 2 Pep 1	1-34	VKMAITCPIFYDVFFAVANGNELLLDLSLTKVNAC	131
Fel d 1 cadena 2 Pep 2	35-63	TEPERTAMKKIQDCYVENGLISRVLDGLVC	132
Fel d 1 cadena 2 Pep 3	64-92	CMTTISSSKDCMGEAVQNTVEDLKLNTLGR	133
Phl p 5 Pep 1	98-128	CGAASNKAFAEGLSGEPKGAEESSSKAALTSK	134
Phl p 5 Pep 2	26-58	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAPAGKC	135
Phl p 5 Pep 3	132-162	AYKLAYKTAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIC	136
Phl p 5 Pep 4	217-246	CEAAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEAAVK	137
Phl p 5 Pep 5	252-283	TVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAACK	138
Phl p 5 Pep 6	176-212	CAEEVKVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAANAAPANDK	139
Phl p 5 Pep 1a	93-128	CFVATFGAASNKAFAEGLSGEPKGAEESSSKAALTSK	141
Phl p 5 Pep 2b	26-53	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAC	142

- Las expresiones "fragmentos de los mismos" y "variaciones de secuencia de los mismos" se refieren a péptidos que se deducen de las moléculas derivadas de alérgenos desveladas en el presente documento y muestran propiedades bioquímicas (por ejemplo, la capacidad para evitar la unión de la IgE al alérgeno del que derivan esas moléculas) que son comparables o idénticas a dichas moléculas derivadas de alérgeno. Los fragmentos de la presente invención comprenden al menos el 5, preferentemente al menos el 7, más preferentemente al menos el 10, sucesivos y/o un máximo del 95 %, preferentemente un máximo del 90 %, más preferentemente un máximo del 80 % de restos de aminoácidos de la molécula derivada de alérgeno. La expresión "variación de secuencia" incluye modificaciones de los péptidos tales como fragmentación (véase anteriormente), sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, con otros aminoácidos naturales o no naturales o derivados de aminoácidos), supresiones o adiciones. "Variación de secuencia" se refiere también a dichas moléculas derivadas de alérgenos de la tabla anterior, en las que al menos 1, preferentemente al menos 2, más preferentemente al menos 3, incluso más preferentemente al menos 4 (5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20) restos de aminoácidos se añaden al extremo C y/o N.
- 15 Se observa que el alérgeno Clon 30 es un alérgeno derivado de los ácaros del polvo doméstico *Dermatophagoides pteronyssinus* y consiste en la siguiente secuencia: MANDNDDPTTTVHPTTTEQP-

DDKFECPSRFGYFADPKDPHK-FYICSNWEAVHKDCPGNTRWNEDEETCT (SEQ ID No. 140; véase también el documento AT A 733/2006).

5 De acuerdo con la presente invención, también se incluyen péptidos que son al menos un 80 % idénticos, preferentemente un 90 % idénticos, a las secuencias de amino desveladas anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína hipoalergénica fusionada de acuerdo con la presente invención.

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

Dicho vector es preferentemente un vector de expresión.

15 El vector que alberga la molécula de ácido nucleico de la presente invención puede usarse con fines de clonación o para la producción de vectores de expresión. Dicho vector puede ser un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago o cualquier otro vector utilizado habitualmente en ingeniería genética y puede incluir, además de la molécula de ácido nucleico de la invención, elementos eucarióticos o procarióticos para el control de la expresión, tales como secuencias reguladoras para el inicio y la terminación de la transcripción y/o traducción, potenciadores, promotores,
20 secuencias de señal y similares.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el vector es un vector bacteriano, fúngico, de insecto, vírico o de mamífero.

25 El vector de la presente invención puede emplearse preferentemente con fines de clonación y expresión en diversos hospedadores. Por tanto, dicho vector comprende además un ácido nucleico que codifica una molécula hipoalergénica o una proteína de fusión de acuerdo con las secuencias reguladoras específicas del hospedador de la presente invención.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un hospedador que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la presente invención.

La molécula de ácido nucleico y el vector de acuerdo con la presente invención pueden introducirse en un hospedador adecuado. Dicha molécula puede incorporarse en el genoma del hospedador. El vector puede existir
35 extracromosómicamente en el citoplasma o incorporarse en el cromosoma del hospedador.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una formulación de vacuna que comprende una proteína hipoalergénica de acuerdo con la presente invención.

40 La formulación de vacuna de acuerdo con la presente invención puede formularse como se conoce en la técnica y adaptarse necesariamente a la forma de administración de dicha formulación de vacuna.

Las formas preferidas de administración de la formulación de la vacuna (de la presente invención) incluyen todas las pautas de administración convencionales descritas y sugeridas para la vacunación en general y la inmunoterapia
45 para alergias específicamente (por vía oral, vía transdérmica, vía intravenosa, vía intranasal, vía mucosa, vía rectal, etc.). Sin embargo, se prefiere en particular administrar las moléculas y proteínas de acuerdo con la presente invención por vía subcutánea o por vía intramuscular.

La formulación de vacuna de acuerdo con la presente invención puede comprender solamente una proteína de la
50 cápside vírica o fragmentos de la misma de un miembro del género de los rinovirus.

Dicha formulación preferentemente comprende además al menos un adyuvante, excipiente y/o conservante farmacéuticamente aceptables.

55 Para aumentar la inmunogenia de las moléculas hipoalergénicas de acuerdo con la presente invención, pueden usarse adyuvantes, por ejemplo, en un medicamento de acuerdo con la presente invención. Un adyuvante de acuerdo con la presente invención es un agente auxiliar que, cuando se administra conjuntamente o en paralelo con un antígeno, aumenta su inmunogenia y/o influye en la calidad de la respuesta inmunitaria. Por tanto, el adyuvante puede, por ejemplo, influir considerablemente en el grado de la respuesta inmunitaria humoral o celular. Los
60 adyuvantes habituales son, por ejemplo, compuestos de aluminio, compuestos que contienen lípidos o micobacterias inactivadas.

En general, los adyuvantes pueden ser de diferentes formas, siempre que sean adecuados para la administración a seres humanos. Son ejemplos adicionales de dichos adyuvantes las emulsiones oleosas de origen mineral o vegetal,
65 compuestos minerales tales como fosfato o hidróxido de aluminio o fosfato de calcio, productos bacterianos y derivados, tales como P40 (derivado de la pared celular de *Corynebacterium granulosum*), monofosforil lípido A

(MPL, derivado del LPS) y derivados de muramil péptido y conjugados del mismo (derivados de componentes de micobacterias), alumbre, adyuvante incompleto de Freund, liposina, saponina, escualeno, etc. (véase, por ejemplo, Gupta R. K. et al. (*Vaccine* 11: 293-306 (1993)) y Johnson A. G. (*Clin. Microbiol. Rev.* 7: 277-289).

5 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, dicha formulación comprende de 10 ng a 1 g, preferentemente de 100 ng a 10 mg, especialmente de 0,5 µg a 200 µg de dicha molécula o anticuerpo hipoalergénicos.

10 Una proteína hipoalergénica de acuerdo con la presente invención puede usarse para fabricar un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección vírica y/o una alergia en un ser humano o animal.

Dicho medicamento preferentemente comprende adicionalmente al menos un adyuvante, excipiente y/o conservante farmacéuticamente aceptables.

15 El medicamento de acuerdo con la presente invención puede usarse para la inmunización activa (administración de la proteína hipoalergénica y/o moléculas de la invención).

20 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho medicamento comprende de 10 ng a 1 g, preferentemente de 100 ng a 10 mg, especialmente de 0,5 µg a 200 µg de dicha molécula hipoalergénica, molécula de ácido nucleico, vector u hospedador.

El medicamento se administra preferentemente a un individuo en una cantidad de 0,01 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal.

25 La pauta de dosificación particular, es decir, la dosis, el tiempo y la repetición, dependerán de la persona en particular y del historial médico de esa persona. Las consideraciones empíricas, tales como la semivida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosis. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse a lo largo del tratamiento.

30 El individuo al que se administra el medicamento de acuerdo con la presente invención es preferentemente un individuo o animal que está en riesgo de convertirse en alérgico.

35 Los sujetos que tienen o corren el riesgo de tener una afección, trastorno o enfermedad alérgicos incluyen sujetos con una afección alérgica existente o una predisposición conocida o sospechada a desarrollar un síntoma asociado o causado por una afección alérgica. Por tanto, el sujeto puede tener una afección, trastorno o enfermedad alérgicos crónicos activos, un episodio alérgico agudo o una afección, trastorno o enfermedad alérgicos latentes. Ciertas afecciones alérgicas se asocian a factores ambientales estacionales o geográficos. Por tanto, los sujetos en riesgo incluyen aquellos en riesgo de padecer una afección basada en un historial personal o familiar previo y en la estación o ubicación física, pero dicha afección o síntoma asociado a la afección pueden no manifestarse en sí en el sujeto.

45 La administración del medicamento de acuerdo con la presente invención, que comprende al menos una molécula hipoalergénica como se describe en el presente documento, a un individuo puede prevenir la sensibilización de dicho individuo o puede inducir una respuesta inmunitaria apropiada a los alérgenos. Si el medicamento de la presente invención se usa para prevenir la sensibilización, debe administrarse a un individuo antes del primer contacto con dicho alérgeno. Por tanto, se prefiere administrar el medicamento de acuerdo con la presente invención a neonatos y niños. Resultó que también la administración del medicamento de acuerdo con la presente invención a embarazadas inducirá la formación de anticuerpos dirigidos contra los alérgenos en el feto. Es especialmente beneficioso usar moléculas hipoalergénicas de acuerdo con la presente invención para dichas terapias, puesto que debido a la falta de los epítomos de linfocitos T los efectos secundarios que aparecen en el curso de la inmunoterapia con alérgenos puede reducirse significativamente o incluso evitarse por completo.

50 La presente invención se refiere a una molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5 (Genbank N.º X7435) que carece sustancialmente de capacidad de unión a IgE.

55 El polen de gramíneas es una de las fuentes estacionales al aire libre más potentes de alérgenos transmitidos por el aire responsables de la fiebre del heno y el asma alérgica.

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

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

65 El ensayo para reducir la actividad alérgica mediante la introducción de mutaciones puntuales, mutaciones de varios aminoácidos en fila o supresiones no mostró ningún efecto (Schramm G, et al. *J Immunol* 1999; 162: 2406-

1435). Las regiones de unión a IgE de Phl p 5 (Flicker S, et al. *J Immunol* 2000; 165: 3849-3859) ya se han descrito y la estructura tridimensional se ha resuelto (Maglio O, et al. 2002. *Protein Eng.* 15: 635-642).

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

10 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la molécula truncada carece de epítopos de linfocitos T.

Como ya se ha esbozado anteriormente, los efectos secundarios tardíos de la inmunoterapia con alérgenos pueden reducirse significativamente o incluso evitarse si las moléculas hipoalérgénicas carecen sustancialmente de epítopos de linfocitos T.

15 Las moléculas de Phl p 5 truncadas que carecen de epítopos de linfocitos T están compuestas por los aminoácidos 98 a 128, 26 a 58 o 252 a 283 de Phl p 5 o fragmentos o variaciones de secuencia de los mismos.

20 En particular, estas moléculas truncadas no muestran sustancialmente ningún epítipo de linfocitos T y, sin embargo, son capaces de provocar una respuesta inmunitaria apropiada dirigida contra el alérgeno de tipo silvestre.

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

35 La proteína de fusión hipoalérgénica puede comprender al menos dos moléculas hipoalérgénicas de acuerdo con la presente invención que presentan una capacidad de unión a IgE reducida y que presentan una reactividad de linfocitos T opcionalmente reducida.

40 Las moléculas hipoalérgénicas de la presente invención que derivan de un alérgeno y carecen de capacidad de unión a IgE pueden fusionarse de forma recombinante entre sí. Como componentes individuales (fragmentos de alérgenos) de la proteína de fusión/polipéptido también se dice que la proteína de fusión/polipéptido carece de capacidad de unión a IgE.

45 La proteína de fusión de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos dos, preferentemente al menos tres, más preferentemente al menos cuatro, incluso más preferentemente al menos cinco, moléculas hipoalérgénicas de acuerdo con la presente invención. Por supuesto, también es posible fusionar las moléculas hipoalérgénicas con otros péptidos, polipéptidos y proteínas no derivadas de alérgenos. Estos péptidos, polipéptidos y proteínas cuando se administran a un individuo también inducen una reacción inmunitaria o pueden actuar como transportadores o presentar actividades enzimáticas. Las moléculas hipoalérgénicas en la proteína de fusión de acuerdo con la presente invención pueden acoplarse directamente entre sí o a través de un enlazador que está compuesto preferentemente de restos de aminoácidos.

50 Los métodos para la producción de proteínas de fusión son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse en referencias de biología molecular convencionales tales como Sambrook et al. (*Molecular Cloning*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) y Ausubel et al. (*Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed., Wiley and Sons, 1995).
 55 En general, se produce una proteína de fusión construyendo en primer lugar un gen de fusión que se inserta en un vector de expresión adecuado, que, a su vez, se usa para transfectar una célula hospedadora adecuada. En general, las construcciones de fusión recombinantes se producen mediante una serie de digestiones con enzimas de restricción y reacciones de ligadura que dan como resultado la incorporación de las secuencias deseadas en un plásmido. Si no se dispone de sitios de restricción adecuados, pueden usarse adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos, como es sabido por los expertos en la materia y se describe en las referencias citadas anteriormente. Las secuencias de polinucleótidos que codifican alérgenos y proteínas nativas pueden ensamblarse antes de la inserción en un vector adecuado o la secuencia que codifica el alérgeno puede insertarse adyacente a una secuencia que codifica una secuencia nativa ya presente en un vector. La inserción de la secuencia dentro del vector debe estar en fase de lectura para que la secuencia pueda transcribirse en una proteína. Será evidente para los expertos en la materia que las enzimas de restricción, los enlazadores y/o los adaptadores precisos requeridos, así como las condiciones de reacción precisas, variarán con las secuencias y los vectores de clonación utilizados.

Sin embargo, el ensamblaje de construcciones de ADN es habitual en la técnica y puede ser realizado fácilmente por un experto en la materia.

5 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, las moléculas se fusionan entre sí en un orden que difiere del orden de los fragmentos en el alérgeno de tipo silvestre si las al menos dos moléculas derivan del mismo alérgeno.

10 La proteína de fusión de acuerdo con la presente divulgación puede comprender al menos dos moléculas hipoalergénicas que derivan del mismo alérgeno de tipo silvestre. En un caso de este tipo, las moléculas individuales (fragmentos de alérgenos) se fusionan entre sí en un orden diferente del orden en el alérgeno de tipo silvestre. Dicho enfoque evita la nueva formación de posibles sitios de unión a IgE/epítomos en la proteína de fusión hipoalergénica.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula hipoalergénica y una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede emplearse, por ejemplo, para producir dichas moléculas de forma recombinante.

20 Dicha molécula de ácido nucleico puede, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, estar comprendida en un vector.

Este vector es preferentemente un vector de expresión.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una formulación de vacuna que comprende una molécula hipoalergénica o una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención.

La formulación comprende además preferentemente al menos un adyuvante, excipiente y/o conservante farmacéuticamente aceptables.

30 El uso de sustancias transportadoras particulares, como la KLH (hemocianina de lapa californiana) también se encuentra entre los últimos métodos actuales para aumentar las respuestas inmunitarias. Las moléculas hipoalergénicas de la presente invención también pueden fusionarse o conjugarse con proteínas de la cápside vírica que pueden actuar también como un transportador (véase anteriormente). De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicha formulación comprende de 10 ng a 1 g, preferentemente de 100 ng a 10 mg,
35 especialmente de 0,5 µg a 200 µg de dicha molécula hipoalergénica o anticuerpo.

La formulación de la vacuna puede estar sustancialmente compuesta como el medicamento de la presente invención (véase anteriormente).

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una molécula hipoalergénica o una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención para fabricar un medicamento para el tratamiento o la prevención de una alergia en un individuo.

45 La molécula hipoalergénica y la proteína de fusión de acuerdo con la presente invención pueden usarse para la vacunación de un individuo. Esta vacunación puede reducir o evitar la respuesta alérgica causada por un alérgeno de tipo silvestre.

50 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho medicamento comprende adicionalmente al menos un adyuvante, excipiente y/o conservante farmacéuticamente aceptables.

El medicamento de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente de 10 ng a 1 g, preferentemente de 100 ng a 10 mg, especialmente de 0,5 µg a 200 µg de dicha molécula inmunógena, molécula de ácido nucleico, vector, hospedador o anticuerpo.

55 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, el medicamento se administra a un individuo en una cantidad de 0,01 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal.

60 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho individuo está en riesgo de contraer una alergia.

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

65 La Fig. 1A muestra una vista general esquemática del vector p89VP1.
La Fig. 1B muestra la secuencia de ADN del sitio de clonación múltiple del vector pET-17b y el gen que codifica

89VP1.

La Fig. 1C muestra la representación esquemática de tres posibilidades para crear fusiones de ácido nucleico.

La Fig. 2 muestra un gel de SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de Coomassie que contiene proteína marcada con his 89VP1 purificada (Calle 1: 5 µg de marcador molecular; Calle 2-5: 10 muestras de elución Mul 89VP1).

La Fig. 3 muestra el reconocimiento por IgG de 14VP1: inmunotransferencia de 14VP1 y controles. Los puntos se visualizan mediante autorradiografía (Calle 1-6: incubación con antisuero anti-14VP1 de conejo diluido 1:500-1:16000; Calle 7-12: incubación con suero preinmune diluido 1:500-1:16000).

La Fig. 4 muestra la respuesta de IgG1 específica para 89VP1 en ratones. Los grupos de ratones se inmunizaron con diferentes antígenos como se indica en la parte superior de cada caja. Los títulos de IgG1 específicos de 89VP1 se midieron por ELISA y se expresan como valores de DO en el eje y. Los resultados se muestran como diagramas de cajas, donde el 50 % de los valores se encuentran dentro de las cajas y los valores atípicos entre las barras. La línea dentro de las cajas indica la mediana de los valores.

La Fig. 5 muestra la respuesta de IgG1 específica para Phl p 1 en ratones. Se inmunizaron grupos de ratones con diferentes antígenos como se indica en la parte superior de cada caja. Los títulos de IgG1 específicos de rPhl p 1 se midieron mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo IgG1 en los sueros de ratón. Los resultados se muestran como diagramas de caja donde el 50 % de los valores están dentro de las cajas y los valores atípicos entre las barras. La línea dentro de las cajas indica la mediana de los valores.

La Fig. 6 muestra la respuesta de IgG1 específica del extracto de polen de fleo de los prados en ratones inmunizados. Se inmunizaron grupos de ratones con diferentes antígenos como se indica en la parte superior de cada caja. Los títulos de IgG1 específicos para el extracto de polen de fleo de los prados se midieron mediante ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo IgG1 en los sueros de ratón. Los resultados se muestran como diagramas de caja, donde el 50 % de los valores se encuentran dentro de las cajas y los valores atípicos entre las barras. La línea dentro de las cajas indica la mediana de los valores.

La Fig. 7 muestra la media del % de inhibición de la unión de la IgE del paciente a rPhl p 1 por preincubación con antisueros contra rPhl p 1, r89P5 y KLHP5 de los 19 pacientes. El % de inhibición se muestra en el eje y. Los resultados se muestran como barras.

La Fig. 8 muestra la proliferación de células de bazo de ratones inmunizados. Se estimularon linfocitos T de ratones inmunizados con diferentes antígenos como se indica en la parte superior de cada caja con el péptido 5, 89VF1(89) y KLH. El medio se utilizó como referencia. En el eje y se muestra el índice de estimulación. Los resultados se muestran en barras.

La Fig. 9 muestra la respuesta de IgG1, IgG2, IgG4 e IgA a 14VP1, 89VP1 y rPhl p 1 detectada en sueros humanos mediante medición por ELISA. Se sometieron a ensayo 10 sueros de pacientes para cuatro anticuerpos específicos para 89VP1, 14VP1 y rPhl p 1 como se indica en la parte superior de cada caja. Los sueros tomados en otoño e invierno se muestran en el lado izquierdo y el lado derecho de cada "pareja de barras", respectivamente. Los títulos se midieron por ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo en los sueros humanos. Los resultados se muestran como diagramas de caja, donde el 50 % de los valores se encuentran dentro de las cajas y los valores atípicos entre las barras. La línea dentro de las cajas indica la mediana de los valores.

La Fig. 10 muestra la detección de anticuerpos anti-89VP1 y anti-rPhl p 1 en sueros de pacientes alérgicos. Se analizaron sueros de 5 pacientes alérgicos a Phl p 1 para siete anticuerpos específicos para 89VP1 (barra izquierda de cada pareja) y rPhl p 1 (barra derecha de cada pareja). Los títulos se midieron por ELISA y se expresan como valor óptico (DO 405 nm) en el eje y. El valor óptico corresponde al nivel de anticuerpo en los sueros humanos. Los resultados se muestran como diagramas de caja, donde el 50 % de los valores están dentro de las cajas y no entre los valores entre las barras. La línea dentro de las cajas indica la mediana de los valores.

La Fig. 11 muestra la unión de IgG anti-14VP1 al extracto de proteína HRV14 y 14VP1 purificada (Calle 1 y 4: 5 µg de Marcador; calle 2 y 4: extracto de virus; calle 2 y 5: 5 µg de 14VP1). Las transferencias A y B se incubaron con suero inmune anti-14VP1 y suero preinmune, respectivamente. La IgG unida se detectó mediante transferencia Western y se visualizó mediante autorradiografía.

La Fig. 12 muestra la neutralización de HRV14 (Calle A (control celular): Células después de la preincubación de HRV14 con una dilución de suero inmune anti-14VP1 1:10²-1:10⁸ (fila A1-A6); Calle B: Células después de la preincubación de HRV14 con una dilución de suero preinmune 1:10²-1:10⁸ (fila B1-B6); Calle C: células después de la incubación con HRV14 10 DCT50-10⁶ DCT50 (fila C1-C6); D5: células después incubación con suero preinmune; D6: células después de la incubación con suero inmune). Las células se sembraron en placas en todos los pocillos y se colorearon con cristal violeta después de tres días.

La Fig. 13 muestra la reactividad de IgG de los antisueros anti-péptidos con el alérgeno Phl p 5 completo. Las reactividades de IgG (valores de DO) frente a Phl p 5 se muestran para 3 muestras de suero (extracción de sangre 1: suero preinmune; extracción de sangre 2-3: muestras de suero recogidas en intervalos mensuales) obtenidas de 6 conejos, cada uno de los cuales se inmunizó con uno de los péptidos conjugados con KLH.

La Fig. 14 muestra la actividad alérgica de rPhl p 5 y la mezcla de péptidos según se detecta por la expresión de CD203c. Se incubaron muestras de sangre heparinizada de tres pacientes alérgicos a Phl p 5 con diluciones en serie de 10⁻⁴ a 10 µg/ml de alérgeno recombinante, una mezcla equimolar de péptidos derivados de Phl p 5, anti-IgE o tampón de control (co, eje x). Después, las células se tiñeron con mAb CD203c y se analizaron para determinar la expresión de CD203c en un FACScan. El índice de estimulación (IR) se muestra en el eje y.

La Fig. 15 muestra la identificación de péptidos derivados de Phl p 5 que inducen respuestas linfoproliferativas bajas. Se estimularon CMSP de pacientes alérgicos al polen de fleo de los prados con diferentes concentraciones de péptidos y, con fines de control, con interleucina 2 (eje x). Los índices de estimulación (IE) se indican en el eje y.

La Fig. 16 muestra péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 que inducen respuestas inmunitarias de IgG específicas para Fel d 1 en conejos. Se inmunizaron seis conejos con los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 conjugados con KLH o rFel d 1 sin conjugar y se realizaron 3-4 extracciones de sangre en intervalos mensuales. Las reactividades de IgG de los sueros preinmunes y los antisueros contra rFel d 1 unido a placa de ELISA se muestran como densidades ópticas (valores de D.O., eje y).

La Fig. 17 muestra la baja actividad alergénica de los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 según se determina por la expresión de CD63 y CD203c en basófilos de pacientes alérgicos. Las CMSP de 5 pacientes alérgicos a gatos se incubaron con diluciones seriadas de Fel d 1 (cajas cerradas) o una mezcla de péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 (cajas abiertas) (eje x). Para los pacientes RR, las CMSP también se sondaron con diluciones seriadas de péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 como componentes individuales. La inducción de la expresión de los marcadores de superficie CD203c y CD63 se midió como intensidades de fluorescencia media y los índices de estimulación calculados se muestran en el eje y.

La Fig. 18 muestra que un tratamiento con péptidos derivados de Bet v 1 acoplados a KLH reduce las respuestas linfoproliferativas a rBet v 1 en ratones sensibilizados. La proliferación de linfocitos T se midió en cultivos de células de bazo después de la estimulación in vitro con el alérgeno de polen de abedul recombinante Bet v 1 (barras de color blanco), KLH (barras de color negro) o la mezcla de péptidos (barras de color gris). Las barras representan los índices de estimulación media (IE \pm DT) para los diferentes grupos de ratones.

La Fig. 19 muestra la vacunación profiláctica de ratones sin tratamiento previo con péptidos derivados de Bet v 1 acoplados a KLH, lo que reduce las respuestas linfoproliferativas a rBet v 1 después de la sensibilización.

La Fig. 20 muestra que la vacunación profiláctica de ratones sin tratamiento previo con péptidos derivados de Bet v 1 acoplados a KLH induce una respuesta de IgG específica para Bet v 1 y sensibiliza para la inducción de respuestas de IgG específicas para alérgenos por el alérgeno completo. Las respuestas de IgG (valores de DO: eje y) para Bet v 1 se midieron en los cuatro grupos de tratamiento en diferentes puntos temporales (eje x).

La Fig. 21 muestra una comparación de la reactividad de IgE: se determinó la capacidad de unión a IgE de los péptidos derivados de Phl p 5 (1, 2) y las variantes (1a, 2b) en ensayos de transferencia puntual aplicando 0,2 μ g/punto usando sueros de 7 pacientes alérgicos al polen de gramíneas (p1-p7) y el suero de un individuo no atópico (SHN). Se usó rPhl p 5 como control positivo y HSA como control negativo. La IgE unida se detectó con anticuerpo anti-IgE humana marcado con 125-I.

La Fig. 22 muestra una respuesta linfoproliferativa de péptidos derivados de Phl p 5 (1, 2) y variantes (1a, 2b). Se estimularon CMSP de pacientes alérgicos al polen de gramíneas con diferentes concentraciones de péptidos y, con fines de control, con concentraciones equimolares de rPhl p 5. Los índices de estimulación (IE) se indican en el eje y.

La Fig. 23 muestra la protección cruzada de los anticuerpos anti-VP1.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Construcción del vector v89VP1

Se prepararon muestras de reservas de virus para RT-PCR mediante la adición de 1 μ l de inhibidor de ARNasa (Boehringer GmbH, Alemania) a una concentración final de 0,01 U/ μ l después de la extracción de ARN de sobrenadantes de cultivos celulares mediante un kit de ARN vírico QIAamp (Qiagen, Alemania).

Se construyó el plásmido p89VP1 (Fig. 1A) reemplazando el fragmento NdeI/EcoRI del sitio de clonación múltiple de pET-17b con la secuencia de ADNc que codifica la proteína VP1 de la cepa de rinovirus humano 89 (89VP1). Los sitios de restricción NdeI y EcoRI (en pET-17b) se usaron para la inserción de 89VP1 unido a AseI/EcoRI con ATG en el extremo 5', seis histidinas seguidas por el codón de parada TGA en el extremo 3' (Fig. 1B).

La inserción de 89VP1 en pET-17b se confirmó mediante secuenciación de nucleótidos.

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

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

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

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

Clonación de 89VP1		SEQ ID No.
89VP1 directo	CGGAATTCATTAATATGAACCCAGTTGAAAAT-TATATAGATAGTGATTA	1
89VP1 inverso	CGATTAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG-GACGTTTGTAAACGGTAA	2
Mutagénesis		
Afl II directo	CTTTAAGAAGGAGATATACTTAAGATGATGAAC-CCAGTTG	3
Afl II inverso	CAACTGGGTTTCATCTTAAGTATATCTCCTTCT-TAAAG	4
Agel directo	CCTGATGTTTTTACCGGTACAAACGTCCACCAC	5
Agel inverso	GTGGTGGACGTTTGTACCGGTAAAAACATCAGG	6

Ejemplo comparativo 2: Clonación de una construcción que expresa una proteína de fusión 89VP1-fragmento de alérgeno

5 El enfoque descrito anteriormente se ejemplificó para un fragmento de alérgeno Phl p 1 C terminal, en concreto, el péptido 5 (CVRYTTE-GGTK-TEAEDVIPEGWKADTAYESK; M. Focke et al. *FASEB J* (2001) 15: 2042-4). La secuencia del ADN del péptido 5 se amplificó mediante PCR usando el ADNc de Phl p 1 (GenBank: X78813) como molde (Cebadores: Phl p 1 directo 5'-CGCGCTTAAGATGGTCCGCTACACACCACCGAGGGC-3' (SEQ ID No. 7);
 10 Phl p 1 inverso 5'-CGCGCTTAAGCTTGGACTCGTAGGCGGTGTCGGC-3' (SEQ ID No. 8)). El producto de la PCR se insertó en el sitio de restricción Afl II del vector p89VP1 y la construcción resultante se denomina vector p89P5 y producto génico r89P5.

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

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

La pureza y el tamaño de la proteína purificada se analizaron por SDS-PAGE como se muestra en la Figura 2. Las bandas de proteína se correlacionaron con el tamaño de proteína calculado de 33,6 kD. La integridad de las
 30 proteínas también se confirmó mediante análisis de transferencia Western, usando un anticuerpo anti-marca de histidina.

Ejemplo comparativo 4: Detección de anticuerpos de conejo específicos para 14VP1 por inmunotransferencia

35 Se aplicaron como puntos 5 pg de 14VP1 (proteína VP1 de la cepa 14 de rinovirus humano) y controles (Bet v 1, Phl p 5, BSA) en tiras de membrana de nitrocelulosa. Estas tiras se expusieron a una dilución de antisero anti-14VP1 de conejo (calle 1-6) y suero preinmune (calle 8-12). Los anticuerpos IgG de conejo unidos se detectaron con anticuerpo de burro anti-IgG de conejo marcado con 125I 1:1000 y se visualizaron mediante autorradiografía (Fig. 3).

40 El análisis de transferencia puntual del suero anti-14 VP1 de conejo muestra que 14VP1 es fuertemente inmunógeno. Los anticuerpos IgG todavía se detectaron con una dilución 1:16000 del antisero a diferencia del suero preinmune y los controles Bet v 1, Phl p 5 y BSA.

Ejemplo comparativo 5: respuesta de anticuerpos específicos para 89VP1 en ratones inmunizados determinada por ELISA

45 Con el fin de determinar la inmunogenia de 89VP1 y su capacidad para actuar como transportador para el péptido 5, se inmunizaron grupos de ratones balb/c hembra de seis semanas de edad (Charles River) con los siguientes antígenos: KLH, péptido 5 acoplado a KLH maleimida (KLHP5) y péptido 5 acoplado a KLH EDC (KLHP5edc). El
 50 acoplamiento químico se realizó con el mckLH activado con maleimida Imject y el kit Imject Immunogen EDC (Pierce). El grupo maleimida reacciona con grupos SH y la EDC reacciona con grupos carboxilo y amino para formar enlaces estables. Se inmunizaron grupos de 4 ratones con 89VP1, r89P5 y 89P5edc y 2 ratones se inmunizaron con

el péptido 5 solo (5 pg cada uno y se mezclaron 1:2 con hidróxido de aluminio). Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea en intervalos de aproximadamente tres semanas y se realizaron extracciones de sangre de las venas de la cola. El nivel de anticuerpo IgG1 específico para 89VP1 se determinó mediante ELISA.

5 Las placas de ELISA (Nunc) se recubrieron con 5 pg/ml de 89VP1. Los sueros anti-89VP1, anti-r89P5 y péptido 5 de los ratones se diluyeron 1:500: la IgG1 unida se detectó con anticuerpo de rata anti-IgG1 de ratón (BD Pharmingen) 1:1000 y después con anticuerpo de cabra anti-IgG de rata acoplado con PDX (Amersham Bioscience) 1:2000. El valor óptico (DO 405 nm) se muestra en el eje y, y corresponde al nivel de anticuerpo IgG1 en los sueros de ratón (Fig.4).

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

15 Ejemplo comparativo 6: Respuesta de anticuerpo específico para rPhl p 1 en ratones inmunizados determinada por ELISA

Para evaluar si la inmunización con r89P5 inducirá anticuerpos IgG que reaccionen con Phl p 1 completo, se usaron el mismo método y los mismos sueros de ratones como se describe en el ejemplo 5. Las placas de ELISA se recubrieron con 5 pg/ml de rPhl p 1 y se determinó el título de anticuerpos IgG1 (Fig. 5).

20 Todos los péptidos derivados de Phl p 1 acoplados a KLH o 89VP1 indujeron anticuerpos IgG1 específicos para rPhl p 1 con respuestas crecientes durante las inmunizaciones. Los conejos inmunizados con r89P5 y KLHP5 muestran el mismo resultado.

25 Ejemplo comparativo 7: Detección por ELISA de anticuerpos IgG1 específicos para el extracto de polen de fleo de los prados

30 La inmunización de ratones y el análisis por ELISA se realizó como se describe en la sección 5. El extracto de polen de fleo de los prados completo se aplicó como recubrimiento (100 pg/ml) en placas de ELISA y se determinó el título de anticuerpos IgG1 (Fig. 6).

35 Después de tres inmunizaciones, se pudieron detectar anticuerpos IgG1 específicos para el extracto en ratones inmunizados con el péptido 5.

Ejemplo comparativo 8: Los anticuerpos anti-r89P5 de conejo bloquean la unión de la IgE del paciente a rPhl p 1

40 Para determinar la capacidad de la Ig de conejo inducida por el péptido para inhibir la unión de los anticuerpos IgE de los pacientes alérgicos a rPhl p 1, se recubrieron placas de ELISA con 1 pg/ml de rPhl p 1, se lavaron y se bloquearon. Las placas se preincubaron con un anti-péptido de conejo diluido 1:100 (89P5, KLHP5), un anti-rPhl p 1 de conejo y, con fines de control, con los sueros preinmunes correspondientes. Después del lavado, las placas se incubaron con sueros humanos de pacientes alérgicos a Phl p 1 (diluidos 1:3) y se detectó la IgE unida con anticuerpo de ratón anti-IgE humana (Pharmingen 1:1000) y después con anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón acoplado con PDX (Amersham Bioscience) 1:2000.

45 El porcentaje de inhibición de la unión de IgE logrado conseguido mediante la preincubación con el antisuero anti-péptido se calculó como se indica a continuación: $100 - DO_i / DO_p \times 100$.

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

55 Tabla 2: % de inhibición de la unión de IgE de 19 pacientes a rPhl p 1 después de la incubación con antisueros anti-rPhl p 1, r89P5 y anti-KLHP5

paciente	rPhl p 1	% de inhibición	
		x89P5	KLHP5
1	32,343	68,291	68,213
2	29,373	64,915	61,509
3	10,367	59,469	66,270
4	28,087	73,906	71,330
5	13,808	49,358	45,372

paciente	rPhl p 1	% de inhibición	
		x89P5	KLHP5
6	22,597	66,259	67,331
7	5,375	26,667	18,902
8	22,478	42,612	47,979
9	5,019	39,822	56,837
10	13,756	53,878	63,047
11	26,444	58,430	57,944
12	25,795	67,243	62,458
13	41,330	75,694	79,517
14	35,543	85,714	87,012
15	45,796	84,255	75,185
16	32,641	76,508	77,412
17	26,483	63,171	47,735
18	19,229	85,750	86,642
19	31,142	62,428	71,086

Ejemplo comparativo 9: Proliferación de linfocitos T células del bazo de ratón después de la estimulación con antígeno

- 5 Se inmunizaron grupos de tres ratones con KLH, KLHP5 y KLH-P5edc. Se inmunizaron grupos de 4 ratones cuatro veces con 89VP1, r89P5 y 89P5edc y se inmunizaron 2 ratones con el péptido 5 solamente (5 pg cada uno). Se tomaron células de bazo 10 días después de la última inmunización y se estimularon cultivos de células individuales por triplicado en placas de 96 pocillos con péptido 5 (P5), 89VP1, KLH, Con A y un medio como control positivo y negativo, respectivamente. Después de cuatro días se añadió [³H]timidina 0,5 pCi radiactiva a cada pocillo. Las
- 10 células se recogieron después con un recolector de células Packard en placas de unifiltro después de 15 horas. La radiactividad asociada a las células se midió con un contador beta. Los índices de estimulación se calcularon y se muestra en el eje x. El antígeno que se usó para la estimulación se muestra en el eje x. Cada caja representa los datos del antígeno que se usó para la inmunización de los ratones (Fig. 8). Todos los valores por encima de dos cuentan como positivos. Los ratones inmunizados con KLH y KLHP5 solo son positivos cuando se estimulan con
- 15 KLH y los ratones con péptido 5 son completamente negativos. El grupo KLHP5edc también es negativo, lo que corresponde a los resultados del ELISA. Las células de ratones inmunizados con r89P5, 89P5edc y 89VP1 proliferaron solo después de la estimulación con 89VP1. El ratón de control sin tratamiento previo no muestra proliferación en ningún caso. Estos resultados muestran que los epítomos de linfocitos T son proporcionados por el transportador 89VP1 y no por el péptido 5.

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

- 25 Se tomaron cinco sueros humanos de personas elegidas al azar en otoño y cinco en invierno. El nivel de anticuerpos IgG1, IgG2, IgG4 e IgA frente a 14VP1, 89VP1 y rPhl p 1 se determinó mediante ELISA como se describe en el ejemplo 5. Se detectaron IgG1, IgG2, IgG4 e IgA humanas (BD Pharmingen) 1:1000 con anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón acoplado a PDX (Amersham Bioscience) 1:2000. Se pudo detectar un alto título de IgG1 anti-14VP1 y 89VP1 de los sueros tomados en otoño e invierno (Fig. 9). El título de anticuerpos anti-rPhl p 1 IgG1 fue mucho menor. Los anticuerpos IgG2, IgG4 e IgA podrían detectarse en todos los casos a un nivel muy bajo. Las proteínas
- 30 VP1 de las diferentes cepas de HRV están estrechamente relacionadas y la reactividad cruzada se ha demostrado en otros estudios.

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

- 35 Se tomaron sueros de cinco pacientes alérgicos a Phl p 1 y se realizó un experimento ELISA como se describe en el Ejemplo 5. Se recubrieron placas de ELISA con rPhl p 1 y 89VP1 y se determinaron los títulos de anticuerpos específicos IgM, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgE (Fig. 10). Se pudieron detectar más anticuerpos IgG1 anti-89VP1 que anticuerpos IgG1 anti-rPhl p1.

40 Ejemplo comparativo 12: Detección de unión de anticuerpo anti-14VP1 al virus completo mediante análisis por transferencia Western.

- 45 La unión del anticuerpo IgG de sueros del conejo inyectado con 14VP1 al virus completo se confirmó usando el virus HRV14 completo (calles 2 y 5) y 5 pg de 14VP1 purificado (calles 3 y 6) como control. El extracto de virus se separó con SDS-Page 12 % y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. El antisuero anti-14VP1 de conejo (calle 1-3) 1:500 y el suero preinmune (calle 4-6) 1:500 se sometieron a ensayo para determinar su unión a HRV14 y 14VP1.

La IgG unida se detectó con un anticuerpo de burro anti-conejo marcado con 125I y se visualizó mediante autorradiografía (Fig. 11).

La unión del antisuero 14VP1 se pudo detectar al mismo nivel (33,6 kD) que 14VP1.

5

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

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

10

El efecto citotóxico del virus se visualizó con cristal violeta después de tres días y se calculó la DCT50 (la dilución a la que el 50 % de las células están muertas).

15

Las diluciones de suero y virus (100DCT50) en la fila A y B se incubaron a 34 °C. Después de 2 horas, las células se dispersaron en todos los pocillos. D5 y D6 son controles de suero. El esquema experimental se muestra en la Fig. 12. El efecto de neutralización de los anticuerpos se detectó después de tres días con cristal violeta (Fig. 12).

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

20

Se sintetizaron péptidos usando la estrategia Fmoc con la activación de HBTU (ciclos de 0,1 mmol a pequeña escala) y el sintetizador de péptidos Applied Biosystems Modelo 433A como se describe. (Focke et al. *Faseb J* (2001) 15: 2042). Después de un análisis en profundidad del alérgeno Phl p 5, se prepararon seis péptidos derivados de Phl p 5 que varían de 31 (P1: 3026 Dalton) a 38 (P6: 3853 Dalton) aminoácidos de longitud que son ricos en aminoácidos expuestos al disolvente. (Tabla 3).

25

Estos péptidos tienen puntos isoeléctricos entre 4,32 y 8,98 y tres de ellos (péptido 3, 4 y 6) pueden contener epítopos de linfocitos T humanos.

30

Tabla 3. Características de los péptidos sintéticos derivados de Phl p 5 no alergénicos. Se muestran la posición (en relación con la molécula Phl p 5), la secuencia, la longitud, el peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI) y la presencia de epítopos de linfocitos T de los péptidos derivados de Phl p 5. El resto de cisteína añadido para facilitar el acoplamiento está marcado en negrita y subrayado.

	Posición de aa	Secuencia	Longitud de aa	PM	pI	Epítipo de linfocitos T
Pépt. 1 (SEQ ID No. 9)	98-128	CGAASNKFAEGLSGEP-KGAAESSKAAALTSK	32	3026	8,16	-
Pépt. 2 (SEQ ID No. 10)	26-58	ADLGYGPATPAAPAAGYT-PATPAAPAEAAPAGK C	34	3068	4,37	-
Pépt. 3 (SEQ ID No. 11)	132-162	AYKLAYKTAEGATPEAKY-DAYVATLSEALR IC	32	3482	6,29	+
Pépt. 4 (SEQ ID No. 12)	217-246	C EAAFNDAIKASTG-GAYESYKFIPALEAAVK	31	3236	4,87	+
Pépt. 5 (SEQ ID No. 13)	252-283	TVATA-PEVKYTVFETALKKAITAM-SEAQKA AKC	33	3501	8,98	-
Pépt. 6 (SEQ ID No. 14)	176-212	C AEEVKVIPAGELQVIEK-VDAAPKVAATAANAAPANDK	38	3853	4,66	+

35

Ejemplo 15: Los péptidos derivados de Phl p 5 carecen de reactividad de IgE y actividad alérgica

15.1. Carencia de reactividad de IgE

40

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

Tabla 4: Caracterización serológica de 29 pacientes alérgicos al polen de gramíneas y un control no alérgico.

Sexo, edad, niveles séricos totales de IgE (kU/L), IgE específica de extracto de fleo de los prados (kUA/L), anticuerpos IgE específicos para rPhl p 5 y los 6 péptidos aislados (P1-P6) y acoplados a KLH (KLH-P1-KLH-P6) se midieron por ELISA y se muestran las DO (densidades ópticas). Los guiones indican la falta de reactividad de IgE para los péptidos aislados, así como los acoplados a KLH.

5

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

Se recubrieron placas de ELISA (Nunc Maxisorp, Dinamarca) con péptidos derivados de Phl p 5 (5 µg/ml) o rPhl p 5 como control (5 µg/ml), se lavaron y se bloquearon. Posteriormente, las placas se incubaron con sueros diluidos 1:3 de 29 pacientes alérgicos al polen de gramíneas y de un individuo no atópico durante la noche a 4 °C. Los pacientes alérgicos al polen de gramíneas que padecen rinoconjuntivitis alérgica y/o asma se seleccionaron de acuerdo con la historia clínica indicativa de polinosis estacional de gramíneas y se caracterizaron mediante ensayo de punción en la piel con extracto de polen de fleo de los prados y ensayos serológicos CAP-FEIA (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suecia). Los niveles de IgE total en los sueros se determinaron mediante mediciones por CAP (Pharmacia). Los anticuerpos IgE específicos para rPhl p 5 se determinaron mediante ELISA. Se usaron sueros de 29 pacientes alérgicos al polen de gramíneas y un individuo no atópico para los estudios de competición de IgE. El grupo de pacientes alérgicos al polen de gramíneas consistió en 13 hombres y 16 mujeres con una edad media de 35 años (entre 25 y 51 años) (Tabla 4).

Los anticuerpos de IgE unidos se detectaron con un anticuerpo de ratón monoclonal anti-IgE humana acoplado con fosfatasa alcalina diluida 1:1000 (Pharmingen, CA).

Los niveles de IgE total y de IgE específica del extracto de polen de gramíneas oscilaron entre 24,9-2000 kU/l (media: 262,7) y 2,2-100 kUA/l (media: 41,5), respectivamente. Todos los pacientes contenían anticuerpos IgE específicos para rPhl p 5 que variaban entre 0,157-2,530 unidades de DO (media: 1,082 unidades de DO), pero ninguno de los 29 pacientes mostró reactividad de IgE a ninguno de los péptidos (P1-P6) o una mezcla equimolar de los péptidos (DO ≤ 0,08). Este resultado demuestra que ningún suero contenía anticuerpos IgE detectables con especificidad para ninguno de los seis péptidos derivados de Phl p 5.

15.2. Actividad alérgica reducida de los péptidos detectada por la expresión de CD 203 c en basófilos: activación de basófilos y citometría de flujo:

5 La regulación positiva de CD 203 c se ha descrito como un marcador sustituto para la activación y desgranulación de basófilos inducida por alérgenos (Hauswirth et al., *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 102). Por tanto, se comparó la actividad alérgica del alérgeno rPhl p 5 completo y una mezcla equimolar de péptidos mediante la medición de la regulación positiva de CD 203 c en basófilos de pacientes alérgicos al polen de gramíneas.

10 Se obtuvieron células de sangre periférica de 3 donantes alérgicos después de haber dado el consentimiento informado. Se incubaron alícuotas de sangre heparinizada (100 µl) con diluciones en serie de alérgenos recombinantes (10⁻⁴ a 10 µg/ml), anticuerpo anti-IgE (1 µg/ml) o tampón de control (solución salina tamponada con fosfato = PBS) durante 15 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS que contenía EDTA 20 mM. Después, las células se incubaron con 10 µl de mAb CD203c conjugado con PE 97A6 durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se lisaron eritrocitos con 2 ml de solución de lisis FACS™. Después, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo de dos colores en un FACScan (Becton Dickinson), usando el software Paint-a-Gate. Se calculó la regulación al alza inducida por alérgenos de CD203c a partir de las intensidades de fluorescencia medias (IFM) obtenidas con células estimuladas (IFMestim) y no estimuladas (IFMcontrol) y se expresó como índice de estimulación (IFMestim:IFMcontrol). Un IE de ≥ 2,0 (≥ 2 veces la regulación positiva) se consideró indicativo de una respuesta específica.

25 Como se muestra en la Figura 14, se descubrió que rPhl p 5 completo muestra un aumento dependiente de la dosis (10⁻⁴ a 10 µg/ml) en la expresión de CD203c en basófilos de sangre periférica en un individuo sensibilizado, mientras que una mezcla equimolar de los péptidos no muestra ningún efecto.

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

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

16.1. Alérgenos recombinantes y extractos de alérgenos

35 Se expresaron Phl p 5 recombinantes purificados en *E. coli* como se describe (Vrtala et al. *J of Immunol* (1993) 151: 4773-4781).

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

16.2. Inmunización de conejos

45 Los péptidos purificados por HPLC se acoplaron a KLH (hemocianina de lapa californiana, PM 4,5x10³-1,3x10⁷, Pierce, EE.UU.) de acuerdo con el consejo del fabricante y se purificaron usando un kit de conjugación (Sigma, EE.UU.).

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

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

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

65

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

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

	anti-P1	anti-P2	anti-P3	anti-P4	anti-P5	anti-P6
rPhl p 5a	1,115	2,418	1,336	1,600	1,540	2,142
<i>Phleum pratense</i>	0,227	1,155	0,955	0,703	1,138	1,000
<i>Lolium perenne</i>	0,056	1,320	0,834	0,238	0,163	2,500
<i>Poa pratensis</i>	0,070	1,491	1,045	1,880	2,200	2,500
<i>Dactylis glomerata</i>	0,060	0,390	0,728	0,689	0,154	0,657
<i>Secale cereale</i>	0,090	0,292	0,777	0,676	0,162	0,843
<i>Triticum aestivum</i>	0,116	1,076	0,734	0,404	0,570	0,703
<i>Avena sativa</i>	0,150	0,790	1,029	0,551	0,224	1,494
<i>Anthoxanthum</i>	0,114	1,209	1,531	0,827	1,114	1,115
<i>Hordeum vulgare</i>	0,080	1,972	1,150	1,184	0,602	1,513

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

La inmunización con cada uno de los péptidos indujo una robusta respuesta de IgG específica para Phl p 5 que se convirtió en detectable cuatro semanas después de la primera inmunización y aumentó después de la segunda inmunización (Figura 13). La inmunización con el péptido 2 indujo la mayor respuesta de IgG específica para Phl p 5 seguida de los péptidos 6, 4, 5 y 1 que indujeron la respuesta más baja. Con la excepción de los anticuerpos anti-péptido 1 que carecían de reactividad con los alérgenos del grupo 5 en *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale* y *Hordeum vulgare*, el otro péptido antisueros reaccionó de forma cruzada con cada uno de los extractos de polen de gramíneas sometidos a ensayo (Tabla 5).

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

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

La información con respecto a la capacidad de los péptidos para inducir anticuerpos bloqueadores es importante puesto que se demostró que los anticuerpos bloqueadores desempeñan una función importante en la inmunoterapia.

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

Las placas de ELISA se recubrieron con rPhl p 5 (1 µg/ml) y se preincubaron con una dilución 1:250 de cada uno de los antisueros anti-péptido (anti-P1-anti-P6), una mezcla de los antisueros anti-péptido, un antisuero anti-rPhl p 5 o con fines de control, con los sueros preinmunes correspondientes o una mezcla de los sueros preinmunes. Después del lavado, las placas se incubaron con sueros diluidos 1:3 de 29 pacientes alérgicos al polen de gramíneas y se detectaron anticuerpos IgE unidos con el anticuerpo de ratón monoclonal anti-IgE humana acoplado a fosfatasa alcalina (Pharmingen). El porcentaje de inhibición de la unión de IgE conseguido mediante la preincubación con los antisueros anti-péptido se calculó como se indica a continuación: % de inhibición de la unión de IgE = $100 - \text{DO}_i / \text{DO}_p \times 100$. DO_i y DO_p representan las extinciones después de la preincubación con el suero inmune y preinmune de conejo, respectivamente. La preincubación de Phl p 5 con IgG de conejo inducida por péptido inhibió la reactividad de IgE de pacientes alérgicos en un grado variable. El grado promedio de inhibición de la unión de IgE osciló entre el 19,3 % para la IgG anti-péptido 6 y el 28,5 % con IgG anti-péptido 1. Los anticuerpos de conejo generados contra Phl p 5 completo indujeron una inhibición media de la unión de IgE del 43,6 %.

Tabla 6: El antisuero anti-péptido Phl p 5 de conejo inhibe la unión de IgE en suero de pacientes alérgicos al polen de fleo de los prados a Phl p 5. El porcentaje de inhibición de la unión de IgE a Phl p 5 se muestra para cada paciente después de la preincubación de Phl p 5 con antisueros anti-péptido (anti-P1 - anti-P6), con una mezcla de los seis antisueros anti-péptido (anti-P1-P6) o con un antisuero anti-rPhl p 5. El porcentaje medio de inhibición se muestra en la línea inferior. N.r.: no realizado.

Paciente	% de inhibición de unión de IgE a Phl p 5 con antisueros específicos para							Phl p 5
	P1	P2	P3	P4	P6	P6	P1-P6	
1	0	5	4	0	0	0	0	n.r.
2	1	10	4	0	0	0	0	n.r.
3	28	35	28	39	37	38	46	50

Paciente	% de inhibición de unión de IgE a Phl p 5 con antisueros específicos para							
	P1	P2	P3	P4	P6	P6	P1-P6	Phl p 5
4	33	40	33	42	35	45	54	20
5	0	0	3	8	8	0	9	n.r.
6	46	34	39	47	47	34	21	56
7	41	48	46	49	50	45	49	60
8	41	8	34	18	39	0	0	8
9	6	0	0	0	0	0	0	n.r.
10	34	46	30	35	39	42	48	38
11	28	0	32	0	28	9	0	n.r.
12	33	0	27	4	33	0	0	n.r.
13	30	31	29	0	29	11	15	0
14	46	14	49	17	47	2	8	15
15	48	44	55	22	46	25	23	72
16	41	0	44	24	41	19	8	28
17	62	71	50	57	49	59	73	82
18	43	17	42	0	32	0	10	0
19	5	17	19	16	7	0	4	n.r.
20	42	54	43	38	38	41	48	65
21	39	51	46	43	43	43	40	39
22	44	49	44	46	44	40	50	70
23	38	54	40	42	46	40	60	66
24	23	0	15	0	0	0	0	n.r.
25	0	35	0	8	4	28	43	n.r.
26	61	26	31	21	24	0	19	n.r.
27	14	15	3	0	9	11		n.r.
28	9	0	17	0	9	0	0	n.r.
29	10	44	11	31	21	28	24	73
media	28,5	25,8	28,2	20,9	27,8	19,3	23,0	43,6

Ejemplo 18: Péptidos derivados de Phl p 5 inducen baja respuestas linfoproliferativas específicas.

18.1. Ensayos de linfoproliferación

5 Con el fin de identificar los péptidos con la menor reactividad posible de linfocitos T para minimizar los efectos secundarios relacionados con la terapia, se examinó la reactividad de linfocitos T mediante ensayos de linfoproliferación. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 2 pacientes alérgicos al polen de gramíneas mediante centrifugación por gradiente de densidad Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido). Se cultivaron CMSP (2×10^5) por triplicado en placas de 96 pocillos (Nunclone; Nalge Nunc International, Dinamarca) en 200 μ l de medio Ultra Culture sin suero (BioWhittaker, Rockland, ME) complementado con L-glutamina 2 mM (SIGMA, EE.UU.), beta-mercaptoetanol 50 μ M (Sigma) y 0,1 mg de gentamicina por ml (SIGMA) a 37 °C y 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Las células se estimularon con diferentes concentraciones de péptidos sintéticos (1,25, 0,6 y 0,3 μ g por pocillo) y, para comparación, con 4 U de interleucina-2 por pocillo (Boehringer Mannheim, Alemania) y con medio solo. Después de 6 días de cultivo, se añadieron 0,5 pCi por pocillo de [³H]timidina (Amersham Pharmacia Biotech) y 16 h después de esto se midió la radiactividad incorporada mediante un recuento de centelleo líquido usando un contador de centelleo microbeta (Wallac ADL, Alemania). Los rpm medios se calcularon a partir de los triplicados y los índices de estimulación (IE) se calcularon como el cociente de los rpm obtenidos por estimulación con antígeno o interleucina 2 y el control sin estimular.

20 Las CMSP de pacientes alérgicos al polen de fleo de los prados se estimularon con diferentes concentraciones de péptidos sintéticos. Los índices de estimulación con péptidos fueron significativamente más bajos que con IL2. Los péptidos derivados de Phl p 5 indujeron respuestas linfoproliferativas específicas bajas. La respuesta más baja se observó con el péptido 5 seguido del péptido 4.

25 Ejemplo comparativo 19: Características de los péptidos sintéticos derivados de Feb d 1

30 Con el fin de obtener péptidos adecuados para la vacunación contra la alergia a los gatos, cinco péptidos que tienen una longitud de 30 a 36 aminoácidos y abarcan la molécula completa se diseñaron de acuerdo con la secuencia de aminoácidos conocida de Fel d 1.

Se sintetizaron péptidos usando una estrategia Fmoc (9-fluorenil-metoxi-carbonil) con activación con HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) (ciclos de 0,1 mmol a pequeña escala) en el sintetizador de péptidos de Applied Biosystems Modelo 433A (EE.UU.9. Se usaron resinas de PEG-PS (poliestireno de polietilenglicol) (0,15-0,2 mmol/g de carga) (PerSeptive Biosystems, Reino Unido) como fase sólida para formar los péptidos. Los productos químicos se adquirieron en Applied Biosystems. El acoplamiento de los aminoácidos se confirmó mediante un control de conductividad en un sistema de control de retroalimentación. Se añadió un resto de cisteína a los péptidos 1, 3, 4 y 5 para facilitar el acoplamiento a los transportadores (Tabla 7). Los péptidos se escindieron de las resinas con una mezcla de 250 µl agua destilada, 250 µl de triisopropilsilano (Fluka, Suiza), 9,5 ml de TFA durante 2 h y se precipitaron en terc-butilmetiléter (Fluka, Suiza) (Focke 2001). La identidad de los péptidos se comprobó mediante espectrometría de masas y los péptidos se purificaron hasta una pureza > 90 % mediante HPLC preparativa (PiChem, Austria).

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

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

Los cinco péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 tienen pesos moleculares en el intervalo de 3246 a 4083 Dalton y tienen puntos isoelectricos calculados de 4,30 a 4,93. Los cinco péptidos son hidrosolubles y los péptidos 1, 2 y 3 pueden contener epítomos de linfocitos T humanos (Tabla 7).

Tabla 8. Reactividad de IgE reducida de péptidos en comparación con rFel d 1

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

Ejemplo comparativo 20: Los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 tienen una reactividad de IgE reducida en comparación con rFel d 1 y los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 carecen de actividad alérgica

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

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

20.1. Capacidad de unión a IgE medida en ensayos ELISA

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

Se sometieron sueros de 7 mujeres y 7 hombres con alergia a los gatos a la edad de 22 a 75 años a determinaciones por CAP-FEIA. Los niveles de IgE total medidos variaron de 122 a >4000 kU/l y los niveles de IgE específica de caspa de gato de 1,99 a >100 kUA/l (Tabla 7). En ensayos de ELISA, la reactividad de IgE de los 14 sueros analizados contra el principal alérgeno de gato Fel d 1 se confirmó. Los resultados se obtuvieron como densidades ópticas (DO) y variaron de 0,178 a 2,838 unidades de DO. La reactividad de IgE de los 14 sueros contra péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 se midió en el mismo ensayo ELISA. Se descubrió que la unión de IgE se mantuvo para los péptidos 1, 2, 3 y 5. Se observó la unión de IgE para 6/14 sueros al Péptido 1, para 3/14 sueros al Péptido 2, para 1/14 sueros al Péptido 3 y para 10/14 sueros al Péptido 5. Las unidades de DO medidas estuvieron entre 0,051 y 1,998 para el Péptido 1, entre 0,060 y 0,123 para el Péptido 2, 0,186 para el Péptido 3 y entre 0,056 y 0,677 para el Péptido 5. En resumen, todas las unidades de DO medidas fueron considerablemente más bajas que los valores respectivos medidos para el alérgeno Fel d 1 completo.

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

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

Puesto que la unión de IgE es un requisito previo, pero no suficiente para la inducción de reacciones alérgicas de tipo 1 que también requieren la reactividad cruzada de IgE específica unida a células efectoras, la actividad alérgica real de los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 se investigó en ensayos de activación de basófilos. Estos ensayos detectan una regulación positiva específica para alérgenos de los marcadores de superficie CD203c y CD63, ambos reconocidos como marcadores para la activación de basófilos (Hauswirth et al. *J Allergy Clin Immunol.* (2002) 110; 102-109).

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

En los basófilos de los cinco pacientes alérgicos a los gatos estudiados (RR, EB, KC, MG y SM), la estimulación con rFel d 1 indujo una regulación positiva específica de alérgeno de los marcadores de superficie CD203c y CD63. Se observó que la regulación positiva de CD203c y CD63 dependía de la dosis en 4 de 5 pacientes (RR, KC, MG y SM). Para estos pacientes, los índices de estimulación de CD203c variaron de 1,1 (SM) a 3,2 (RR) para la concentración más baja sometida a ensayo de 0,001 µg de rFel d 1/ml y de 3,6 (KC) a 6,2 (RR) para la concentración más alta sometida a ensayo de 10 µg de rFel d 1/ml. Los índices de estimulación de CD63 determinados en el mismo ensayo

5 variaron de 1,1 (RR) a 2,0 (MG) para la concentración de rFel d 1 más baja sometida a ensayo de 0,001 µg/ml y de 3,9 (RR) a 7,3 (MG) para la concentración de rFel d 1 más alta sometida a ensayo de 10 µg/ml. Para el paciente EB, 0,001 µg/ml de Fel d 1 ya eran suficientes para inducir una regulación positiva de alto nivel de los marcadores de superficie CD203c y CD63 impidiendo una observación de la dependencia de la dosis de la regulación positiva del marcador de superficie.

10 Se sondaron basófilos de los cinco pacientes alérgicos a los gatos con cinco concentraciones crecientes (0,005, 0,05, 0,5, 5 y 50 µg/ml) de una mezcla equimolar de los cinco péptidos sintéticos derivados de Fel d 1. Los basófilos del paciente RR se sondaron adicionalmente con cinco concentraciones crecientes de los cinco péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 (0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 pg/ml). Se descubrió que los péptidos son deficientes en la regulación positiva de los marcadores de superficie basófilos CD203c y CD63. Los péptidos no pudieron inducir ningún aumento en la expresión de CD203c y CD63 en las células de los pacientes RR, KO y SM. Se pudo detectar una ligera regulación positiva de CD203c (IE = 2,3) y de CD63 (IE = 2,5) para el paciente MG, pero solo para la concentración más alta sometida a ensayo de 50 pg de mezcla de péptidos/ml, mientras que las concentraciones más bajas aplicadas tampoco tuvieron efecto estimulante. Se observó una regulación positiva más pronunciada de CD203c (IE = 4,2) y CD63 (IE = 4,3) para el paciente EB pero, nuevamente, solo para la concentración de mezcla de péptidos más alta sometida a ensayo. En ambos casos, en los pacientes MG y EB, la tasa de regulación positiva después de la estimulación con péptidos fue considerablemente más baja que los valores correspondientes para la estimulación con el alérgeno Fel d 1 completo.

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

25 *Ejemplo comparativo 21: La inmunización con péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 induce anticuerpos IgG reactivos con el alérgeno rFel d1 completo*

30 Se demostró que los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 son deficientes en la unión de IgE. Como moléculas candidatas para la vacunación, que tiene como objetivo la inducción de anticuerpos IgG específicos de alérgenos, los péptidos deben conservar estructuras específicas de alérgenos y aun así deben poder inducir una respuesta inmunitaria de IgG específica para el alérgeno completo. Con el fin de averiguar si los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 cumplen estos requisitos, se realizaron experimentos de inmunización en conejos.

35 Se inmunizaron conejos con rFel d 1 sin acoplar y péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 acoplados con KLH. Los péptidos purificados por HPLC se acoplaron a KLH a través de sus restos de cisteína, usando un kit de conjugación de inmunógeno activado con maleimida Imject (Pierce, EE.UU.).

40 Se inmunizaron conejos (conejos blancos de Nueva Zelanda) con los inmunógenos (200 pg/inyección) usando CFA (primera inmunización) e IFA (primera inyección de refuerzo después de 4 semanas; se administró una segunda inyección de refuerzo con adyuvante incompleto después de 7 semanas) (Charles River Laboratorios de Cría, Alemania). A los conejos se les extrajo sangre 8 semanas después de la primera inmunización y en intervalos de cuatro semanas a partir de entonces.

45 La inducción de anticuerpos específicos de péptido y rFel d 1 se controló en ensayos ELISA. Las placas de ELISA (Nunc Maxisorb, Dinamarca) se recubrieron con rFel d 1 (0,5 pg/pocillo), se lavaron y se bloquearon. Después se sondó el rFel d 1 unido a la placa por duplicado con antisueros de conejo diluidos 1:1000 y los correspondientes sueros preinmunes de conejo y se detectó la IgG unida con un antisuero de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano picante 1:2000 (Jackson ImmunoResearch Inc., EE.UU.). Se calcularon las medias de los duplicados y mostraron errores inferiores al 5 %.

50 La inmunización con péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 induce anticuerpos IgG reactivos contra Fel d 1. Ocho semanas después de la primera inmunización con cada uno de los cinco péptidos sintéticos derivados de Fel d 1, se pudieron detectar anticuerpos IgG reactivos contra el alérgeno Fel d 1 completo en cada uno de los cinco antisueros de conejo. Los niveles de anticuerpo IgG se mantuvieron en niveles comparables en las extracciones de sangre posteriores (Fig. 16).

55 Los antisueros de conejo anti-péptido 1, anti-péptido 2, anti-péptido 4 y anti-péptido 5 mostraron reactividades de IgG contra Fel d 1 en aproximadamente la misma magnitud que el antisuero de conejo anti-Fel d 1. Además, el antisuero de conejo anti-péptido 3 mostró una reactividad de IgG distinta, pero algo inferior contra Fel d 1.

60 Esto indica que los 5 péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 son moléculas candidatas para inducir una respuesta de anticuerpos IgG específica de Fel d 1.

Ejemplo comparativo 22: Los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 induce respuestas linfoproliferativas más débiles que Fel d 1

5 Las moléculas candidatas deseadas para una SIT mejorada no solo ofrecen la ventaja de la reducción de los efectos secundarios mediados por IgE, sino también la reducción de los efectos secundarios mediados por linfocitos T. Con el fin de investigar las propiedades activadoras de linfocitos T de los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1, se realizaron ensayos linfoproliferativos.

10 Las CMSP se aislaron de 7 pacientes alérgicos a los gatos mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido). Las CMSP (2×10^5) se cultivaron por triplicado en placas de 96 pocillos (Nunclone, Nalgene Nunc International, Dinamarca) en un medio Ultra Culture sin suero de 200 pi (Cambrex, Bélgica) complementado con L-glutamina 2 mM (Sigma, EE.UU.), p-mercaptoetanol 50 pM (Sigma) y 0,1 mg de gentamicina por ml (Sigma) a 37 °C usando 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Las células se estimularon con diferentes concentraciones (5, 2,5, 1,25 y 0,6 µg/pocillo) de rFel d 1 y péptidos sintéticos derivados de Fe d 1 como componentes individuales o como mezcla equimolar y, con fines de control, con 4 U de interleucina 2 o con medio solo Después de 6 días de cultivo, se añadieron 0,5 µCi por pocillo de ³H-timidina (Amersham Pharmacia Biotech) y 16 h más tarde, se midió la radiactividad incorporada mediante un recuento de centelleo líquido usando un contador de centelleo microbeta (Wallac ADL, Alemania) y los rpm medios se calcularon a partir de los triplicados. El índice de estimulación (IE) se calculó como el cociente de los rpm obtenidos por estimulación con antígeno o interleucina 2 y el control del medio sin estimular.

25 La proliferación estimulada por IL-2 de CMSP de los 7 pacientes alérgicos a los gatos evaluados, que dio como resultado índices de estimulación de 9,8 para RR, 5,2 para EB, 3,2 para KC, 6,7 para MG, 6,3 para SM, 15,7 para RA y 13,9 para AR.

Los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 indujeron índices de estimulación más bajos (Tabla 9).

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

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

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

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

5 La capacidad de la Ig de conejo inducida por péptidos para inhibir la unión de anticuerpos IgE de pacientes alérgicos para completar rFel d 1 se examinó en ensayos ELISA de competición. Se recubrieron placas de ELISA (Nunc Maxisorb, Dinamarca) con rFel d 1 (0,05 µg/pocillo), se lavaron y se bloquearon. Después, se preincubó rFel d 1
10 unido a la placa con antisueros anti-péptido de conejo diluidos 1:100 (se usaron antisueros anti-péptido únicos, así como una mezcla de antisueros anti-péptido), antisuero de conejo anti-FFd d1 y, con fines de control, también con los respectivos sueros de conejo preinmunes. Después de lavar las placas, se incubaron con sueros humanos diluidos
15 1:5 de pacientes alérgicos a los gatos. Los anticuerpos IgE unidos se detectaron con un anticuerpo anti-IgE humana marcado con peroxidasa de rábano picante diluido 1:2500 (KPL, EE.UU.). El porcentaje de inhibición de la unión de IgE se consiguió mediante la preincubación con los antisueros anti-peptido, calculados como se indica a continuación: % de inhibición de la unión de IgE = $100 - \frac{D.O._i}{D.O._p} \times 100$, siendo D.O._i la densidad óptica medida después de la preincubación con sueros inmunes de conejo y D.O._p con sueros preinmunes de conejo.

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

También el intervalo de inhibición mostró variaciones entre los diferentes antisueros. Entre los antisueros de conejo
25 anti-péptido sometidos a ensayo, el antisuero de conejo anti-péptido 1 mostró las mejores tasas de inhibición con inhibiciones del 0-55 % (promedio del 29 %). Con antisuero de conejo anti-péptido 2 se podrían conseguir tasas de inhibición del 0-18 % (promedio del 5 %), con antisuero de conejo anti-péptido 3 del 0-29 % (promedio del 11 %), con antisuero de conejo anti-péptido 4 del 0-24 % (promedio del 8 %) y con antisuero de conejo anti-péptido 5 del 0-18 % (promedio del 4 %).

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

35 Tabla 10: Los antisueros de conejo generados contra los péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 inhiben la unión de IgE humana a Fel d 1. El porcentaje de inhibición de la unión de IgE a Fel d 1 conseguido por la preincubación de Fel d 1 con antisueros de conejo se muestra para 14 pacientes y como medias. Las preincubaciones se realizaron con 5 antisueros de conejo generados contra los 5 péptidos sintéticos derivados de Fel d 1 (anti-péptido 1-5), una
40 mezcla de los 5 antisueros anti-péptido (Mezcla) y un antisuero generado contra Fel d 1 (anti-rFel d 1),

Paciente	Anti-péptido 1	Anti-péptido 2	Anti-péptido 3	Anti-péptido 4	Anti-péptido 5	Mezcla de	Anti-rFel d 1
						los 5 antisueros anti-péptido	
1	48	18	29	20	18	78	64
2	24	0	8	0	0	67	43
3	55	11	5	17	8	84	74
4	38	7	11	24	8	66	49
5	10	5	5	12	0	54	48

Paciente	Anti-péptido 1	Anti-péptido 2	Anti-péptido 3	Anti-péptido 4	Anti-péptido 5	Mezcla de los 5 antisueros anti-péptido	Anti-rFeld 1
6	33	0	12	5	0	68	46
7	6	1	10	5	0	58	45
8	44	3	17	10	0	60	53
9	26	17	12	15	16	53	43
10	0	0	10	0	0	31	26
11	38	0	0	0	0	52	56
12	47	0	22	0	7	75	51
13	27	2	8	0	0	56	41
14	16	0	6	5	0	25	25
Medio	29	5	11	8	4	59	47

Cuando el antisuero de conejo anti-péptido 1 se combinó con cada uno de los otros antisueros anti-péptido, la inhibición de la unión de IgE de pacientes alérgicos aumentó sustancialmente hasta alcanzar casi los valores (por ejemplo, anti-péptido 1 + 4: 41 %, anti-péptido 14-5: 42 %) obtenido con anticuerpos anti-rFeld 1 (57 %) (Tabla 11).

5

Tabla 11:

Paciente	anti-péptido 1 + anti-péptido 2	anti-péptido 1 + anti-péptido 3	anti-péptido 1 + anti-péptido 4	anti-péptido 1 + anti-péptido 5	anti-rFeld 1
1	61	49	61	63	75
2	24	17	28	28	74
3	60	52	62	57	86
4	43	33	43	40	68
5	17	9	27	30	67
6	37	24	42	46	73
7	26	21	36	34	74
8	51	46	53	55	72
9	40	28	46	43	61
10	16	11	30	34	40
11	45	35	47	45	78
12	52	40	56	59	76
13	29	17	29	32	62
14	7	10	14	16	28
Medio	36	28	41	42	67

Ejemplo comparativo 24: Los péptidos derivados de Bet v 1 inducen respuestas de IgG específicas para Bet v 1 que reciben ayuda de linfocitos T de epítomos de linfocitos T derivados de transportadores y reducen la proliferación de linfocitos T específicos de Bet v 1.

10

Ya se ha demostrado que los péptidos de células B derivados de Bet v 1 expuestos en la superficie inducen una respuesta de IgG específica para Bet v 1 protectora en un modelo de ratón de vacunación terapéutica y profiláctica (Focke M et al. *Clin Exp Allergy* (2004) 34: 1525-1533). En Focke M et al. (2004), 6 péptidos derivados de Bet v 1 se acoplaron a la molécula transportadora KLH antes de la inmunización de los ratones. En el presente ejemplo, se demuestra que la respuesta de IgG específica para Bet v 1 inducida con estos péptidos (Tabla 1) está impulsada por la ayuda de epítomos de linfocitos T derivados del transportador, pero no del alérgeno Bet v 1. Sorprendentemente se descubrió que ninguno de los péptidos derivados de Bet v 1 que tienen las secuencias LFPKVAPQAISVENIEGNGGPGTIKKISF (SEQ ID No. 20), GPGTIK-KISFPEGFPFKYVKDRVDEVD-HTN (SEQ ID No. 21) y VDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK (SEQ ID No. 22) indujo respuestas de linfocitos T relevantes y se pudo demostrar que la mayoría de las respuestas de linfocitos T estaban dirigidas contra la molécula transportadora, KLH

15

20

(Figuras 18 y 19). Este hallazgo es de gran importancia para la reducción de los efectos secundarios durante la vacunación terapéutica y para reducir el riesgo de una posible sensibilización durante la vacunación profiláctica. Se ha demostrado en el pasado que los péptidos derivados de alérgenos que carecen de reactividad de IgE pero que contienen epítomos de linfocitos T derivados de alérgenos indujeron efectos secundarios debido a la activación de los linfocitos T. Los péptidos derivados de alérgenos que carecen de reactividad de IgE y de linfocitos T como se ejemplifica para los péptidos Bet v 1, no inducen efectos secundarios mediados por IgE ni por linfocitos T durante la vacunación terapéutica. Cuando se usan para la vacunación profiláctica, los péptidos inducirán una respuesta de IgG protectora específica para Bet v 1 sin la sensibilización de los linfocitos T específicos para Bet v 1. Esto debería minimizar el riesgo de pre-sensibilizar una respuesta inmunitaria alérgica a través de la vacuna que podría allanar el camino para una sensibilización alérgica posterior.

En este ejemplo, se diseccionaron las respuestas de linfocitos T específicos de alérgenos y de transportadores en un modelo de ratón de vacunación con alérgenos profilácticos y terapéuticos. Los péptidos 2,3 y 6 derivados de Bet v 1 (Focke M et al. (2004)) se seleccionaron y se sometieron a un ensayo para determinar si contienen alguno de los epítomos de linfocitos T específicos de Bet v 1 conocidos en ratones BALB/c. Los ratones se inmunizaron como se indica a continuación (la Tabla 10 muestra el protocolo de sensibilización y tratamiento): se inmunizaron grupos de ratones BALB/c (n = 5) con 10 µg de Bet v 1 recombinante (Biomay, Austria) y/o una mezcla de péptidos 2, 3 y 6 sintéticos derivados de Bet v 1 (10 µg de cada uno). Los péptidos se acoplaron a KLH como se ha descrito anteriormente (Focke M et al. (2004)). Para la inmunización, Bet v 1 y la mezcla de péptidos se adsorbieron a hidróxido de aluminio (Alu-Gel-S, Serva, Alemania) en un volumen total de 150 µl/ ratón.

Tabla 12: Protocolo de sensibilización y tratamiento.

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

Se analizó la linfoproliferación específica de alérgenos, péptidos y transportador en un ensayo de proliferación de linfocitos T. Se retiraron los bazos en condiciones estériles y se homogeneizaron. Después de la lisis de los eritrocitos, las células se lavaron y se resuspendieron en medio completo (RPMI, suero de ternera fetal al 10 %, 0,1 mg/ml de gentamicina, glutamina 2 mM). Las suspensiones de células individuales se colocaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos a una concentración de 2×10^5 células/pocillo y se estimularon con concavalina A (0,5 µg/pocillo) como control positivo, rBet v 1 (2 µg/pocillo), KLH (2 µg/pocillo), la mezcla de péptido (0,34 µg de cada péptido/pocillo) o el medio solo durante 4 días. Los cultivos se pulsaron con 0,5 pCi/pocillo de timidina tritiada durante 16 h y se recogieron. Las respuestas de proliferación se midieron por recuento de centelleo. Se calculó la relación de la proliferación media después de la estimulación del antígeno y los valores de control de medio, es decir, el índice de estimulación (IE).

Curiosamente, se pudo demostrar que la vacunación terapéutica con péptidos derivados de Bet v 1 pudo reducir la proliferación específica de Bet v 1 en ratones sensibilizados con Bet v 1 (grupo S+/T+) en comparación con el grupo S+/T- sensibilizado, pero sin tratar. En el grupo tratado y sensibilizado no se pudo medir ninguna proliferación específica de péptido, pero de acuerdo con el efecto del transportador, se observó una proliferación específica de KLH. La vacuna peptídica sola (grupo S-/T+) indujo principalmente linfocitos T específicos de KLH, pero casi ninguna respuesta de linfocitos T específicos de Bet v 1 (Figura 18).

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

Por tanto, se podría demostrar en un modelo de ratón de alergia que la vacunación profiláctica con péptidos de células B derivadas de alérgenos unidos al transportador no sensibilizó linfocitos T específicos de péptidos, casi ningún linfocito T específico de alérgenos sino linfocitos T específicos de transportadores. La vacunación profiláctica que precede a la sensibilización alérgica, pero además la vacunación terapéutica de ratones sensibilizados, reduce la proliferación de linfocitos T específicos de alérgenos.

El tratamiento profiláctico con péptidos derivados de Bet v 1 indujo respuestas de IgG específicas para Bet v 1 sin ayuda de linfocitos T específicos de Bet v 1. Además, el tratamiento profiláctico aumentó las respuestas de IgG específicas para Bet v 1 inducidas por el alérgeno Bet v 1 ya 20 y 40 días después de la primera sensibilización (Figura 20).

Estos resultados demuestran que la vacuna peptídica induce una respuesta de IgG específica para Bet v 1 que puede ser estimulada por la exposición al alérgeno.

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

La capacidad de unión a IgE de los péptidos derivados de Der p 2 se determinó como se describe en los ejemplos 15.1 y 20.1 empleando los péptidos de acuerdo con la tabla 13 y usando sueros de individuos que padecen alergia al ácaro del polvo doméstico.

Tabla 13: Péptidos derivados de Der p 2

Péptido	Posición	Secuencia	SEQ 10 No.
Der p 2 Pep 1	1-33	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGK	96
Der p 2 Pep 2	21-51	CHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNSKTAK	517
Der p 2 Pep 3	42-73	EANQNSKTAKIEIKASIEGLEVDVPGIDPNAC	98
Der p 2 Pep 4	62-103	EVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGGQYDIKYTWIVP- KIAPKSEN	99
Der p 2 Pep 5	98-129	APKSENVVTVKVMGDNGVLACAIATHAKIRD	100

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

Tabla 14: Resultados

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

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

26.1. Diseño de péptidos

Para estudiar el efecto de la variación en la longitud de los péptidos sobre la capacidad de unión de IgE, la reactividad de los linfocitos T y la inmunogenia se diseñaron variantes de péptidos derivados de Phl p 5 aumentando la longitud del péptido 1 (P1) y disminuyendo la longitud del péptido 2 (P2) en unos pocos aminoácidos (Tabla 15).

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

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

	Posición de aa	Secuencia	Número de aa	Peso Molecular (PM)
Péptido 1	98-128	CGAASNKAFAEGLSGEPKGA AESS SKAALTSK	32	3026
1a	93-128	CFVATFGAASNKAFAEGLSGEPKGA AESS SKAALTSK	37	3592
Péptido 2	26-68	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAPAGKC	34	3068
2b	28-53	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAC	29	2644

26.2. Falta de reactividad de IgE

Para analizar la reactividad de IgE de los péptidos derivados de Phl p 5 1, 2 y sus variantes 1a, 2b, se realizaron ensayos de transferencia puntual aplicando 0,24 g de péptido/punto y usando sueros de 7 pacientes alérgicos al polen de gramíneas (p1-p7) y el suero de un individuo no atópico (SHN). La IgE unida se detectó con anticuerpo anti-IgE humana marcado con 125 I (Phadia, Uppsala, Suecia). Se usó rPhl p 5 como control positivo y HSA como control negativo. Los pacientes reaccionan con rPhl p 5 pero no con los péptidos y las variantes de los péptidos (Fig.

21).

26.3. Respuestas linfoproliferativas

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

26.4. Inmunogenia de las variantes peptídicas

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

15 Tabla 16: Reactividad cruzada de antisueros anti-péptido Phl p 5 generados en conejos mediante inmunización con péptidos conjugados con KLH. Se muestran las reactividades de IgG de antisueros peptídicos contra péptidos (1, 2) y variantes (1a, 2b). No se observó ninguna reactividad con sueros preinmunes (pre P1, pre P1a, pre P2, pre P2b)

20 a. El antisuero anti-péptido 1 (anti-P1) reacciona de forma cruzada con la variante de péptido 1 (1a) y el antisuero anti-péptido 1a (anti-P1a) reacciona de forma cruzada con el péptido 1.

b. El antisuero anti-péptido 2 (anti-P2) reacciona de forma cruzada con la variante de péptido 2 (2b) y el antisuero anti-péptido 2b (anti-P2b) reacciona de forma cruzada con el péptido 2.

25 Tabla 16: Reactividad cruzada de antisueros de conejo

a)

	pre P1	anti-P1	pre P1a	anti-P1a
P1	0,041	0,880	0,052	0,947
P1a	0,038	0,705	0,048	0,859

b)

	pre P2	anti-P2	pre P2b	anti-P2b
P2	0,089	1,168	0,042	1,175
P2b	0,075	0,954	0,063	1,122

30 **26.5. Los antisueros de conejo inducidos por péptidos inhiben la unión de IgE de pacientes alérgicos al polen de gramíneas a rPhl p 5**

35 La capacidad de las IgG anti-péptido 2 y 2b de conejo para inhibir la unión de IgE humana a rPhl p 5 se estudió en ELISA de competición. La placa ELISA unida a rPhl p 5 se preincubó con antisueros anti-P2, anti-P2b y, con fines de control, con anti-Phl p 5. Después, las placas se expusieron a sueros de 12 pacientes alérgicos al polen de gramíneas. El porcentaje de inhibición de la unión de IgE a rPhl p 5 se muestra en la Tabla 17. Los antisueros anti-péptido 2 y anti-péptido 2b inhiben la unión de IgE de los pacientes a rPhl p 5 en la misma medida.

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

45 Tabla 17: Inhibición de la unión de IgE de los pacientes a rPhl p 5 por antisueros anti-péptido. Los antisueros anti-péptido 2 y anti-péptido 2b inhiben la unión de IgE de los pacientes a rPhl p 5 en el mismo grado. El rPhl p 5 unido a la placa de ELISA se preincubó con antisueros anti-P2, anti-P2b y, con fines de control, con antisuero anti-Phl p 5. Las placas se expusieron después a sueros de 12 pacientes alérgicos al polen de gramíneas. Se muestra el porcentaje de inhibición de la unión de IgE a rPhl p 5.

50 Tabla 17: % de inhibición de unión a IgE

Paciente	anti-P2	anti-P2b	anti-Phl p 6
1	33,38	24,40	84,77
2	52,20	57,40	87,00

Paciente	anti-P2	anti-P2b	anti-Phl p 6
3	52,70	54,85	90,81
4	51,44	59,16	78,26
5	43,19	49,15	77,93
6	47,04	62,02	83,68
7	62,67	58,00	76,62
8	52,36	50,27	74,44
9	57,63	50,91	88,13
10	35,10	37,99	75,03
11	44,44	41,24	68,39
12	47,56	45,41	77,34

Ejemplo comparativo 27: Protección cruzada de anticuerpos anti-VP1

5 Los rinovirus humanos comprenden más de cien cepas diferentes. En este ensayo de neutralización, se demuestra que la infección por rinovirus de una cepa también puede inhibirse por anticuerpos específicos de VP1 de otra cepa. Se sembraron células HeLa en pocillos a igual densidad. Se preincubó HRV14 100DCT" con diluciones de anticuerpos anti-14VP1 y anti-89VP1 (sin diluir; 1:2-1:32 pocillos 1-6) y se añadió a los pocillos en las calles A y D, respectivamente. En las calles 3 y C se añadió a las células HRV 89 100DCT" preincubado con diluciones de anticuerpos anti-14VP1 y anti-89VP1, respectivamente. Después de 3 días las células vivas se tiñeron de violeta.

10 Los anticuerpos anti-89VP1 y los anticuerpos anti14VP1 bloquearon la infección de HRV14 de una manera comparable. Los anticuerpos generados contra 14VP1 y 89VP1 también inhibieron la infección de HRV89 hasta la misma concentración.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Biomay AG

<120> Transportador de vacuna

20 <130> 47337

<150> AT A 994/2006

<151> 09-06-2006

25 <160> 142

<170> PatentIn version 3.4

30 <210> 1

<211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Cebador

<400> 1

cggaattcat taatatgaac ccagttgaaa attatataga tagtgtatta 50

40 <210> 2

<211> 46

<212> ADN

<213> Artificial

45 <220>

<223> Cebador

<400> 2

cgattaattc agtgggtggtg ggggtggggg acgtttgtaa cggtaa 46

50 <210> 3

ES 2 698 525 T3

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 3
 10 cttaagaag gagatatact taagatgaac ccagttg 37
 <210> 4
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 4
 20 caactgggtt catcttaagt atatctcctt cttaaag 37
 <210> 5
 <211> 33
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 5
 cctgatgttt ttaccgttac aaacgtccac cac 33
 <210> 6
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 6
 gtggtggacg tttgtaccgg taaaacatc agg 33
 <210> 7
 <211> 34
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador
 <400> 7
 cgcgcttaag atggtccgct acaccaccga gggc 34
 55 <210> 8
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 65 cgcgcttaag cttgactcg taggcggtgt cggc 34
 <210> 9

ES 2 698 525 T3

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

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

<400> 9

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

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

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

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

20 <400> 10

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

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

Lys Cys

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

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

<400> 11

Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala
1 5 10 15

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

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

40 <220>
<223> Molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5

45 <400> 12

ES 2 698 525 T3

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

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

- 5 <210> 13
- <211> 33
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5

- <400> 13

Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala
1 5 10 15

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

Cys

- 15 <210> 14
- <211> 38
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 20 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5

- <400> 14

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

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

Ala Pro Ala Asn Asp Lys
35

- 25 <210> 15
- <211> 35
- <212> PRT
- 30 <213> Artificial

- <220>
- <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1

- 35 <400> 15

ES 2 698 525 T3

Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly
 1 5 10 15

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

Val Val Cys
 35

5 <210> 16
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1
 <400> 16

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

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

Ser Pro Leu Cys
 35

15 <210> 17
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1
 <400> 17

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

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

Asn Ala Cys
 35

25 <210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1
 <400> 18

ES 2 698 525 T3

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

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

5 <210> 19
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1
 <400> 19

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

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

15 <210> 20
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Bet v 1
 <400> 20

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

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

25 <210> 21
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Bet v 1
 <400> 21

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

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

40 <210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 698 525 T3

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Bet v 1

<400> 22

5

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

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

<210> 23

<211> 40

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 1

15

<400> 23

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

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

Glu Gly Thr Tyr Tyr Asn Ser Leu
35 40

20

<210> 24

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 1

<400> 24

Gly Phe Asn Ile Lys Ala Thr Asn Gly Gly Thr Leu Asp Phe Thr Cys
1 5 10 15

Ser Ala Gln Ala Asp Lys Leu Glu Asp His Lys Trp Tyr Ser Cys Gly
20 25 30

Glu Asn Ser Phe Met
35

30

<210> 25

<211> 30

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 1

ES 2 698 525 T3

<400> 25

Glu Asn Ser Phe Met Asp Phe Ser Phe Asp Ser Asp Arg Ser Gly Leu
1 5 10 15

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

5 <210> 26
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 1

<400> 26

Thr Ala Thr Leu Pro Asn Tyr Cys Arg Ala Gly Gly Asn Gly Pro Lys
1 5 10 15

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

Leu Pro Lys Ser Ser
35

15 <210> 27
<211> 40
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 2

25 <400> 27

Met His Ser Ser Asn Asn Phe Phe Lys Asp Asn Ile Phe Arg Ser Leu
1 5 10 15

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

Arg Leu His Trp Asp Trp Ala Gln
35 40

30 <210> 28
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 2

35 <400> 28

ES 2 698 525 T3

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

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

Lys Gly Arg Asn Gly Phe Lys Arg
 35 40

5 <210> 29
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 2
 <400> 29

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

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

Asn Thr Asp Leu Glu Tyr Ala Ala
 35 40

15 <210> 30
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 2
 <400> 30

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

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

25 Glu Pro Glu Leu Thr Val Tyr Thr
 35 40

30 <210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 2
 35 <400> 31

ES 2 698 525 T3

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

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

5 <210> 32
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 6
 <400> 32

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

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

Ala Ile

15 <210> 33
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 6
 <400> 33

Val Thr Glu Thr Gly Leu His Arg Ala Ile Val Pro Ser Gly Ala Ser
 1 5 10 15

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

Trp Gly Gly Lys Gly Val Thr Lys

25 35 40

30 <210> 34
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

35 <400> 34

ES 2 698 525 T3

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

Val Asp Ala Phe Leu Asn Lys Leu Asp Gly Thr Thr Asn Lys Thr Asn
 20 25 30

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

5 <210> 35
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 6
 <400> 35

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

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

Gly Ser His Ala Gly Gly Arg Leu Ala
 35 40

15 <210> 36
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 6
 <400> 36

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

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

25 Gly Asn Val Gly Asp Glu Gly Gly
 35 40

30 <210> 37
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 6
 35 <400> 37

ES 2 698 525 T3

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

Glu Lys Lys Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Asn Pro Asp Ser Asp Lys Ser
 20 25 30

Lys Trp Leu Thr Tyr Glu Gln Leu
 35 40

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

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 6
 <400> 38

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

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

Val Thr Asn Pro Glu Phe Ile Lys
 35 40

<210> 39
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 6
 <400> 39

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

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

Arg Ser Gly Gln Ile Lys Thr Gly
 35 40

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

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Alt a 6
 <400> 40

ES 2 698 525 T3

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

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

Arg Thr Ala Val Asn Leu
35

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

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

<400> 41

Glu Ile Leu Pro Val Asn Glu Thr Arg Arg Leu Thr Thr Ser Gly Ala
1 5 10 15

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

Asn Arg Lys Ala Leu Ala Asp Cys
35 40

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

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

<400> 42

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

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

Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Glu
35 40

<210> 43
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 43

ES 2 698 525 T3

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

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

5 <210> 44
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Amb a 1
 <400> 44

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

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

Ser Asp Gly Asp Ala Ile Ser Ile Ser
 35 40

15 <210> 45
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Amb a 1
 <400> 45

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

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

Met Leu Ala Thr Val Ala Phe
 35

30 <210> 46
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Amb a 1
 <400> 46

ES 2 698 525 T3

Asn Thr Phe Thr Asp Asn Val Asp Gln Arg Met Pro Arg Cys Arg His
 1 5 10 15

Gly Phe Phe Gln Val Val Asn Asn Asn Tyr Asp Lys Trp Gly Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Gly Ser
 35

5 <210> 47
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Amb a 1
 <400> 47

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

Lys Asn Val Leu Gly Arg His Gly Glu Ala Ala Ala Glu Ser Met Lys
 20 25 30

Trp Asn Trp Arg Thr Asn Lys Asp Val Leu Glu Asn Gly Ala
 35 40 45

15 <210> 48
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Amb a 1
 <400> 48

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

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

Leu Ser Cys Gln Pro Gly Ala Pro Cys
 35 40

25 <210> 49
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Art v 1

35 <400> 49

ES 2 698 525 T3

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

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

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

5 <210> 50
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Art v 1
 <400> 50

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

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

15 <210> 51
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Art v 1
 <400> 51

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

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

Gly Ser Pro Pro Pro Pro Ser Thr His
 35 40

30 <210> 52
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 1
 <400> 52

ES 2 698 525 T3

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

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

Asp Ser Val Thr Pro Met
 35

5 <210> 53
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 1
 <400> 53

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

Glu Ala Lys Ile Thr Met Leu Thr Asn Gly Gln Cys Gln Asn Ile Thr
 20 25 30

Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu
 35 40

15 <210> 54
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 1
 <400> 54

Cys Gln Asn Ile Thr Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu Pro Gly Lys
 1 5 10 15

Tyr Thr Ala Tyr Glu Gly Gln Arg Val Val Phe Ile Gln Pro Ser Pro
 20 25 30

Val Arg Asp His Tyr Ile Leu Tyr Cys
 35 40

30 <210> 55
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 1
 <400> 55

ES 2 698 525 T3

Gln Pro Ser Pro Val Arg Asp His Tyr Ile Leu Tyr Cys Glu Gly Glu
1 5 10 15

Leu His Gly Arg Gln Ile Arg Met Ala Lys Leu Leu Gly Arg Asp Pro
20 25 30

Glu Gln Ser Gln Glu Ala Leu Glu
35 40

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

<220>
<223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 1
<400> 56

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

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

Glu Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gln
35 40

<210> 57
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 2
<400> 57

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

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

Lys Pro Trp Gly His Phe Arg Val
35 40

<210> 58
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 2

<400> 58

ES 2 698 525 T3

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

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

Lys Val Ser Leu Thr Ala Phe Lys
 35 40

5 <210> 59
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 2
 <400> 59

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

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

Asp Pro Lys Ser Tyr Leu
 35

15 <210> 60
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 2
 <400> 60

Asn Asp Leu Tyr Leu Ala Glu Val Asp Pro Lys Ser Tyr Leu Ile Leu
 1 5 10 15

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

Met Val Arg Asp Leu Ser Arg
 35

30 <210> 61
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Can f 2
 <400> 61

ES 2 698 525 T3

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

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2
 <400> 62

Glu Ala His Gln Ser Glu Ile Ala His Arg Phe Asn Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

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

Gln Cys

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

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2
 <400> 63

Cys Thr Val Ala Ser Leu Arg Asp Lys Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
 1 5 10 15

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

Asp Asp Asn
 35

<210> 64
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2
 <400> 64

ES 2 698 525 T3

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

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

<210> 65
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 65

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

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

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

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

<400> 66

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

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

<210> 67
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 67

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

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

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

ES 2 698 525 T3

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2

<400> 68

5

Glu Lys Gln Ile Lys Lys Gln Ser Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His
1 5 10 15

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

<210> 69

<211> 30

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2

15

<400> 69

Val Asp Lys Cys Cys Ala Ala Glu Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala Glu
1 5 10 15

20

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

<210> 70

<211> 42

25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2

30

<400> 70

Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe
1 5 10 15

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

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

35

<210> 71

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2

<400> 71

ES 2 698 525 T3

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

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

Arg Phe Leu Gly Lys Tyr Leu Tyr Glu
 35 40

5 <210> 72
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2
 <400> 72

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

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

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

20 <210> 73
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2
 25 <400> 73

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

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

Ser Lys Leu Val Thr Asp
 35

30 <210> 74
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2
 35 <400> 74

ES 2 698 525 T3

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

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

Leu Ala Lys Tyr Ile Cys
35

<210> 75
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 75

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

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

Glu Asp Lys Glu Val Cys
35

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

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

<400> 76

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

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

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

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

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

<400> 77

ES 2 698 525 T3

Cys Thr His Pro Glu Ala Glu Arg Leu Ser Cys Ala Glu Asp Tyr Leu
 1 5 10 15

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

Ser Glu Arg Val Thr Lys Cys
 35

5 <210> 78
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 2
 <400> 78

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

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

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

15 <210> 79
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Ole e 1
 <400> 79

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

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

Phe Ile Pro Gly Ala Ser Leu Arg
 35 40

25 <210> 80
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Ole e 1
 35 <400> 80

ES 2 698 525 T3

Gly Ala Ser Leu Arg Leu Gln Cys Lys Asp Lys Glu Asn Gly Asp Val
 1 5 10 15

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

<210> 81
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Ole e 1

<400> 81

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

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

Thr Glu Gly Trp Ala
 35

<210> 82
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Ole e 1

<400> 82

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

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

Asn Pro Leu
 35

<210> 83
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Ole e 1

<400> 83

ES 2 698 525 T3

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

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

Gly Met Tyr Pro Pro Asn Met
 35

<210> 84
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Par j 2
 <400> 84

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

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

<210> 85
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Par j 2
 <400> 85

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

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

Lys Arg Glu Ala
 35

<210> 86
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Par j 2
 <400> 86

ES 2 698 525 T3

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

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

Ser Gly Ile Lys Asn
 35

5 <210> 87
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Par j 2
 <400> 87

Glu Leu Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr Leu
 1 5 10 15

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

Phe Arg Gly Tyr Tyr
 35

15 <210> 88
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 1
 <400> 88

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15

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

25 <210> 89
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 1

35 <400> 89

ES 2 698 525 T3

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

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

Gln

5 <210> 90
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 1
 <400> 90

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

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

15 <210> 91
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 1
 <400> 91

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

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

25 Leu Ala Gln Thr His
 35

30 <210> 92
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 1
 35 <400> 92

ES 2 698 525 T3

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

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

5 <210> 93
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 1
 <400> 93

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

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

Ile

20 <210> 94
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 1
 <400> 94

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

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

Asn Ile

30 <210> 95
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 1
 <400> 95

ES 2 698 525 T3

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

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

Val Ile Leu
 35

5 <210> 96
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 2
 <400> 96

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

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

Lys

15 <210> 97
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 2
 <400> 97

Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile His Arg Gly Lys Pro Phe Gln
 1 5 10 15

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

25 <210> 98
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 2

35 <400> 98

ES 2 698 525 T3

Glu Ala Asn Gln Asn Ser Lys Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser
1 5 10 15

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

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

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

<400> 99

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

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

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

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

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

<400> 100

Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp
1 5 10 15

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

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

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

<400> 101

ES 2 698 525 T3

Met Glu Asp Lys Lys His Asp Tyr Gln Asn Glu Phe Asp Phe Leu Leu
 1 5 10 15

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

Tyr Leu Gln
 35

5 <210> 102
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 5
 <400> 102

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

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

15 Met Asp Thr Ile
 35

20 <210> 103
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 5
 <400> 103

Asp Gly Val Arg Gly Val Leu Asp Arg Leu Met Gln Arg Lys Asp Leu
 1 5 10 15

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

30 <210> 104
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 5
 <400> 104

ES 2 698 525 T3

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

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

Lys Ile Glu Val
 35

5 <210> 105
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 7
 <400> 105

Asp Pro Ile His Tyr Asp Lys Ile Thr Glu Glu Ile Asn Lys Ala Val
 1 5 10 15

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

15 <210> 106
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 7
 <400> 106

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

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

25 <210> 107
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 7
 35 <400> 107

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

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

ES 2 698 525 T3

<210> 108
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 7
 <400> 108
 10
 Val His Asp Asp Val Val Ser Met Glu Tyr Asp Leu Ala Tyr Lys Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Leu His Pro Asn Thr His Val Ile Ser Asp Ile Gln Asp Phe
 20 25 30
 Val Val Glu Leu
 35
 <210> 109
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 7
 20
 <400> 109
 Leu Ser Leu Glu Val Ser Glu Glu Gly Asn Met Thr Leu Thr Ser Phe
 1 5 10 15
 Glu Val Arg Gln Phe Ala Asn Val Val Asn His Ile Gly Gly Leu
 20 25 30
 25
 <210> 110
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 7
 <400> 110
 Leu Ser Asp Val Leu Thr Ala Ile Phe Gln Asp Thr Val Arg Ala Glu
 1 5 10 15
 Met Thr Lys Val Leu Ala Pro Ala Phe Lys Lys Glu Leu Glu Arg Asn
 20 25 30
 35
 Asn Gln
 <210> 111
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40

ES 2 698 525 T3

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 10

<400> 111

5

Met Glu Ala Ile Lys Lys Lys Met Gln Ala Met Lys Leu Glu Lys Asp
1 5 10 15

Asn Ala Ile Asp Arg Ala Glu Ile Ala Glu Gln Lys Ala Arg Asp Ala
20 25 30

Asn Leu Arg
35

<210> 112

<211> 35

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 10

15

<400> 112

Ala Glu Lys Ser Glu Glu Glu Val Arg Ala Leu Gln Lys Lys Ile Gln
1 5 10 15

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

Asn Thr Lys
35

20

<210> 113

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 10

<400> 113

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

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

Glu Glu Arg Leu Lys Ile Ala Thr
35 40

30

<210> 114

<211> 35

<212> PRT

35

<213> Artificial

ES 2 698 525 T3

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 10

<400> 114

5

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

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

Gly Leu Glu
35

<210> 115

<211> 31

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 10

15

<400> 115

Arg Met Glu Gly Leu Glu Asn Gln Leu Lys Glu Ala Arg Met Met Ala
1 5 10 15

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

20

<210> 116

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 10

<400> 116

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

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

30

<210> 117

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 10

40

<400> 117

ES 2 698 525 T3

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

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

Ala Glu Arg Ser Val Gln Lys Leu Gln
 35 40

5 <210> 118
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 10
 <400> 118

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

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

Thr Gly Tyr
 35

15 <210> 119
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 21
 <400> 119

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

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

Lys Gly Leu
 35

30 <210> 120
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 21
 <400> 120

ES 2 698 525 T3

Leu His Leu Ser Glu Gln Tyr Lys Glu Leu Glu Lys Thr Lys Ser Lys
 1 5 10 15

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

Met Lys Gly Ala Leu
 35

5 <210> 121
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 21
 <400> 121

Gly Ala Leu Lys Phe Phe Glu Met Glu Ala Lys Arg Thr Asp Leu Asn
 1 5 10 15

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

15 <210> 122
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Der p 21
 <400> 122

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Clon 30

35 <400> 123

ES 2 698 525 T3

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

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

5 <210> 124
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Clon 30
 <400> 124

Pro Thr Thr Thr Glu Gln Pro Asp Asp Lys Phe Glu Cys Pro Ser Arg
 1 5 10 15

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

Ser Asn

15 <210> 125
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Clon 30
 <400> 125

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

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

Glu Asp Glu Glu Thr Cys Thr
 35

25 <210> 126
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Bet v 1

35 <400> 126

ES 2 698 525 T3

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

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

5 <210> 127
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Bet v 1
 <400> 127

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

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

20 <210> 128
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Bet v 1
 25 <400> 128

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

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

30 <210> 129
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1 cadena 1
 <400> 129

Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly
 1 5 10 15

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

40 Val Val Cys
 35

ES 2 698 525 T3

<210> 130
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1 cadena 1
 <400> 130
 10
 Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr
 1 5 10 15
 Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr
 20 25 30
 Ser Pro Leu Cys
 35
 <210> 131
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1 cadena 2
 20
 <400> 131
 Val Lys Met Ala Ile Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30
 Asn Ala Cys
 35
 25
 <210> 132
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1 cadena 2
 <400> 132
 35
 Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val
 1 5 10 15
 Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Cys
 20 25 30
 <210> 133
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>

ES 2 698 525 T3

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Fel d 1 cadena 2

<400> 133

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

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

<210> 134

<211> 32

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5

15 <400> 134

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

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

<210> 135

20 <211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5

<400> 135

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

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

Lys Cys

30 <210> 136

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5

<400> 136

ES 2 698 525 T3

Ala Tyr Lys Leu Ala Tyr Lys Thr Ala Glu Gly Ala Thr Pro Glu Ala
 1 5 10 15

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

5 <210> 137
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5
 <400> 137

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

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

15 <210> 138
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5
 <400> 138

Thr Val Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Tyr Thr Val Phe Glu Thr Ala
 1 5 10 15

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

25 Cys
 30 <210> 139
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5
 35 <400> 139

ES 2 698 525 T3

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

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

Ala Pro Ala Asn Asp Lys
 35

5 <210> 140
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus Clon 30

<400> 140

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

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

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

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

Asp Glu Glu Thr Cys Thr
 65 70

15 <210> 141
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido derivado de Phi p 5

<400> 141

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

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

Ala Leu Thr Ser Lys
 35

25

ES 2 698 525 T3

<210> 142
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Péptido derivado de Phl p 5

10

<400> 142

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula hipoalergénica derivada de Phl p 5 y que consiste en la secuencia de aminoácidos GAASNKAF AEGLSGEPKGAAESSKAALTSK, ADLGYGPATPAAPAAAGYTPATPAAPAEAAPAGK o TVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAAK.
- 10 2. Una proteína de fusión hipoalergénica que comprende una molécula hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 1 fusionada con al menos una proteína de la cápside vírica, en la que la molécula hipoalergénica se fusiona con el extremo N y/o el extremo C de dicha al menos una proteína de la cápside vírica.
- 15 3. Proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada porque** la al menos una proteína de la cápside vírica deriva de un virus patógeno humano.
- 20 4. Proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada porque** el virus patógeno humano es un virus de la familia picornaviridae.
- 25 5. Proteína hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada porque** el virus de la familia picornaviridae es del género de los rinovirus, preferentemente de la especie de los rinovirus humanos, en particular el rinovirus humano 89 o 14.
- 30 6. Molécula de ácido nucleico que codifica una molécula hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 1 o una proteína de fusión hipoalergénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
- 35 7. Vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el vector en términos de un ácido nucleico que codifica Phl p5 consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula hipoalergénica que consiste en la secuencia de aminoácidos definida en la reivindicación 1.
8. Formulación de vacuna que comprende una molécula hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 1 o una proteína de fusión hipoalergénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
9. Formulación de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque dicha formulación comprende adicionalmente al menos un adyuvante, excipiente y/o conservante farmacéuticamente aceptable.
10. Molécula hipoalergénica de acuerdo con la reivindicación 1 o proteína de fusión hipoalergénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para el uso en el tratamiento o la prevención de una alergia en un ser humano o animal.

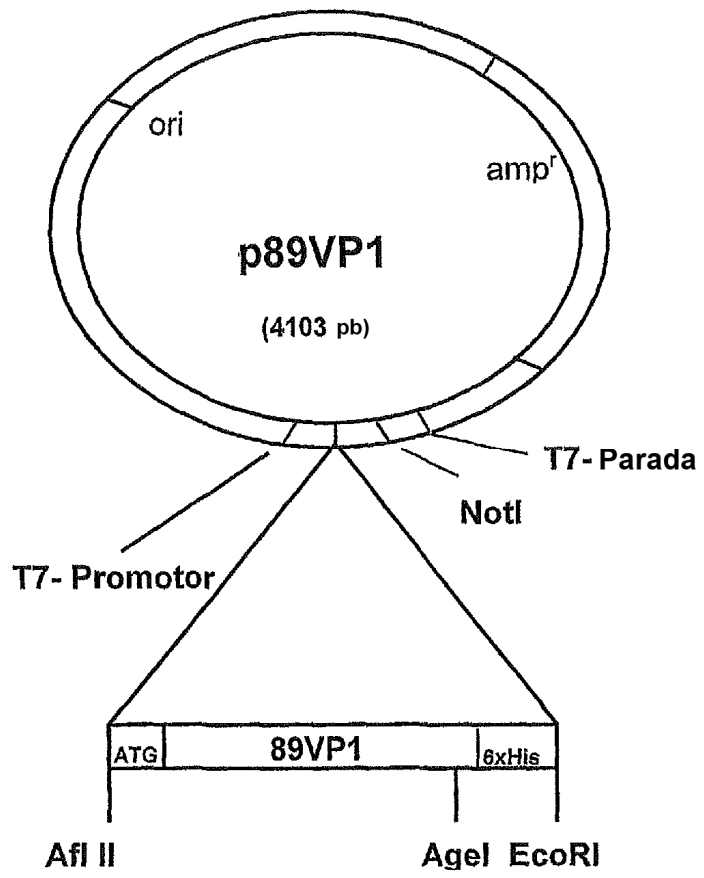


Fig. 1A

Fig. 1B cont.

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

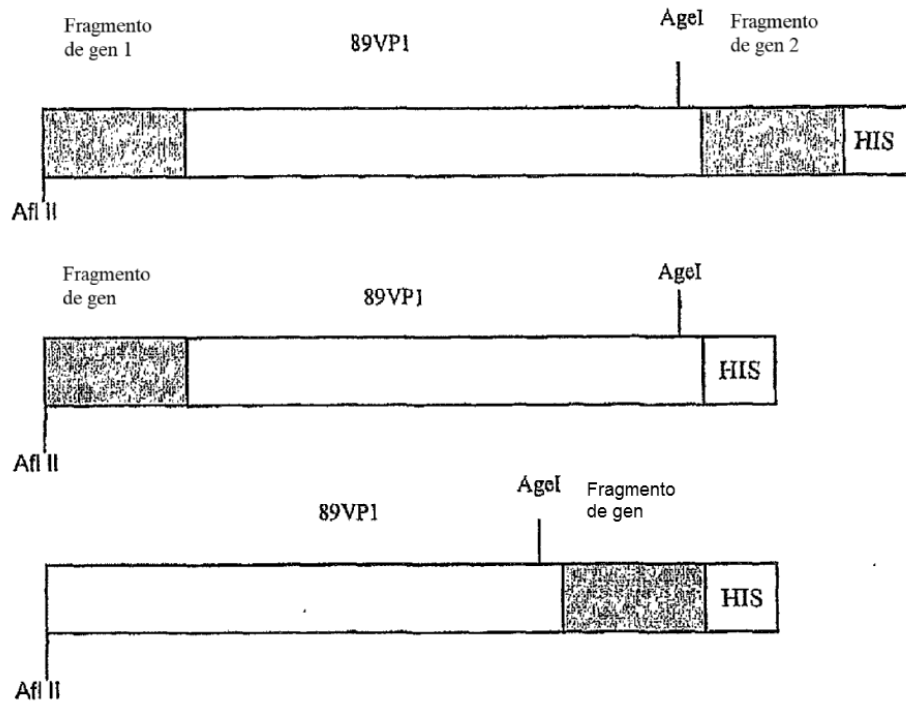


Fig. 1C

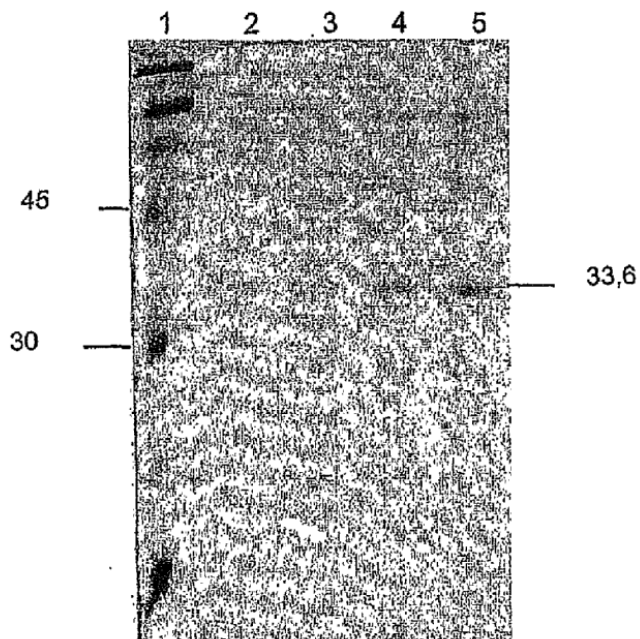


Fig. 2

ES 2 698 525 T3

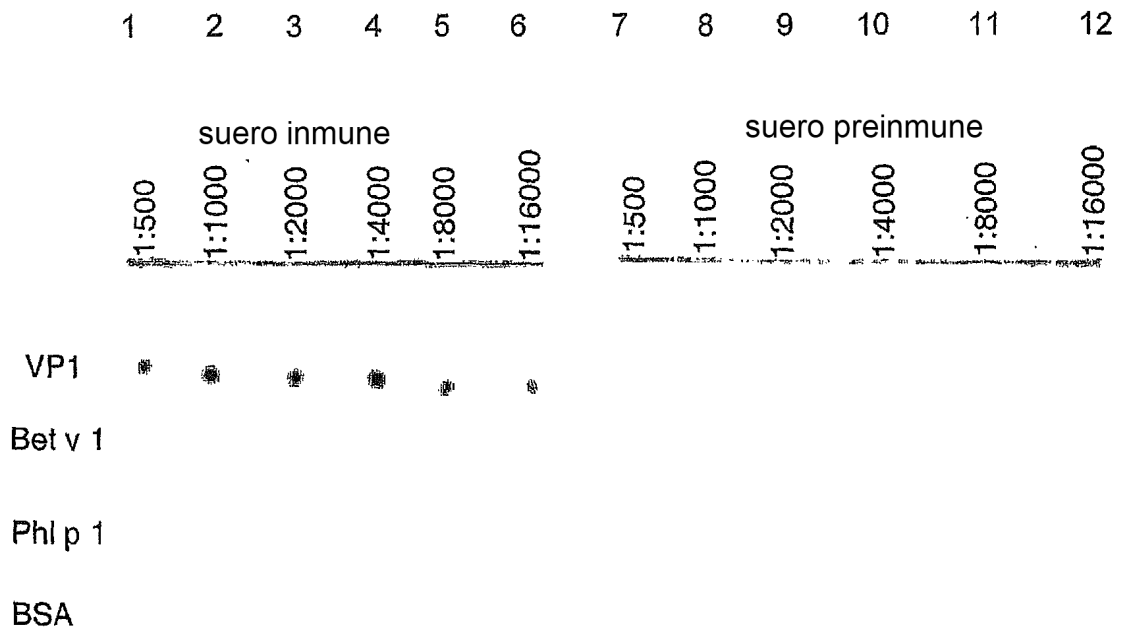


Fig. 3

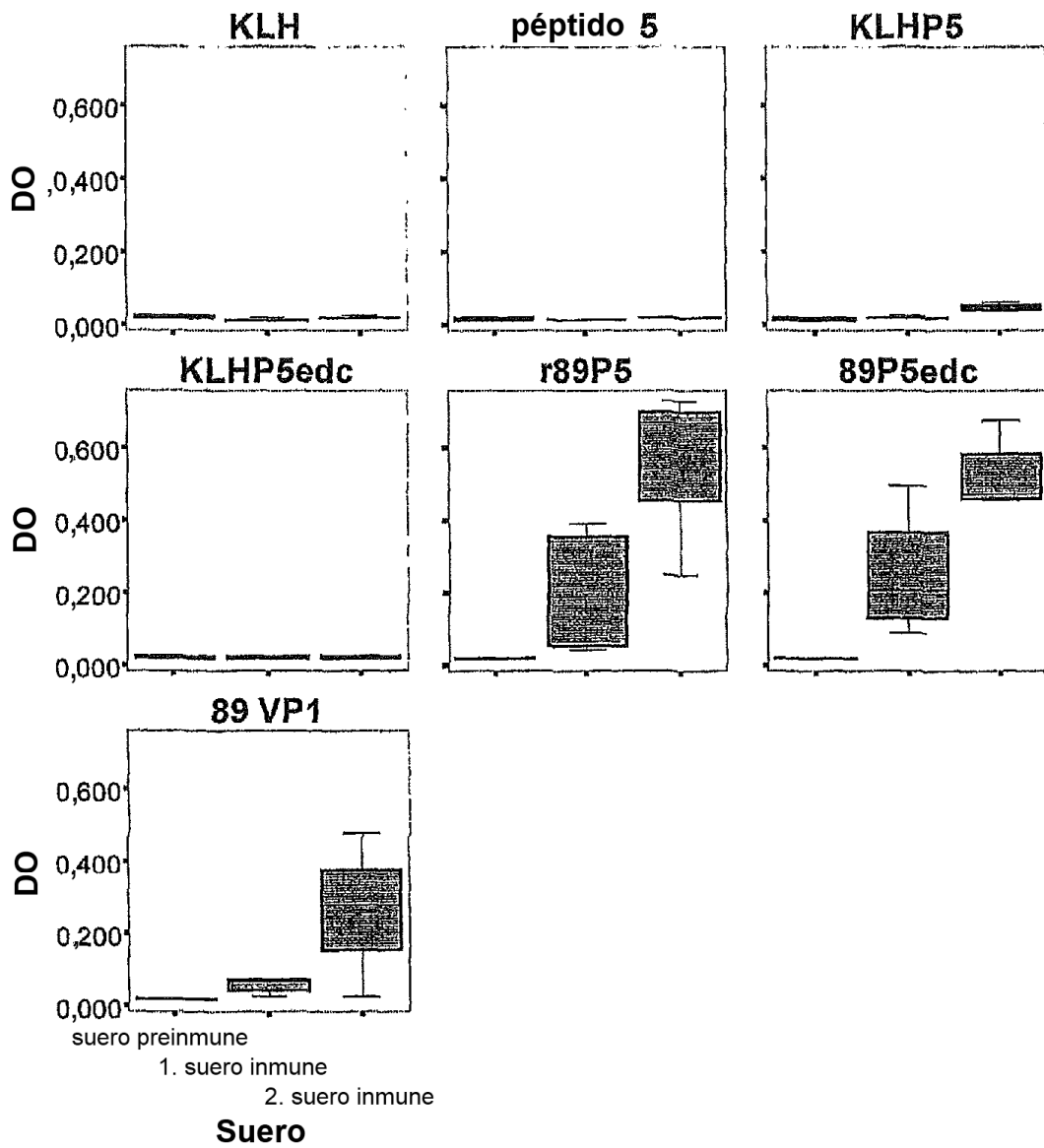


Fig. 4

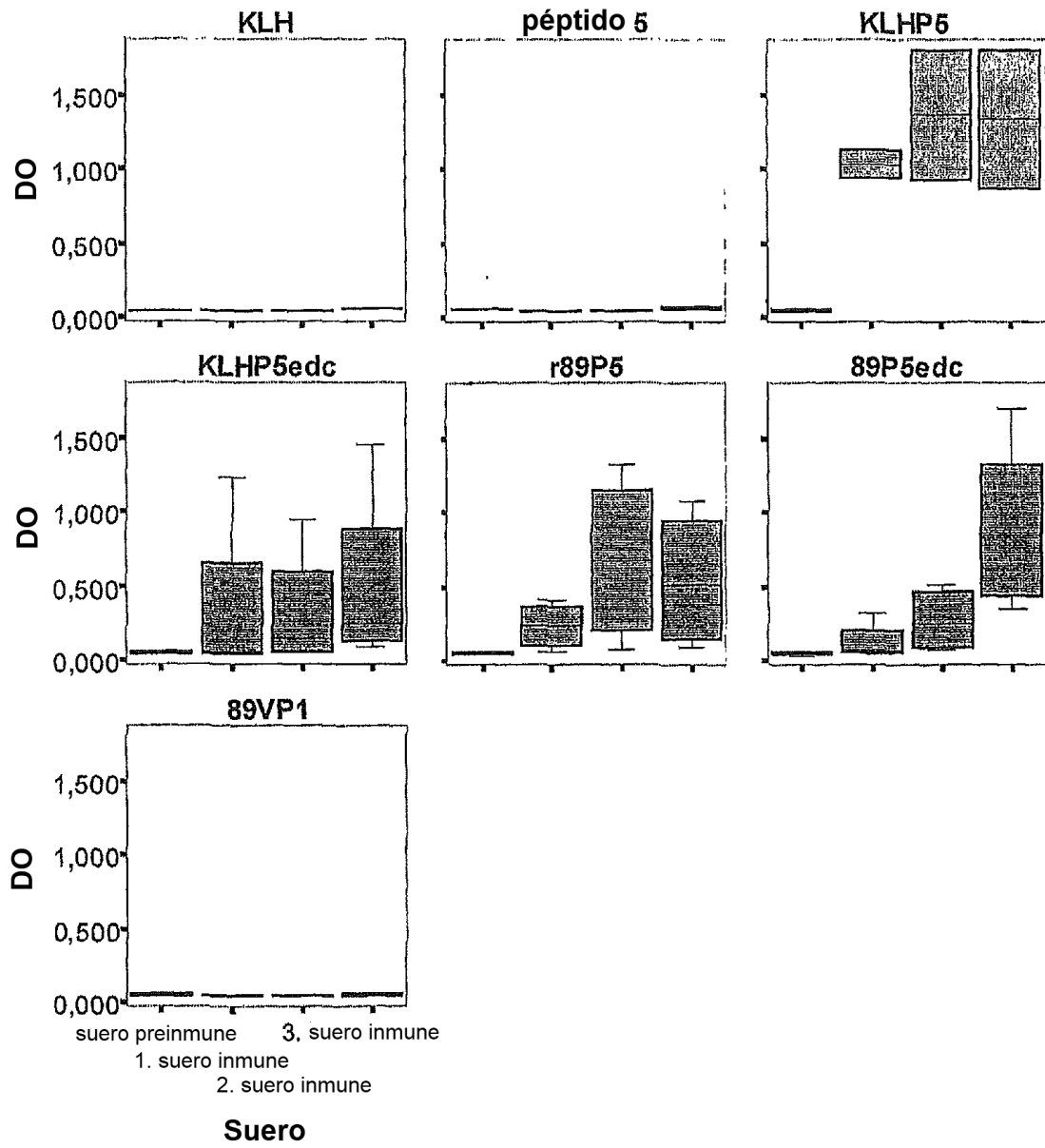


Fig. 5

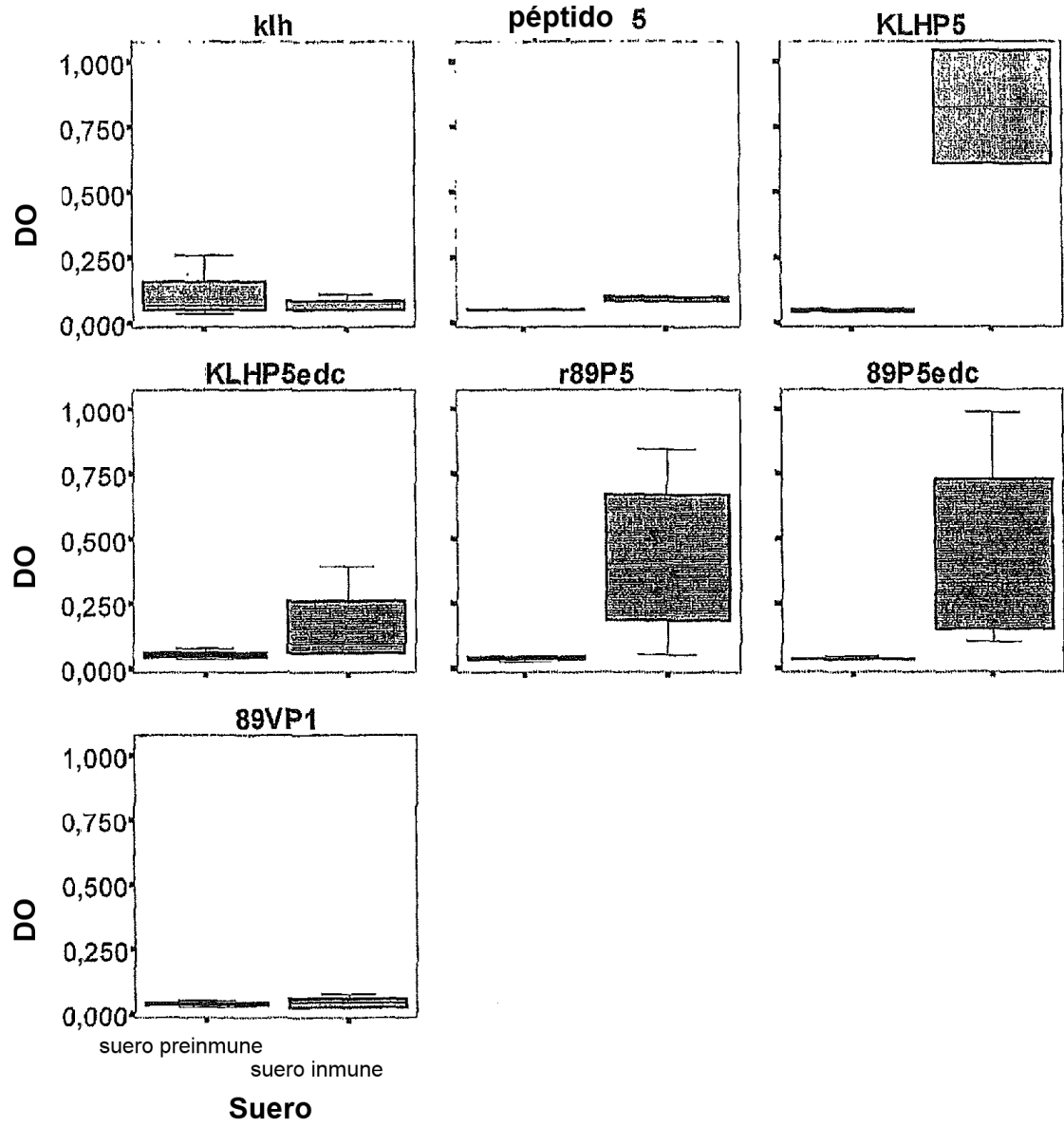


Fig. 6

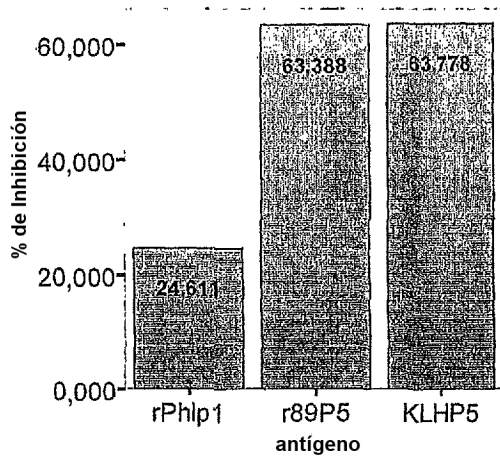


Fig. 7

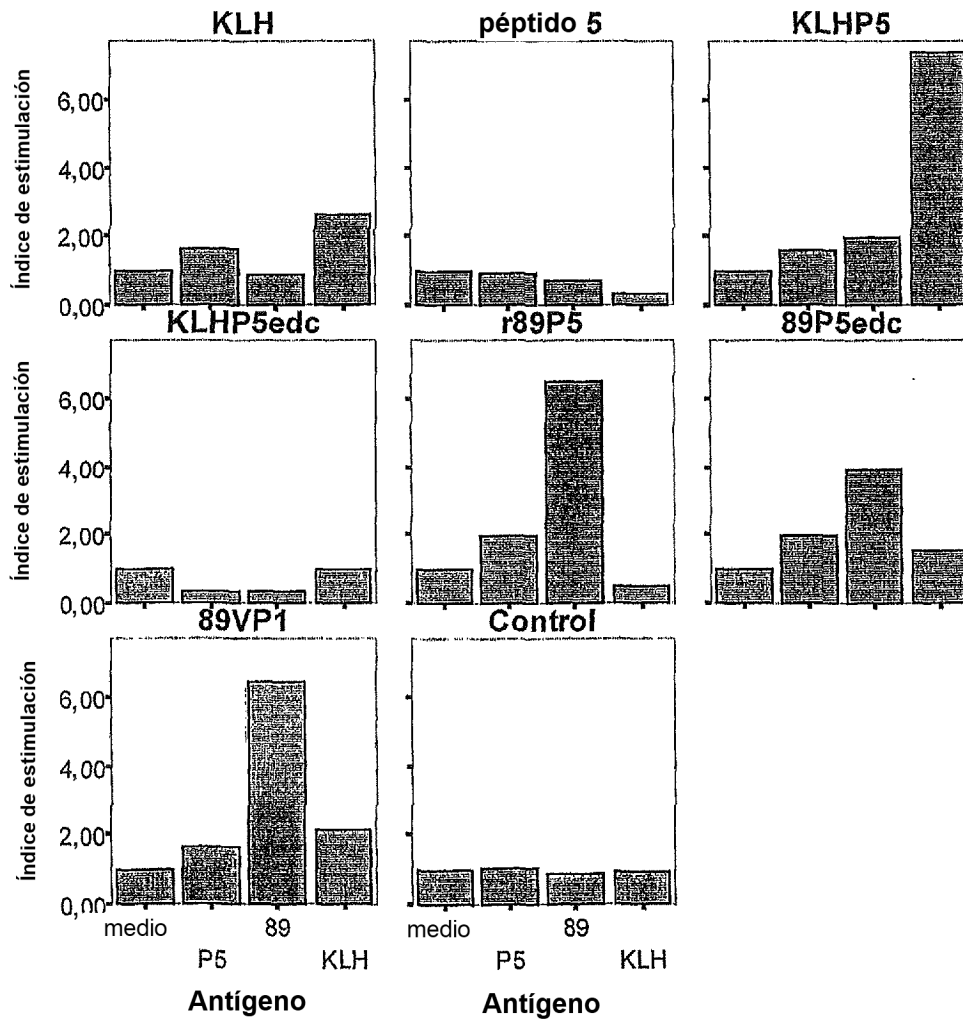


Fig. 8

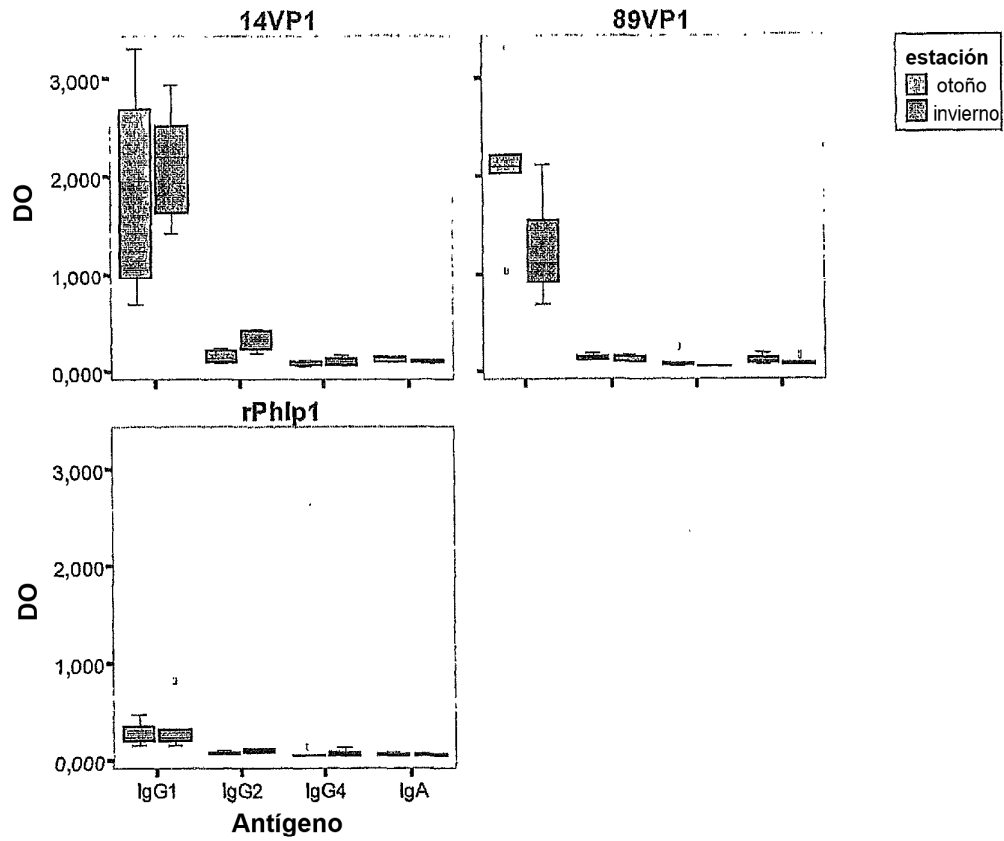


Fig. 9

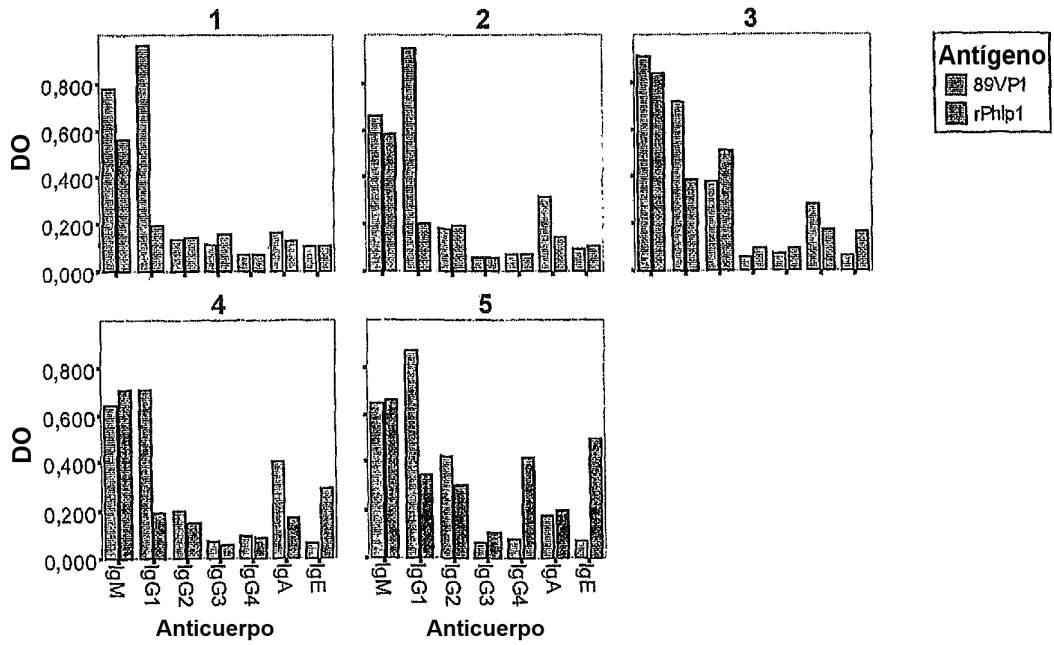


Fig. 10

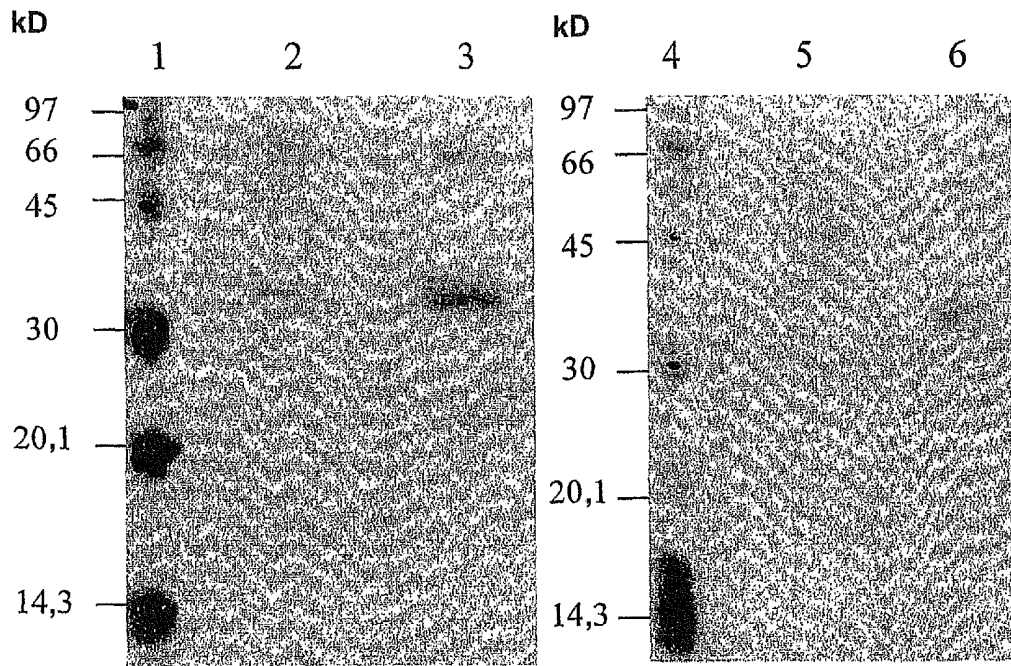


Fig. 11

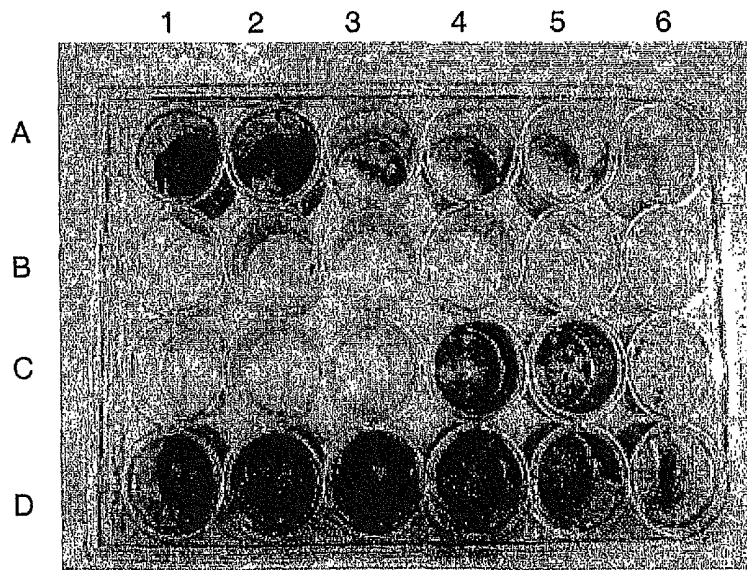


Fig. 12

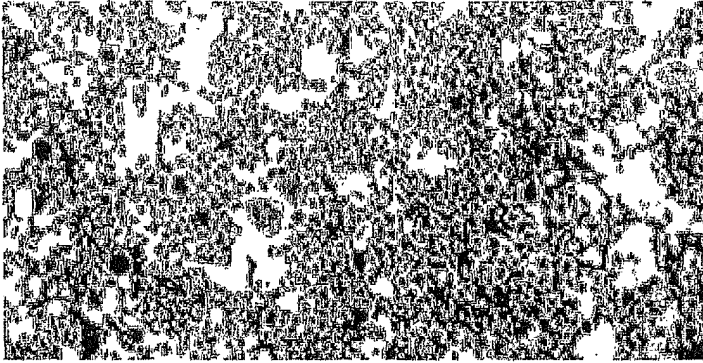


Fig. 12A

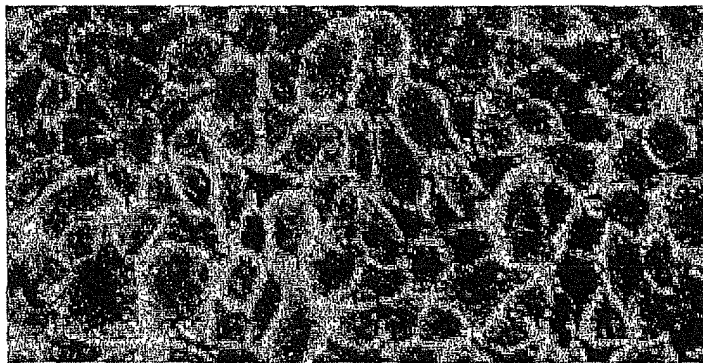


Fig. 12B

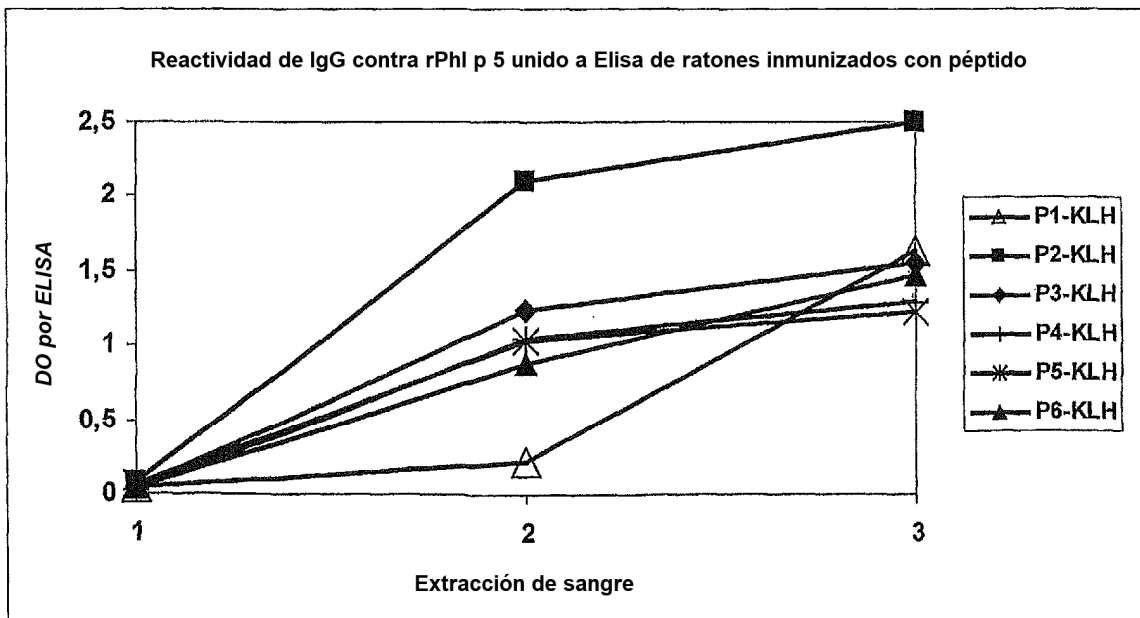


Fig. 13

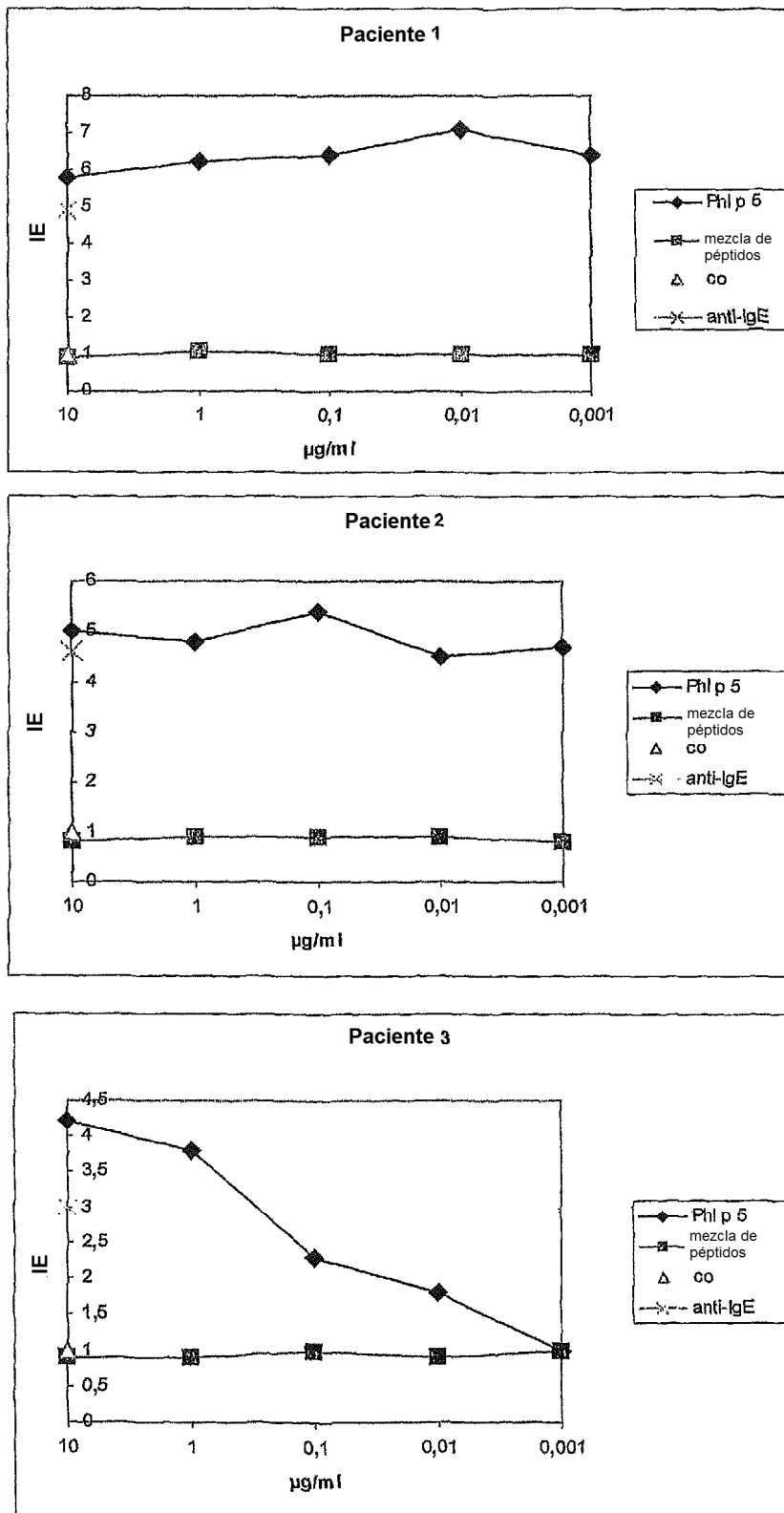


Fig. 14

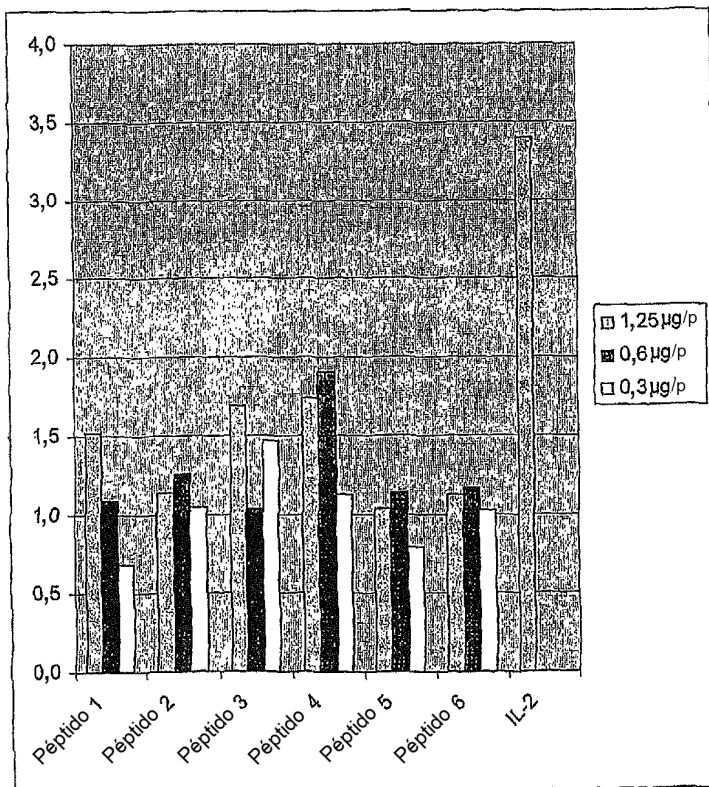
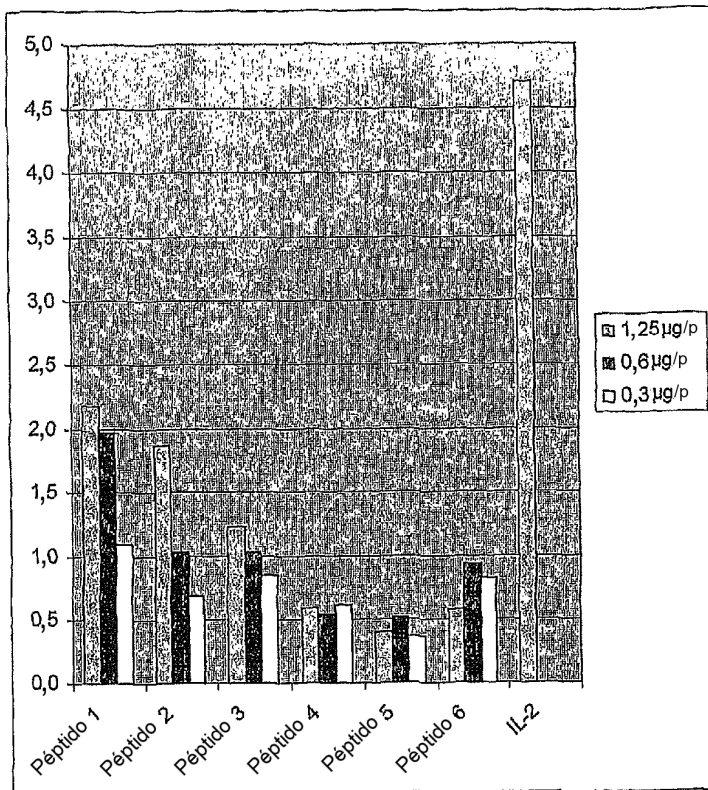


Fig. 15

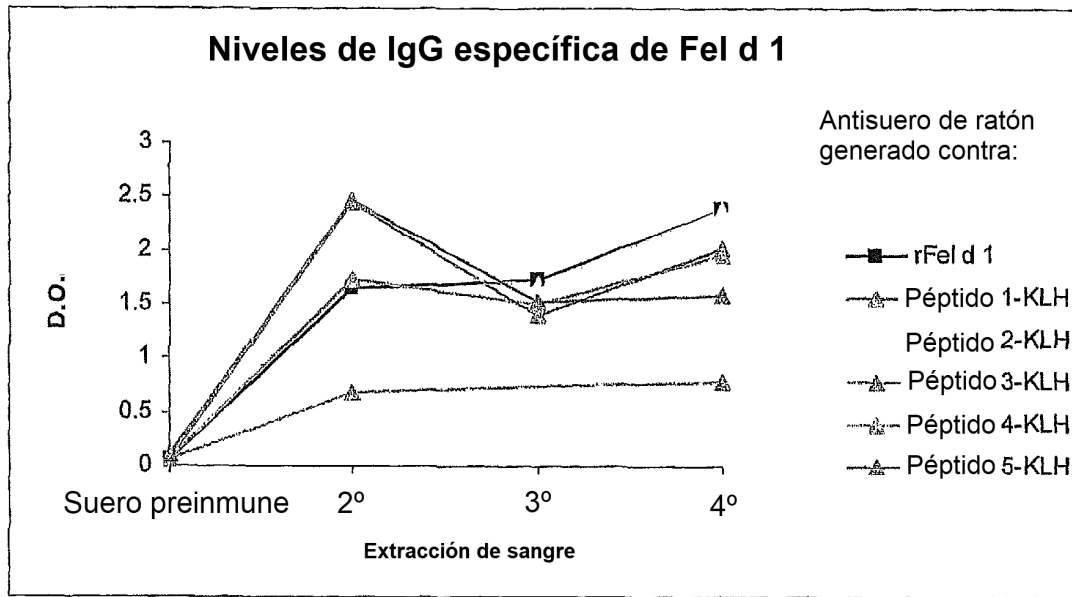


Fig. 16

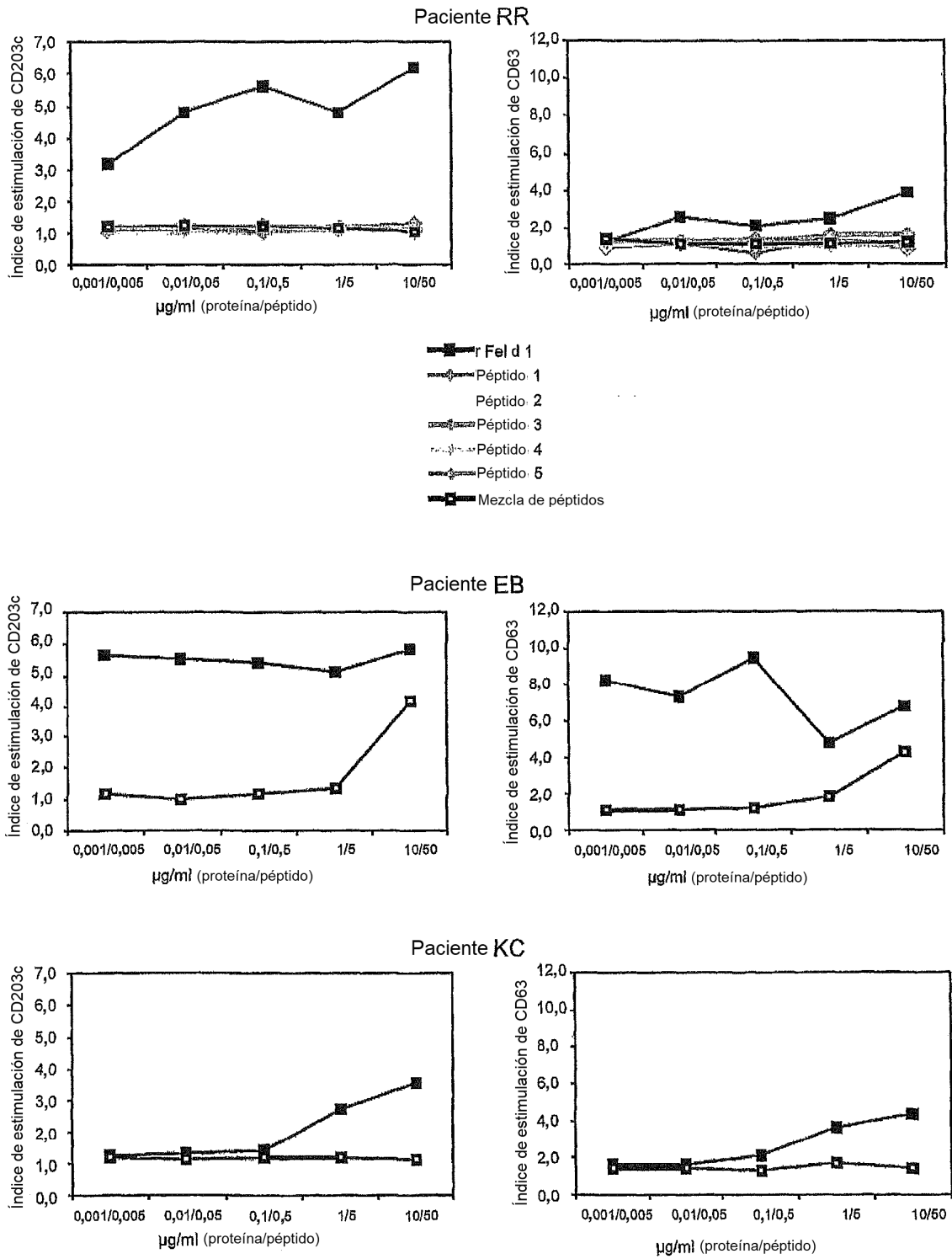
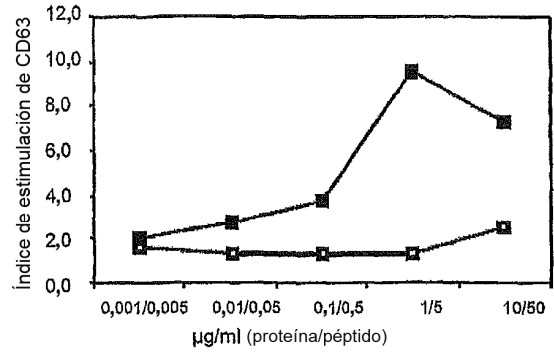
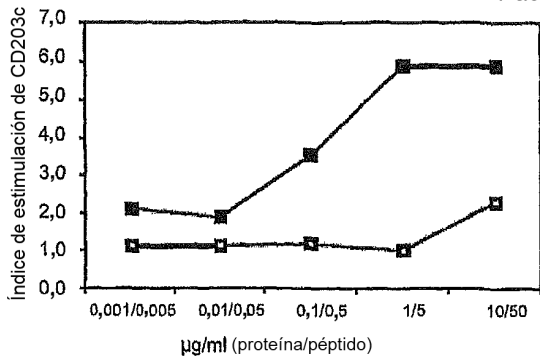
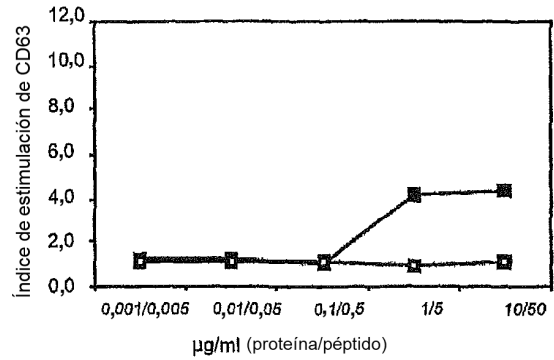
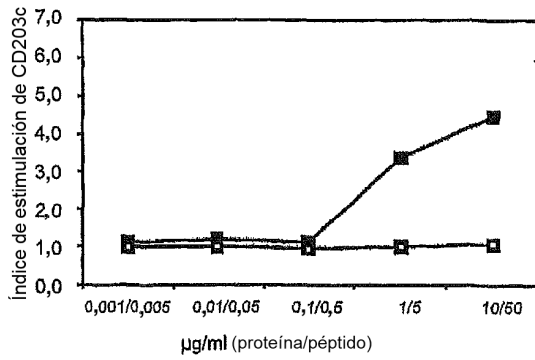


Fig. 17

Paciente MG



Paciente SM



Cont. Fig. 17

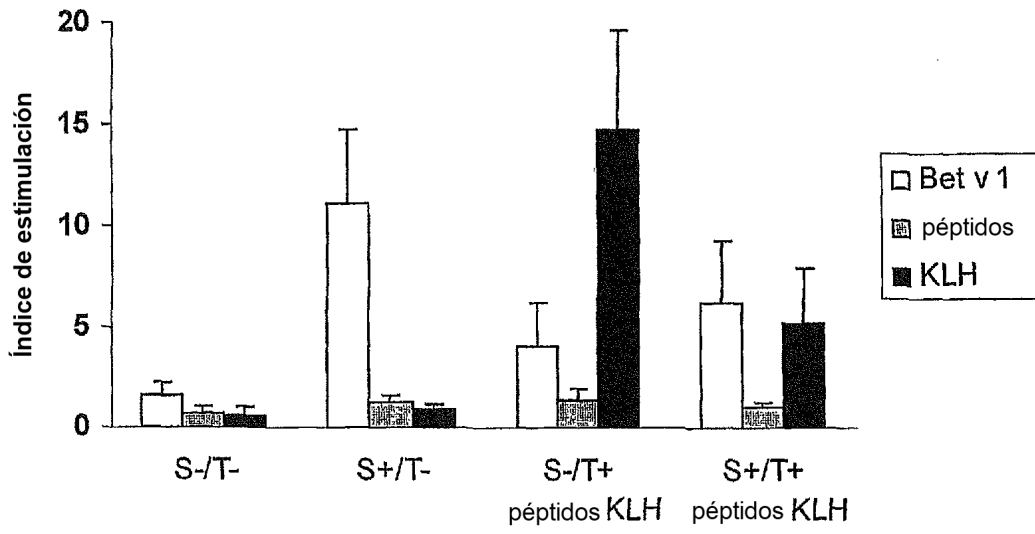


Fig. 18

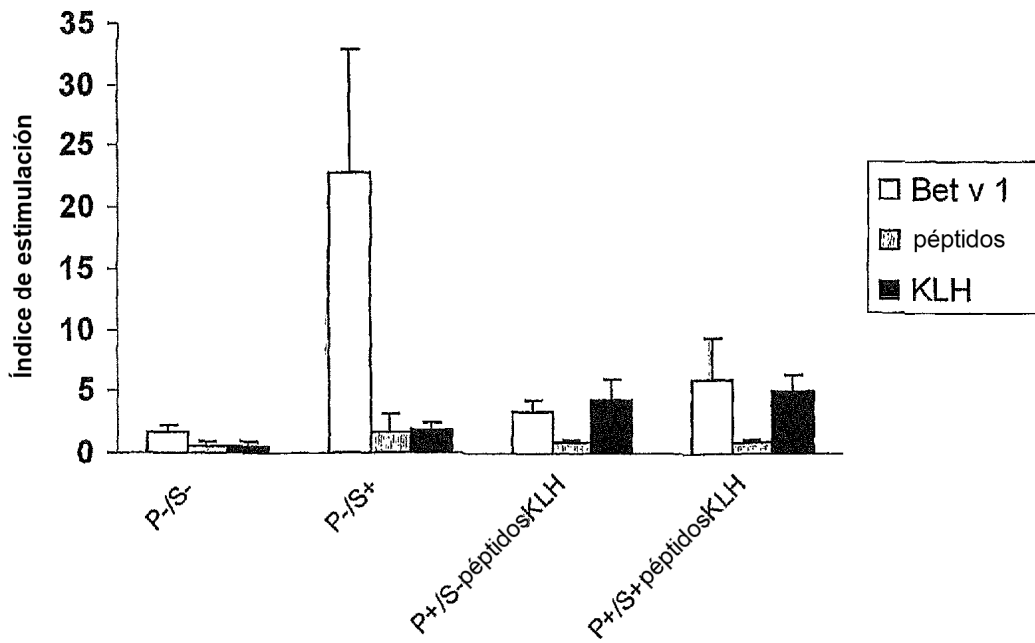


Fig. 19

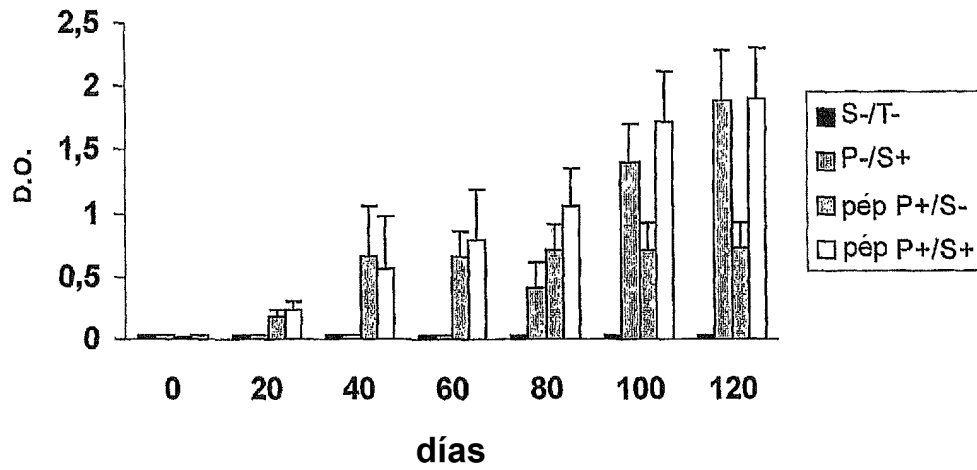


Fig. 20

Rectividad de IgE

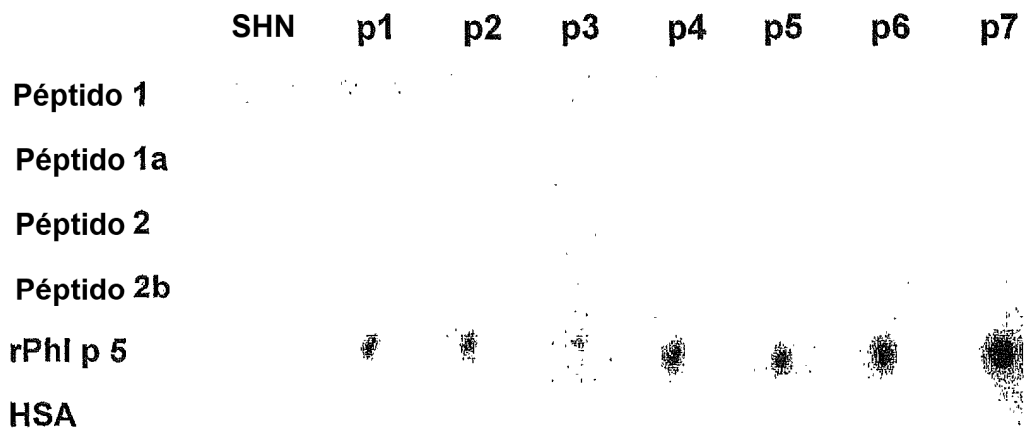


Fig. 21

Reactividad de linfocitos T

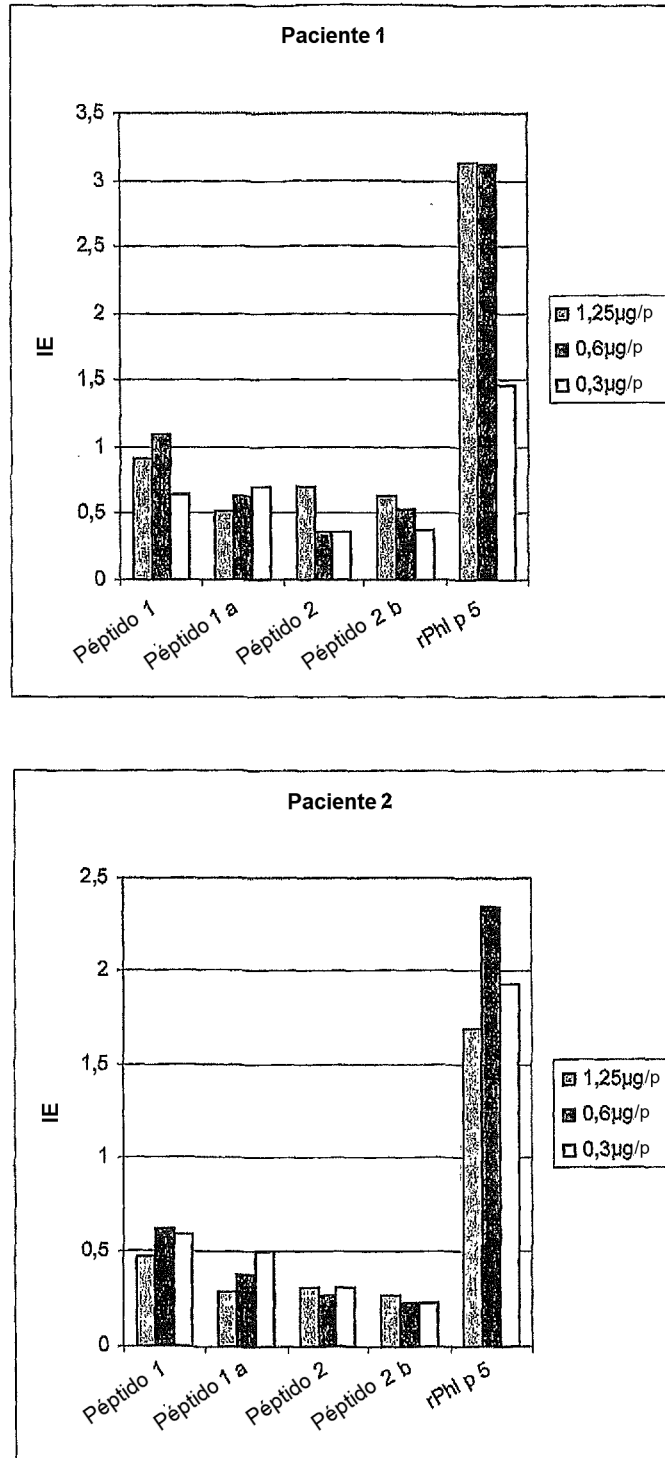


Fig. 22

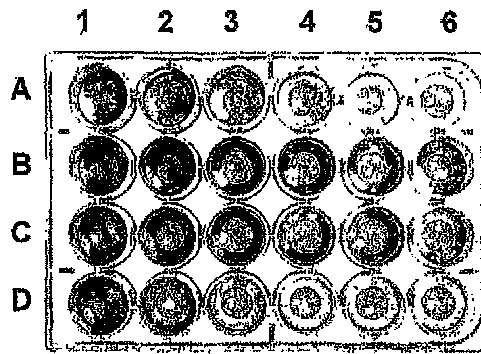


Fig. 23