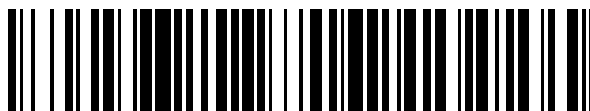


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 339 173**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2007 E 07718415 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **28.08.2013 EP 2027149**

54 Título: **Alérgeno de ácaros del polvo doméstico**

30 Prioridad:

28.04.2006 AT 7332006

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

12.12.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VALENTA, RUDOLF;
WEGHOFER, MARGIT;
VRTALA, SUSANNE;
HORAK, FRIEDRICH;
VALENT, PETER y
FLORIAN, STEFAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

DESCRIPCIÓN

Alérgeno de ácaros del polvo doméstico

La presente invención se refiere a un polipéptido que tiene propiedades alergénicas.

5 Más del 25% de la población en los países industrializados sufre alergias mediadas por IgE. Los pacientes alérgicos se caracterizan por un aumento de la producción de anticuerpos IgE contra los antígenos perjudiciales per se (es decir, alérgenos). Los síntomas inmediatos de alergia de tipo I (rinoconjuntivitis alérgica, asma, dermatitis, choque anafiláctico) están provocados por la reticulación inducida por alérgenos de los anticuerpos de IgE unidos a mastocitos y la liberación de mediadores biológicamente activos (por ejemplo, histamina, leucotrienos).

10 Los ácaros de polvo doméstico (APD) representan una de las fuentes más importantes de alérgenos en todo el mundo. Casi el 10% de la población y más del 50% de pacientes alérgicos son sensibles a los alérgenos de ácaros. El APD *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) es predominante en Europa Central. Los alérgenos de Der p comprenden más de 30 proteínas o glicoproteínas de las que hasta ahora se han caracterizado veintinueve alérgenos. Los alérgenos de Grupo 1 y 2 (Der p 1 y Der p 2) representan los alérgenos más importantes de los APD, que han sido reconocidos por más del 80% de los pacientes alérgicos a Der p, pero también se demostró que otros alérgenos de APD (por ejemplo, Der p 5 y Der p 7) representan alérgenos Der p importantes a pesar de su frecuencia de unión a IgE considerablemente menor.

15 Weghofer M. et al. (Clin Exp Allergy 35 (2005): 1384 - 1391) demostraron que alérgenos de ácaros de polvo recombinantes eran capaces de inhibir la reactividad de IgE y, por lo tanto, se puede usar para ensayos de diagnóstico y tratamiento de la alergia Der p.

20 Pittner G. et al. (Clin Exp Allergy 34 (2004): 597 - 603) describieron los procedimientos de ensayo de diagnóstico con los alérgenos de ácaros de polvo principales Der p 1 y Der p 2 y alérgenos de ácaros de polvo de alta reactividad cruzada (por ejemplo Der p 10) que se va a usar para la selección de pacientes para inmunoterapia con extractos de Der p.

25 Vrtala S. et al. (Methods 32 (2004): 313 - 320) describen estrategias para la producción y evaluación de derivados de alérgenos que muestran una actividad alergénica reducida (por ejemplo, moléculas hipoenergéticas) y adecuadas para la vacunación.

El documento EP 1 612 219 A1 se refiere a alérgenos derivados de ácaros de polvo doméstico (Der p).

30 Los extractos de APD brutos, que se usan actualmente para el diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos a APD, están solamente normalizados para Der p 1 y Der p 2, mientras que otros alérgenos importantes están solamente presentes en pequeñas cantidades en los extractos de APD.

Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos polipéptidos con propiedades alergénicas e hipoalergénicas que se pueden usar en diagnóstico, tratamiento y prevención de alergias, en particular de ácaros de la alergia al polvo doméstico.

35 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1, o que comprende al menos una un fragmento de aminoácidos que consiste en un epítipo de células T de al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1, en la que la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1 codifica un alérgeno y el polipéptido comprende al menos un epítipo de las células T reconocido por un receptor de células T específico para una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1.

40 El polipéptido con la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1 (MKFNIIIVFI SLAILVHSSY AANDNDDDPT TTVHPTTTEQ PDDKFECP SR FGYFADP-KDP HKFYICSNWE AVHKDCPGNT RWNEDDEETCT) es un nuevo alérgeno principal de Der p que puede ser útil, por ejemplo, para diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos a Der p. Este nuevo alérgeno de Der p tiene un peso molecular de aproximadamente 8 kDa y se une a IgE en más de un 50% de los pacientes alérgicos a ácaros.

45 La alta frecuencia de unión a IgE del alérgeno con la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1 y la observación de que éste alérgeno es biológicamente activo lo convierte en una molécula importante para el diagnóstico de alergia de ácaros del polvo doméstico en un individuo.

50 Además, este nuevo alérgeno de ácaros también es útil para el tratamiento o prevención de alergia de ácaros del polvo doméstico. El polipéptido de acuerdo con la presente invención induce altas titulaciones de anticuerpos de IgG en mamíferos. Si estos anticuerpos específicos de IgG se administran a un individuo, el alérgeno de ácaros de polvo doméstico expuesto añadido a una muestra, preferentemente suero, obtenido de un individuo alérgico a ácaros del polvo doméstico, que comprende moléculas de IgE de dicha unión a IgE individual a este nuevo alérgeno está inhibido. Esto muestra que la inmunoterapia específica de alérgeno con este nuevo alérgeno de ácaros inducirá el bloqueo de anticuerpos IgG en seres humanos. La importancia de la inducción de bloqueo de los anticuerpos de

IgG para una inmunoterapia exitosa se ha mostrado recientemente en ensayos de inmunoterapia con alérgenos definidos y derivados de alérgenos (Gafvelin, G., et al. (2005) *Int Arch Allergy Immunol* 138: 59; Jutel, M., et al. (2005) *J Allergy Clin Immunol* 116: 608). Se indujeron altos niveles de anticuerpos de IgG específicos de alérgeno que inhibían la desgranulación de basófilos inducida por alérgeno (Niederberger, V., et al. (2004) *PNAS USA* 101 Suppl 2: 14677). Las modificaciones del polipéptido de acuerdo con la presente invención que muestra propiedades alérgicas conducen a derivados hipoalergénicos con actividad alérgica reducida e inmunogenicidad conservada puede además mejorar la inmunoterapia mediante la reducción de efectos secundarios anafilácticos (Valenta, R., et al. (2004) *Adv Immunol* 82: 105). Los derivados hipo alérgénicos se pueden producir mediante técnicas biológicas moleculares o mediante la síntesis de péptidos derivados de las células T o los epítomos de células B del alérgeno (Kyte, J., and R. F. Doolittle. (1982) *J Mol Biol* 157: 105).

Como se usa en el presente documento, un "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende al menos 8 restos de aminoácidos.

El término "identidad", como se usa en el presente documento, indica si cualquiera de dos (o más) secuencias de péptido, polipéptido o proteína tienen, o no, secuencias de aminoácidos que son "idénticas" en cierto grado ("% de identidad") entre sí. Este grado se puede determinar usando los algoritmos de ordenador conocidos tal como el programa "FAST A", que usa, por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson et al. (1988) *PNAS USA* 85: 2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12, 387 - 395), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., et al., *J Molec Biol* 215: 403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo et al, (1988) *SIAM J Applied Math* 48 : 1073). Por ejemplo, la herramienta BLAST de la base de datos NCBI se puede usar para determinar la identidad. Otros programas comercialmente o públicamente disponibles incluyen, el programa DNASTar "Meg-Align" (Madison, WI) y el programa "Gap" del Grupo de Ordenadores de Genética de la Universidad de Wisconsin (UWG) (Madison, WI)). El porcentaje de identidad de las moléculas de proteína se puede además determinar, por ejemplo, mediante comparación de la información de secuencias usando el programa de ordenadores GAP (por ejemplo Needleman et al., (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, revisado por Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482). En resumen, el programa GAP define identidad como el número de símbolos adecuados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son idénticos, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto del programa GAP puede incluir: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y para no identidades) y la matriz de comparación pesada de Gribskov et al. 14: 6745, como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., *ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE*, National Biomedical Research Foundation, p. 353 - 358 (1979); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para los huecos del extremo.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención la secuencia de aminoácidos es al menos 70%, preferentemente al menos 80%, más preferentemente al menos 90%, lo más preferentemente al menos 95%, en particular 100%, idéntica a la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1.

El polipéptido de acuerdo con la presente invención se produce preferentemente de manera recombinante mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. El huésped en el que dicho polipéptido se puede producir puede ser de cualquier tipo usando vectores y plásmidos correspondientes (por ejemplo, células eucarióticas, preferentemente levaduras, células de mamíferos, células vegetales y células de insectos, y células procarióticas, preferentemente *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*). De hecho, también es posible producir los polipéptidos de la presente invención químicamente mediante procedimientos conocidos en la técnica.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención dicho polipéptido es hipoalérgico.

Como se usa en el presente documento, el término "hipoalérgico" se refiere a la capacidad de un péptido, polipéptido o proteína derivado de un alérgeno con propiedades alérgicas para inducir la producción de anticuerpos que específicamente se unen a dicho alérgeno y que muestra reacciones alérgicas reducidas o ninguna cuando se administra a un individuo. La capacidad reducida o ausente de derivados "hipoalérgicos" de un alérgeno como la SEC ID N° 1 para inducir una reacción alérgica en un individuo se obtiene mediante la eliminación o destrucción de los epítomos de unión de IgE de dichos alérgenos, sin embargo, conservando los epítomos de las células T presentes en dichos alérgenos. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante división del alérgeno en fragmentos con capacidad de unión reducida o ninguna a IgE y todos estos fragmentos en un orden conjuntamente que no corresponden al orden de los fragmentos en el alérgeno de tipo salvaje (véase por ejemplo, el documento EP 1 440 979). Otro procedimiento para producir moléculas "hipoalérgicas" a partir de alérgenos implica las supresiones C- y/o N- terminales del alérgeno de tipo salvaje (véase, por ejemplo, el documento EP 1 224 215).

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención dichos fragmentos de aminoácidos están fusionados conjuntamente en un orden diferente del orden de dichos fragmentos en la SEC ID N° 1.

El polipéptido de acuerdo con la presente invención puede comprender fragmentos de aminoácidos derivados de la SEC ID N° 1 que pueden estar preferentemente fusionados conjuntamente en un orden diferente del orden de la SEC ID N° 1. Esta "recomposición" da como resultado un polipéptido que tiene características alteradas con

respecto al alérgeno de tipo salvaje que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1. Por ejemplo, esta recomposición dará como resultado un polipéptido que comprende epítopos de células T intactas y epítopos de células B destruidas. Tal molécula puede tener propiedades hipoalergénicas.

5 Dicho al menos un fragmento de aminoácidos, que consiste sustancialmente en un epítipo de células T, se selecciona preferentemente del grupo que consiste en moléculas de aminoácidos que comprenden los aminoácidos NDDDPSTTV, PTTTVHPTT, TTTVHPTT, TTVHPTTTE, TVHPTTTEQ, TTTEQPDDK, TTEQPDDKF, FYICSNWEA, YICSNWEAV, ICSNWEAVH, SNWEAVHKD, AVHKDCPGN y TRWNEDEET.

10 Con el fin de provocar una respuesta inmunitaria de las células T en un individuo cuando se administra un polipéptido de acuerdo con la presente invención dicho polipéptido tiene que comprender epítopos de células T. Los epítopos de células T comprenden al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos de la SEC ID N° 1. Dichos epítopos de células T también pueden estar unidos a un vehículo mediante o sin un engarce. Dicho vehículo puede ser un soporte sólido como se usa en la tecnología microdisposición. La presencia de epítopos de células T en un polipéptido se puede determinar mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase por ejemplo, "Epitope Mapping: A practical approach" Ed.O. Westwood y F. Hay, 2001, Oxford University Press). Un procedimiento particularmente preferido es ELISpot (Tobey TW y Caulfield MJ (2004), Methods Mol. Med. 94: 121 - 132).

15 Los epítopos de células T identificados pueden estar condensados N- o C- terminalmente a otras moléculas como proteínas o ser parte de un fragmento mayor obtenido a partir de la SEC ID N° 1 mediante fragmentación.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ADN que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención.

20 Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un vector que comprende una molécula de ADN de acuerdo con la presente invención.

25 Los vectores preferidos (por ejemplo, plásmidos) a usar de acuerdo con la presente invención son vectores de clonación así como de expresión que comprenden promotores, un origen de replicación, elementos reguladores, marcadores de selección y / u otros elementos vectores. Si el vector es un vector de integración capaz de integrarse en el genoma de los medios correspondientes de la célula huésped se pueden proporcionar sobre dicho vector (por ejemplo, elementos de la secuencia de inserción). El tipo del vector usado y los elementos reguladores presentes en dicho vector dependen también de que el vector de dicha célula huésped se integre. Si se usan los vectores de expresión la molécula de ADN de acuerdo con la presente invención y que codifica a polipéptido como se ha descrito anteriormente, está unido de manera operativa a una región promotora.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula transformada con un vector de acuerdo con la presente invención.

35 La célula que se va a usar en el presente documento puede ser una célula eucariótica así como procariótica. Las células eucarióticas preferidas son células de levaduras, en particular *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*, células vegetales, en particular células de la planta de tabaco, células de insectos y células de mamífero, como células de seres humanos y de animales, en particular células de ovario de hámster Chino. Las células procarióticas preferidas son, por ejemplo, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Una célula que comprende un a vector o una molécula de ADN de la presente invención se pueden usar para producir un polipéptido de acuerdo con la presente invención.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a un polipéptido de acuerdo con la presente invención.

45 Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales multiespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de una sola cadena, fragmentos Fab, fragmentos F(ab') y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. Además, se considera que los anticuerpos so moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une de manera inmuno-específica a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención son preferentemente de los tipos IgG, IgM, IgD, IgA e IgY, clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

50 Los anticuerpos policlonales se pueden preparar mediante la administración de un polipéptido de la invención, preferentemente usando un adyuvante, a un mamífero no humano y recogiendo el antisuero resultante. Se pueden obtener titulaciones mejoradas mediante inyecciones durante un período de tiempo. No existe limitación particular para las especies de mamíferos que se pueden usar para inducir anticuerpos; se prefiere en general usar conejos o cobayas, pero también se pueden usar caballos, gatos, perros, cabras, cerdos, ratas, vacas, ovejas, camellos etc. En la producción de anticuerpos, una cantidad definitiva de inmunógeno de la invención se diluye por ejemplo con solución salina fisiológica hasta una concentración adecuada y la solución diluida resultante se mezcla con, por ejemplo adyuvante de Freund completo para preparar una suspensión o con geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones

en aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacille Calmette-Guerin) y corynebacterium parvum. Las suspensiones y mezclas se administran a mamíferos, por ejemplo, por vía intraperitoneal, por ejemplo, a un conejo, usando entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 2.500 µg de polipéptido de la invención por administración. La suspensión se administra preferentemente aproximadamente cada dos semanas durante un período de hasta aproximadamente 2 - 3 meses, preferentemente aproximadamente 1 mes, para efectuar la inmunización. Se recupera el anticuerpo mediante la recogida de sangre a partir del animal inmunizado después del pase de 1 a 2 semanas posteriormente a la última administración, centrifugación de la sangre y aislamiento del suero de la sangre.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser, por ejemplo, de origen humano o murino. Los anticuerpos monoclonales murinos se pueden preparar mediante el método de Köhler y Milstein (Köhler, G. y Milstein, C., Nature 256 (1975) 495), por ejemplo, mediante fusión de células de bazo de ratones hiperinmunizados con una línea celular de mieloma de ratón apropiada.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase por ejemplo, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4: 214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125: 191 - 202; US 5.807.715; US 4.816.567 y US 4.816.397.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se une al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes complementarias (CDR) de las especies no humanas y regiones de marco conservadas de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los restos marco conservados en las regiones marco conservadas humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR a alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones marco conservadas se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelación de las interacciones de las CDR y restos marco conservados para identificar los restos marco conservados importantes para unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar los restos marco conservados no usuales en las posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen et al., US 5,585,089; Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988)). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documentos EP 239.400; WO 91/09967; US 5.225.539; US 5.530.101; y US 5.585.089), cobertura o cubrir con una superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5): 489 - 498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7 (6): 805 - 814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91: 969 - 913 (1994)), y barajado de cadenas (documento US 5.565.332).

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden usar de manera ventajosa para la inmunización pasiva de un individuo que padece alergia, en particular de alergia de ácaros del polvo doméstico. Para la inmunización pasiva del anticuerpo es preferentemente un IgG o su derivado (por ejemplo, anticuerpo quimérico o humanizado). Además este anticuerpo también se puede usar para la desensibilización de un individuo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una formulación de vacuna que comprende un polipéptido o un anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

A continuación del polipéptido o el anticuerpo, la formulación de acuerdo con la presente invención también puede comprender otras sustancias como estabilizantes, adyuvantes, vehículos farmacéuticamente aceptables etc.. Los protocolos adecuados para la producción de formulaciones de vacuna son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden encontrar por ejemplo, en "Vaccine Protocols" (A. Robinson, M.P. Cranage, M. Hudson; Humana Press Inc., U.S.; 2ª edición 2003).

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de un polipéptido de acuerdo con la presente invención para el diagnóstico de una alergia, en particular de alergia de ácaros de polvo doméstico, en un individuo.

Dicho polipéptido se puede usar para el diagnóstico de la alergia, en particular la alergia a los ácaros del polvo doméstico mediante, por ejemplo, una muestra de un individuo que comprende células que liberan histamina frente a dicho polipéptido (véase por ejemplo Purohit et al., Clin.Exp.Allergy 35 (2005): 186 - 192). Además, el (los) polipéptido (s) de acuerdo con la presente invención se pueden inmovilizar sobre una superficie con el fin de formar una disposición / procesador de polipéptidos. Tales disposiciones se pueden usar, por ejemplo, en la selección de alto rendimiento con el fin de diagnosticar una alergia en un número de muestras tomadas de un número de individuos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un polipéptido o anticuerpo de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento para la inmunoterapia de una alergia, en particular de alergia de ácaros de polvo doméstico.

Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden usar para la vacunación activa y vacunación pasiva respectivamente. Ambos se pueden usar debido a la formación de IgG protectoras se induce cuando un polipéptido de la presente invención se administra a un individuo y la administración de inmunoglobulinas dirigidas a

dicho polipéptido conducirá a una competición entre IgE y los anticuerpos protectores administrados a la vez que alivia los síntomas de la alergia.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un polipéptido o un anticuerpo de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento para la prevención de una sensibilización a alérgeno, en particular de la sensibilización a los alérgenos de los ácaros del polvo doméstico.

El polipéptido usado para vacunación de un individuo es preferentemente hipoalérgico. El uso de tal polipéptido evita la unión de IgE a dicho polipéptido y de este modo evita una reacción alérgica.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención dicho medicamento además contiene adyuvantes, vehículos, diluyentes, conservantes o mezclas de los mismos.

10 El medicamento comprende preferentemente 10 ng a 1 g, más preferentemente 100 ng a 10 mg, especialmente de 0,5 µg a 200 µg de dicho polipéptido.

La presente invención se ilustra además mediante las figuras y ejemplos siguientes, sin embargo, sin estar restringida a ellas.

15 La Figura 1 muestra el ADNc y la secuencia de aminoácidos del alérgeno derivado del clon 30. El codón de partida y el codón de parada están subrayados. La secuencia de señal comprende restos de aminoácidos 1 a 21 con el sitio de escisión predicho entre los restos de aminoácidos 21 (A) y 22 (A) en negrita. Los números en el lado izquierdo de la secuencia indican las posiciones de nucleótidos y los números en el lado derecho de la secuencia de las posiciones de aminoácidos.

20 La Figura 2 muestra una tinción con azul de Coomassie y espectroscopía de masas (MS) del alérgeno derivado del clon 30. A, el gel SDS-PAGE teñido de azul Coomassie muestra un marcador de peso molecular (M) y 3 µg del alérgeno derivado del clon 30 (30). B, análisis de MS del alérgeno derivado del clon 30 muestra la relación masa/carga en el eje x y la intensidad de señal sobre el eje y como el porcentaje de la señal más intensa obtenida en el intervalo de masa investigado. El máximo a 7979.20 corresponde a la masa calculada de la secuencia de aminoácidos del alérgeno derivado del clon 30.

25 La Figura 3 muestra una inmunotransferencia del alérgeno derivado del clon 30. Las muestras del alérgeno derivado del clon 30 se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron mediante nitrocelulosa y se incubaron con suero a partir de dos pacientes alérgicos a ácaros (1, 2) y un suero de un individuo no alérgico (3). Los anticuerpos IgE unidos específicos para el alérgeno derivado del clon 30 se detectaron con anticuerpos anti-humano IgE marcados con ¹²⁵I.

30 La Figura 4 muestra la reactividad de IgG de un antisuero de alérgeno derivado del anti clon 30 de conejo. El alérgeno derivado del clon 30 y el alérgeno de ácaros principal, Der p 2, se transfirieron por puntos sobre tiras de nitrocelulosa y se incubaron con 1: 1000-1: 1.000.000 de suero preimmune de conejo (A) o antisuero anti-alérgeno derivado del clon 30 (B). Los anticuerpos de IgG unidos se detectaron con anticuerpos completos de conejo marcados con ¹²⁵I de burro.

35 La Figura 5 muestra la actividad biológica del alérgeno derivado del clon 30. Se expusieron muestras de sangre de un paciente alérgico a ácaros a 10 µg/ml, 1 µg/ml y 0,1 µg/ml de alérgeno derivado del clon 30, a 1 µg/ml de anticuerpos anti-IgE o a PBS como control de tampón (Co) (eje x). La expresión de CD203c se determina mediante análisis de FACS y se mostró como índice de fluorescencia media (MFI) (eje y).

40 La Figura 6 muestra un análisis de la hidrofobicidad. (Kyte & Doolittle) del alérgeno derivado del clon 30 maduro usando ProtScale. Las posiciones de aminoácidos de la proteína madura que incluyen una metionina N- terminal se muestran sobre el eje x. B Predicción de los epítomos de células T posibles del alérgeno derivado del clon 30 con MULTIPRED, un sistema de computadores basado en la web. Los números en cada lado de la secuencia indican las posiciones de aminoácidos en el alérgeno derivado del clon 30 maduro.

Ejemplos:

45 Los ejemplos presentes describen la identificación de un nuevo alérgeno Der p principal que puede ser útil, por ejemplo, para diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos a Der p.

50 El ADNc que codifica este nuevo alérgeno de ácaros se aisló a partir de una genoteca de ADNc de expresión de Der p y se expresó en *Escherichia coli* (*E. coli*) como alérgeno recombinante. El nuevo alérgeno tiene un peso molecular de aproximadamente 8 kDa y se une a IgE a partir de más de 50% de pacientes alérgicos a ácaros, representando de este modo un alérgeno principal.

Ejemplo 1: Expresión y purificación del alérgeno derivado del clon 30

La secuencia del ADNc del clon 30 (Figura 1) que codifica el alérgeno derivado del clon 30 maduro previsto (nucleótidos 89 - 295 con un ATG adicional en el extremo N) se subclonó en el vector de expresión pET-17b

(Novagene, WI) y se expresó en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Stratagene, CA). Las células bacterianas se desarrollaron durante toda una noche en medio LB que contenía 100 mg/l de ampicilina a 27°C y la expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición de isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0,5 mM. Después del cultivo durante 6 adicionales a 27°C, las células de 1 litro de cultivo de *E. coli* se recogieron mediante centrifugación (15 min, 3.000 rpm, 4°C, Sorvall RC5C) y se volvieron a suspender los sedimentos en 30 ml de Imidazol 25 mM, pH 7,4/0,1% (v/v) Triton X 100. Después las células bacterianas se trataron con 300 µg de lisozima durante 20 min a temperatura ambiente. El lisado de las células bacterianas se congeló tres veces en nitrógeno líquido y se descongeló en un baño de agua a 50°C. El ADN genómico se degradó mediante la adición de 3 µg de ADNasa durante 10 min a temperatura ambiente seguido de la adición de 600 µl de NaCl 5M. Estas células de bacterias lisadas se centrifugaron 18.000 rpm, 20 min, 4°C y las proteínas de la fracción soluble que contiene el alérgeno derivado del clon 30 se trataron con 60% de sulfato de amonio durante 1,5 horas a 4°C. Las proteínas precipitadas se separaron mediante centrifugación (18.000 rpm, 20 min, 4°C) y la fracción soluble que contenía el alérgeno derivado del clon 30 se dializó contra sulfato de amonio 2M / fosfato de sodio 50mM pH 7,0/10 mg/l de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y se aplicó a una columna HiTrap Phenyl FF (alto sub) (Amersham Biosciences AB, Suecia). El alérgeno derivado del clon 30 se eluyó mediante un gradiente de sulfato de amonio 500-0 mM y las fracciones que contenían el alérgeno derivado del clon 30 se combinaron. Después de la diálisis contra Tris-Cl 20 mM pH 8,0/10mg/L PMSF, la muestra se aplicó a una columna de HiTrap DEAE Sepharose FF (Amersham Biosciences). El alérgeno derivado del clon 30 se eluyó mediante un gradiente NaCl 0 – 500 mM y se combinaron las fracciones que contenían 90% de alérgeno derivado del clon 30. El alérgeno derivado del clon 30 se dializó contra Tris-Cl 20 mM pH 8,0 y se almacenó a -20°C. Una muestra de proteína se analizó para determinar la pureza mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida al 14% (SDS- PAGE) y tinción de proteína por azul brillante Coomassie (Figura 2 A). El análisis de la masa molecular de la proteína madura mostró una masa de 7,98 kDa (Figura 2 B) que corresponde a la masa calculada de la secuencia de aminoácidos deducida del alérgeno derivado del clon 30 aunque en SDS-PAGE la proteína se desarrolla a aproximadamente 14 kDa (Figura 2A).

Ejemplo 2: Reactividad de IgE del alérgeno derivado del clon 30

La capacidad de unión a IgE del alérgeno derivado del clon 30 se demostró mediante análisis de inmunotransferencia usando dos sueros de individuos sensibilizados a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Figura 3). Muestras del alérgeno derivado del clon 30 se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron en nitrocelulosa. Se incubaron las tiras de nitrocelulosa con suero humano diluido 1:10 (1-3) y se detectaron los anticuerpos IgE unidos con anticuerpos IgE anti humanos diluidos 1:10 marcados con ¹²⁵I. Los sueros de los pacientes alérgicos a ácaros (1, 2) reaccionaron específicamente con el alérgeno derivado del clon 30. El suero de control de un individuo no alérgico (3) no reaccionaron con el alérgeno derivado del clon 30.

La frecuencia de unión a IgE se determinó en un ensayo ELISA con suero de 53 individuos alérgicos a ácaros con síntomas perennes indicadores de alergia a ácaros, SPT y D positivos. IgE-RAST específicos de pteronyssinus. Una placa ELISA (Nunc, Denmark) se revistió con 5 µg/ml de alérgeno derivado del clon 30 y se incubó con suero diluido 1:10 de los pacientes. Alérgicos a ácaros La unión de IgE humana se detectó con anticuerpos anti- humanos IgE diluidos 1:1000 conjugados a AKP (BD Biosciences-Pharmingen, NJ).

Veintinueve de los 53 sueros de pacientes alérgicos a ácaros (55%) mostraron reactividad de IgE al alérgeno derivado del con 30 (Tabla I).

Tabla I. Frecuencia de unión a IgE del alérgeno derivado del clon 30

| Proteína recombinante | Número de pacientes con reactividad a IgE | Porcentaje de reactividad de IgE |
|-------------------------------|---|----------------------------------|
| Alérgeno derivado del clon 30 | 29 (n = 53) | 55 |

Ejemplo 3: La inmunización con el alérgeno derivado del clon 30 induce anticuerpos IgG en conejos

Con el fin de analizar si el alérgeno derivado del clon 30 es inmunogénico, se inmunizó un conejo con el nuevo alérgeno usando adyuvante de Freund. El conejo se inmunizó tres veces con 200 µg de proteína/inyección usando una vez adyuvante Freund completo y dos veces incompletos (Charles River, Alemania).

La inducción de anticuerpos IgG se estudió mediante experimentos de transferencia por puntos. Der p 2 recombinante y el alérgeno derivado del clon 30 se transfirieron por puntos sobre tiras de nitrocelulosa (0,5 µg/punto) y las tiras se incubaron con suero de conejo preinmune diluido 1:1000, 1:10.000, 1:100.000 y 1:1.000.000 y antisuero anti-alérgeno derivado del clon 30. Los anticuerpos IgG unidos se detectaron con anticuerpos completos anti conejo marcados con ¹²⁵I de burro (Amersham).

Se indujeron anticuerpos específicos IgG con el alérgeno derivado del clon 30 (Figura 4). El antisuero de alérgeno derivado del clon 30 anti clon reaccionó de manera específica con el alérgeno derivado del clon 30 hasta una

dilución de 1:100.000 y no se observó reacción con Der p 2 (Figura 4 B). El suero preinmune no reaccionó con el alérgeno derivado del clon 30 y Der p 2 (Figura 4 A).

Ejemplo 4: Anticuerpos IgG inducidos con el alérgeno derivado del clon 30 en conejos bloquean la unión de IgE de los pacientes alérgicos al alérgeno derivado del clon 30

5 La capacidad de los anticuerpos de conejo específicos para que el alérgeno derivado del clon 30 bloquee la unión de
pacientes IgE al alérgeno se examinó mediante ensayos de inhibición de ELISA. El ELISA de alérgeno derivado del
clon 30 unido a la placa (5 µg/ml) se preincubó con 1:100 en PBST/0,5% (p/v) anticuerpos de alérgeno derivado del
anti clon 30 diluidos en BSA o suero preinmune de conejo de conejo y se incubó a 4°C durante toda una noche.
10 Posteriormente, la placa se expuso a 1:5 en PBST/ 0,5% (p/v) suero diluido en BSA de 14 pacientes alérgicos a
ácaros durante toda una noche a 4°C. Los anticuerpos IgE unidos se detectaron con anticuerpos IgE antihumano
de cabra acoplados a HRP (Kirkegaard & Perry Gaithersbury, MD) dilución 1:2500 en PBST/ 0,5% de BSA. El grado
de inhibición se calculó como sigue: % de inhibición de unión de IgE binding = $100 - OD_{\text{anti-clon 30-suero derivado}} \times 100 / DO_{\text{suero preinmune}}$.

15 Para la mayoría de los pacientes se puede observar una fuerte inhibición de la unión de IgE, que varía entre 25 y
97% (media: 82%) (Tabla II). En la mitad de los sueros, la unión de IgE al alérgeno derivado del clon 30 se inhibió en
un 90% o más.

Tabla II. Anticuerpos de IgG derivados del anti clon 30 de conejo inhiben la unión de IgE del suero de los pacientes alérgicos a ácaros al alérgeno derivado del clon 30

| Preincubación con | Número de paciente | | | | | | | | | | | | | | media |
|---|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |
| Suero preinmune (Valores de DO) | 0,569 | 1,140 | 0,451 | 0,982 | 2,520 | 0,628 | 0,790 | 0,347 | 0,484 | 0,269 | 0,553 | 1,333 | 1,638 | 1,038 | 0,910 |
| Suero derivado del anticlon 30 (valores DO) | 0,060 | 0,083 | 0,070 | 0,155 | 0,220 | 0,039 | 0,071 | 0,101 | 0,029 | 0,078 | 0,415 | 0,047 | 0,362 | 0,137 | 0,133 |
| % de inhibición de unión de IgE | 90 | 93 | 85 | 84 | 91 | 94 | 91 | 71 | 94 | 71 | 25 | 97 | 78 | 87 | 82 |

Ejemplo 5: El alérgeno derivado del clon 30 es biológicamente activo

La regulación por aumento de CD203c sobre los basófilos se puede usar como marcador para la activación inducida y posterior desgranulación de basófilos y por lo tanto para la determinación de la actividad alérgica de un alérgeno. Muestras de sangre heparinizada (100 µl) de un paciente alérgico a ácaros se incubaron con diversas concentraciones de alérgeno derivado del clon 30, un anticuerpo monoclonal anti-IgE (Inmunotech, France) o PBS durante 15 minutos a 37°C. La expresión de CD203c se determinó mediante citometría de flujo de dos colores sobre un a FACScan (Becton Dickinson, CA).

El alérgeno derivado del clon 30 indujo la regulación por aumento de la expresión de CD203c sobre basófilos de un paciente alérgico a ácaros a una concentración de 10 µg/ml (Figura 5). Los IgE anticuerpos de IgE anti-humanos (control positivo) indujeron regulación por aumento de la expresión de CD203c a 1 µg/ml, mientras con el control negativo (PBS solo) no se obtuvo ninguna regulación por aumento.

Ejemplo 6: Regiones expuestas a superficie y posibles epítomos de células T del alérgeno derivado del clon 30

Las regiones hidrófilas de una proteína se van a exponer probablemente sobre la superficie de la molécula y pueden ser potencialmente antigénicas. Por lo tanto, las regiones hidrófilas sobre la superficie del alérgeno derivado del clon 30 pueden representar epítomos de células B potenciales. ProtScale (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>) permite la computación y presentación del perfil de hidrofobicidad (Kyte & Doolittle) producida por cualquier escala de aminoácidos del alérgeno derivado de 30 de la proteína. Un tamaño de ventana de 7 se eligió para la investigación estructural. El rendimiento ProtScale del alérgeno derivado del clon 30 maduro muestra una proteína con gran cantidad de máximos negativos que representan segmentos hidrófilos (Figura 6 A). Los epítomos de células del alérgeno derivado del clon 30 localizados entre los aminoácidos 3 - 12, 15 - 28, 34 - 43 y 49 - 68 de la proteína madura.

Las células T del sistema inmunológico humano reconocen alérgenos como fragmentos de péptidos cortos (epítomos de células T) derivados de la degradación de los alérgenos. MULTIPRED (<http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred/>) es un sistema de ordenador basado en la página web para la predicción de péptidos que se unen a múltiples moléculas que pertenecen a los alelos de antígenos de leucocitos humanos (HLAs; MHC humano, complejo de histocompatibilidad principal). Los resultados predichos para los péptidos de 9 unidades individuales con una 'Suma' (la suma de las puntuaciones de unión individuales del péptido a las moléculas MHC) sobre 40 se muestran en la Figura 6 B. Los epítomos de células B se localizan cerca del extremo N- y C- del alérgeno derivado del clon 30 maduro.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biomay AG
 <120> Alérgeno de ácaros del polvo doméstico
 <130> R 49723
 35 <150> AT A 733/2006
 <151> 28 de abril de 2008
 <160> 16
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 40 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides pteronyssinus
 <400> 1

Met Lys Phe Asn Ile Ile Ile Val Phe Ile Ser Leu Ala Ile Leu Val
 1 5 10 15
 His Ser Ser Tyr Ala Ala Asn Asp Asn Asp Asp Asp Pro Thr Thr Thr
 20 25 30
 Val His Pro Thr Thr Thr Glu Gln Pro Asp Asp Lys Phe Glu Cys Pro
 35 40 45
 Ser Arg Phe Gly Tyr Phe Ala Asp Pro Lys Asp Pro His Lys Phe Tyr
 50 55 60
 Ile Cys Ser Asn Trp Glu Ala Val His Lys Asp Cys Pro Gly Asn Thr
 65 70 75 80
 Arg Trp Asn Glu Asp Glu Glu Thr Cys Thr
 85 90

<210> 2

<211> 472

<212> ADN

5 <213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 2

caatattttc tgcttgtttt tgaaaatgaa attcaacata atcatcgttt ttatttcgtt 60
 ggccattttg gtccattcat catatgccgc caatgataat gatgatgatc ctaccacaac 120
 cgttcatcca acaacaaccg aacaaccaga tgataaattt gaatgtccaa gtagatttgg 180
 ttattttgcc gatccaaaag atccacataa attttatatc tgttcaaatt gggaagctgt 240
 acataaagat tgtccaggta atacacgatg gaatgaagat gaagaaacat gcacttaata 300
 atgcaataaa attatgattt attatggtaa ttcataaatc aacgttcaac aaaaaatcat 360
 aaatttttat tccaataaat tcatttttat gttgtattac atgcttgtca atttattaca 420
 aaataataaa attatttatt tacaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 472

<210> 3

<211> 70

10 <212> PRT

<213> Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 3

ES 2 339 173 T5

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

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

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

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

Asp Glu Glu Thr Cys Thr
65 70

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 4

Asn Asp Asp Asp Pro Thr Thr Thr Val
1 5

10 <210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 5

Pro Thr Thr Thr Val His Pro Thr Thr
1 5

<210> 6

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 6

Thr Thr Thr Val His Pro Thr Thr Thr
1 5

<210> 7

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 7

10

Thr Thr Val His Pro Thr Thr Thr Glu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 8

Thr Val His Pro Thr Thr Thr Glu Gln
1 5

<210> 9

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

25 <400> 9

Thr Thr Thr Glu Gln Pro Asp Asp Lys
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

ES 2 339 173 T5

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 10

Thr Thr Glu Gln Pro Asp Asp Lys Phe
1 5

<210> 11

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

10 <400> 11

Phe Tyr Ile Cys Ser Asn Trp Glu Ala
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 12

Tyr Ile Cys Ser Asn Trp Glu Ala Val
1 5

20 <210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 13

Ile Cys Ser Asn Trp Glu Ala Val His
1 5

<210> 14

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 339 173 T5

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 14

Ser Asn Trp Glu Ala Val His Lys Asp
1 5

<210> 15

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

10 <400> 15

Ala Val His Lys Asp Cys Pro Gly Asn
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo de células T del alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus

<400> 16

Thr Arg Trp Asn Glu Asp Glu Glu Thr
1 5

20

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1 o que comprende al menos un fragmento de aminoácidos que consiste en un epítipo de células T de al menos 8 restos de aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1, en el que la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1 codifica un alérgeno y el polipéptido comprende al menos un epítipo de células T reconocido por un receptor de células T específico de una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1.
- 10 **2.** Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la secuencia de aminoácidos es al menos 70%, preferentemente al menos 80%, más preferentemente al menos 90%, lo más preferentemente al menos 95%, en particular 100%, idéntica a la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1.
- 3.** Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** dicho polipéptido es hipoalérgico.
- 4.** Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** dichos fragmentos de aminoácidos están fusionados conjuntamente en un orden diferente del orden de dichos fragmentos en la SEC ID N° 1.
- 15 **5.** Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** dicho al menos un fragmento de aminoácido está seleccionado del grupo que consiste en moléculas de aminoácido que comprenden los aminoácidos NDDDPTTTV, PTTTVHPTT, TTTVHPTTT, TTVHPTTTE, TVHPTTTEQ, TTTEQPDDK, TTEQPDDKF, FYICSNWEA, YICSNWEAV, ICSNWEAVH, SNWEAVHKD, AVHKDCPGN y TRWNEDEET.
- 6.** Molécula de ADN que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 **7.** Vector que comprende una molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 6.
- 8.** Célula transformada con un vector de acuerdo con la reivindicación 6.
- 9.** Anticuerpo que se une a un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 10.** Formulación de vacuna que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9.
- 25 **11.** Uso de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el diagnóstico in vitro de una alergia, en particular de la alergia a ácaros del polvo doméstico, en un individuo.
- 12.** Uso de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, para la preparación de un medicamento para la inmunoterapia de una alergia, en particular de alergia a ácaros del polvo doméstico.
- 30 **13.** Uso de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, para la preparación de un medicamento para la prevención de la sensibilización a un alérgeno, en particular de sensibilización a alérgeno de ácaros del polvo doméstico.
- 14.** Uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, **caracterizado porque** dicho medicamento además contiene adyuvantes, diluyentes, conservantes o mezclas de los mismos.
- 35 **15.** Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado porque** el medicamento comprende 10 ng a 1 g, preferentemente 100 ng a 10 mg, especialmente 0,5 µg a 200 µg de dicho polipéptido.

ca

3 atatattttctgcttggtttttgaaa ATG AAA TTC AAC ATA ATC ATC
M K F N I I I 7

47 GTT TTT ATT TCG TTG GCC ATT TTG GTC CAT TCA TCA TAT
V F I S L A I L V H S S Y 20

86 GCC GCC AAT GAT AAT GAT GAT GAT CCT ACC ACA ACC GTT
A A N D N D D D P T T T V 33

125 CAT CCA ACA ACA ACC GAA CAA CCA GAT GAT AAA TTT GAA
H P T T T E Q P D D K F E 46

164 TGT CCA AGT AGA TTT GGT TAT TTT GCC GAT CCA AAA GAT
C P S R F G Y F A D P K D 59

203 CCA CAT AAA TTT TAT ATC TGT TCA AAT TGG GAA GCT GTA
P H K F Y I C S N W E A V 72

242 CAT AAA GAT TGT CCA GGT AAT ACA CGA TGG AAT GAA GAT
H K D C P G N T R W N E D 85

281 GAA GAA ACA TGC ACT TAAtaatgcaataaaattatgatttattatg
E E T C T

327 gtaattcataaatcaacgttcaacaaaaaatcataaattttttattccaata

379 aattcattttttatggttgattacatgcttgcaattttattacaaaataata

431 aaattattttatttacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Fig. 1

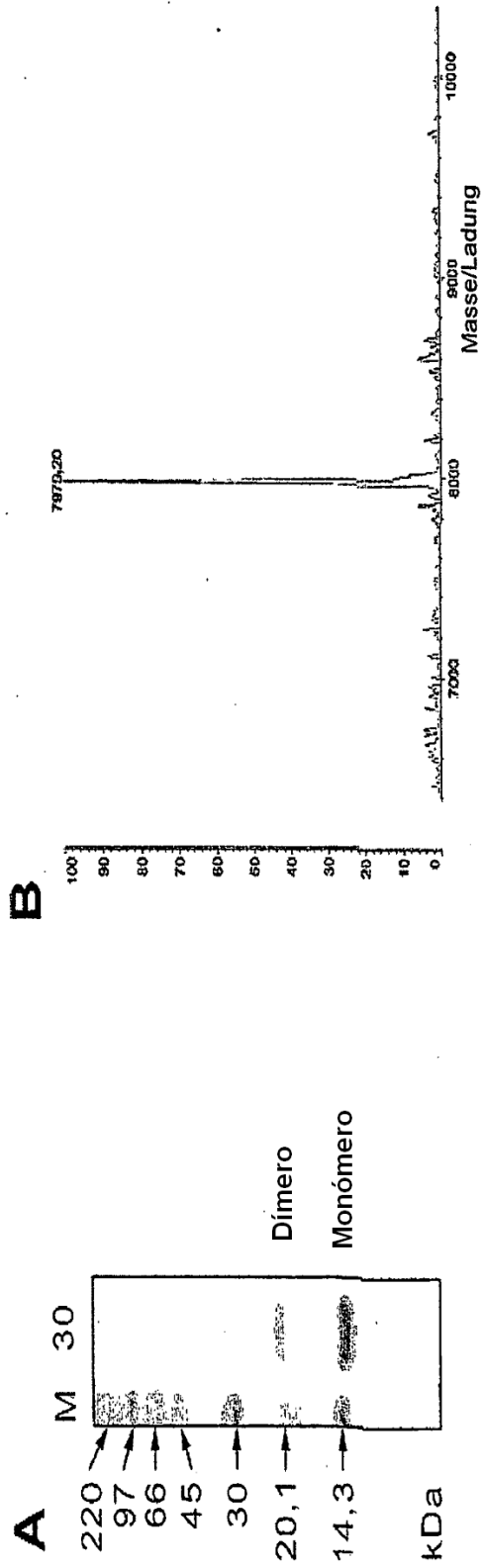


Fig. 2

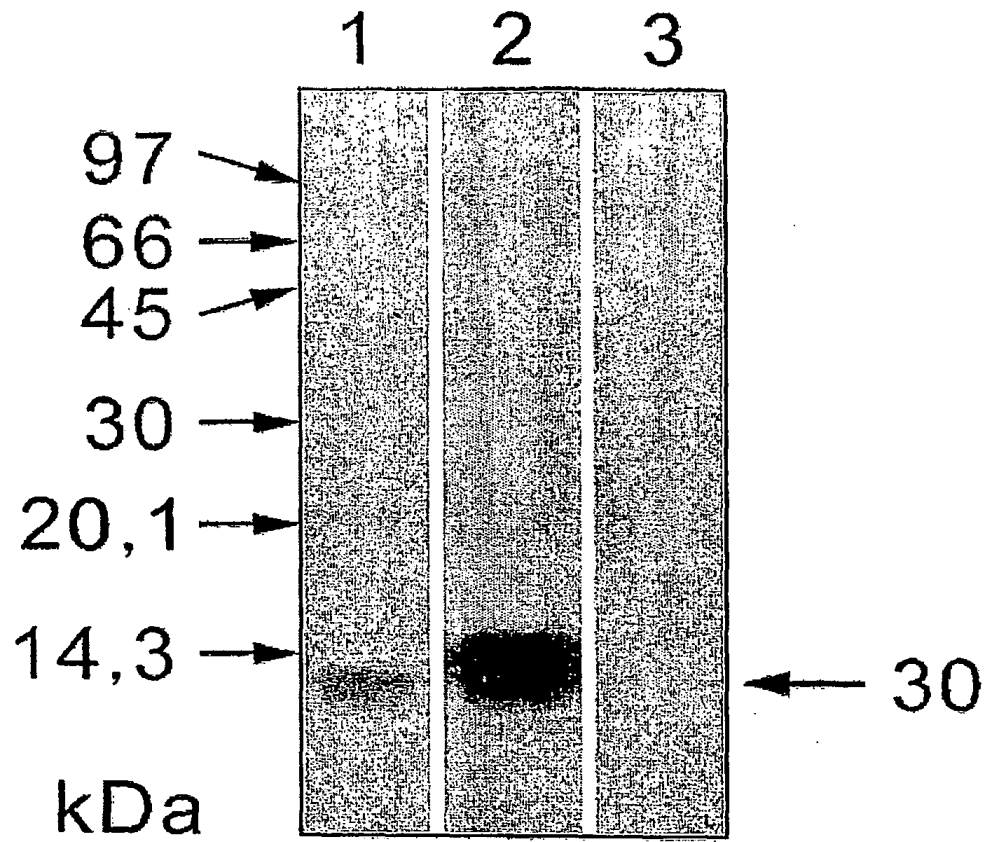


Fig. 3

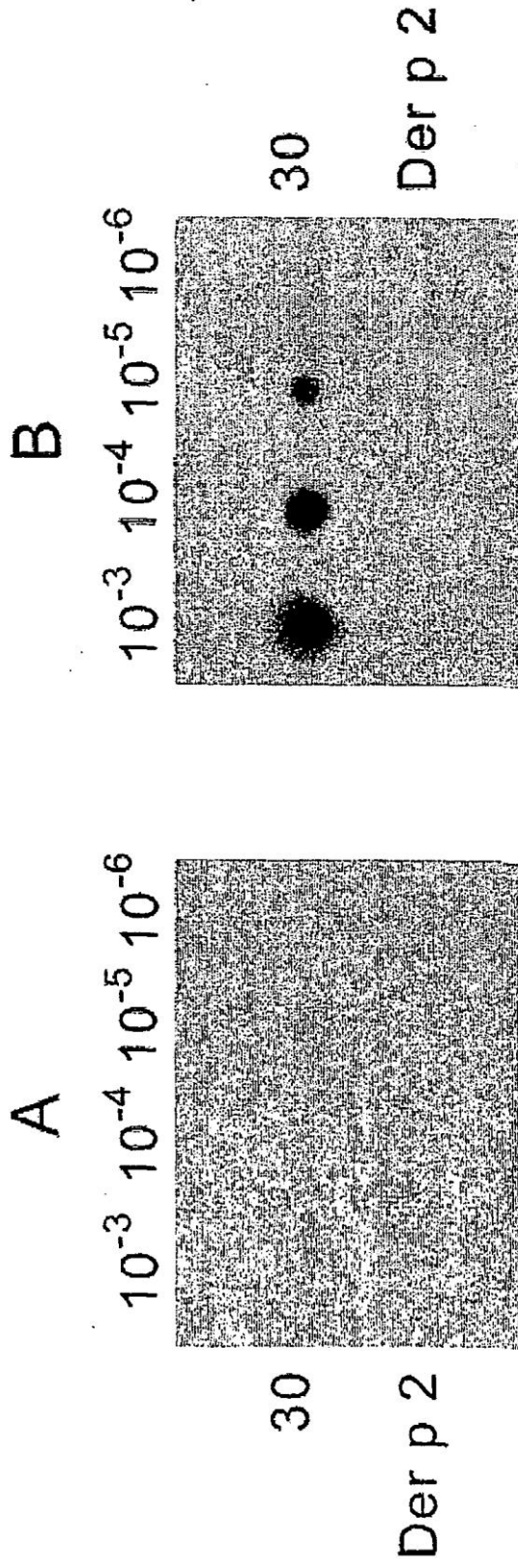


Fig. 4

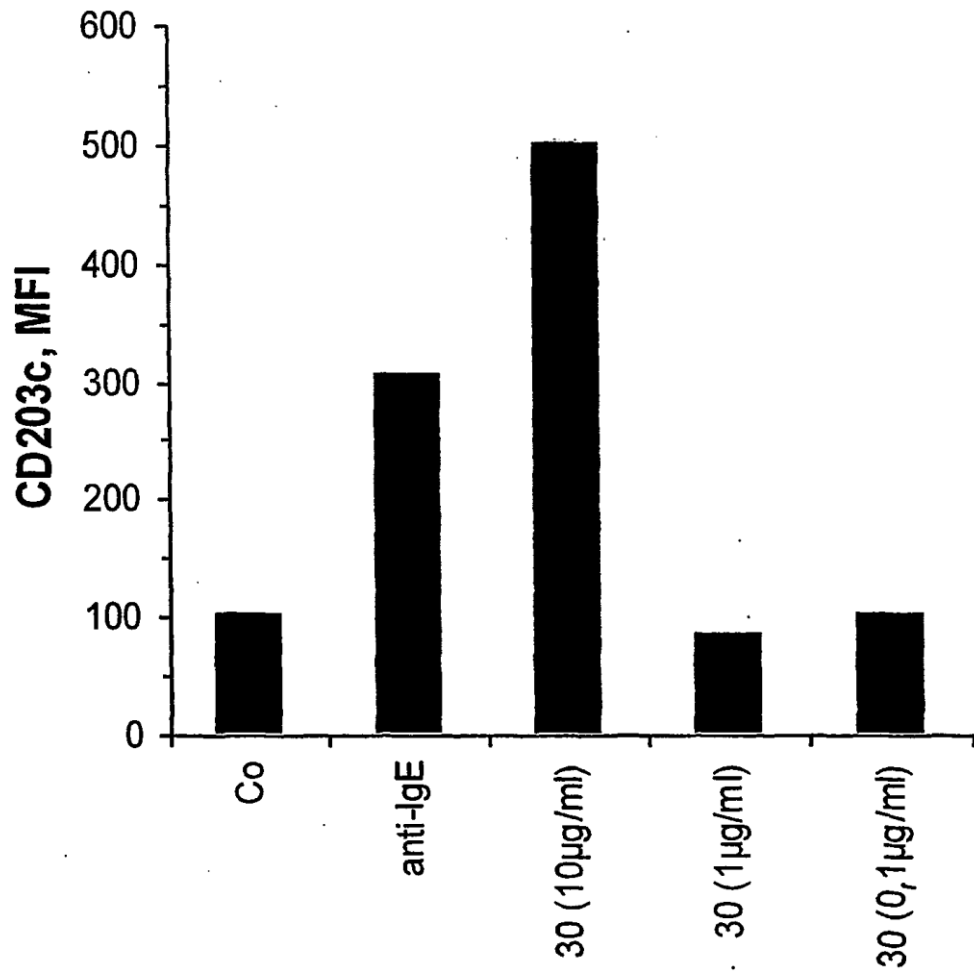
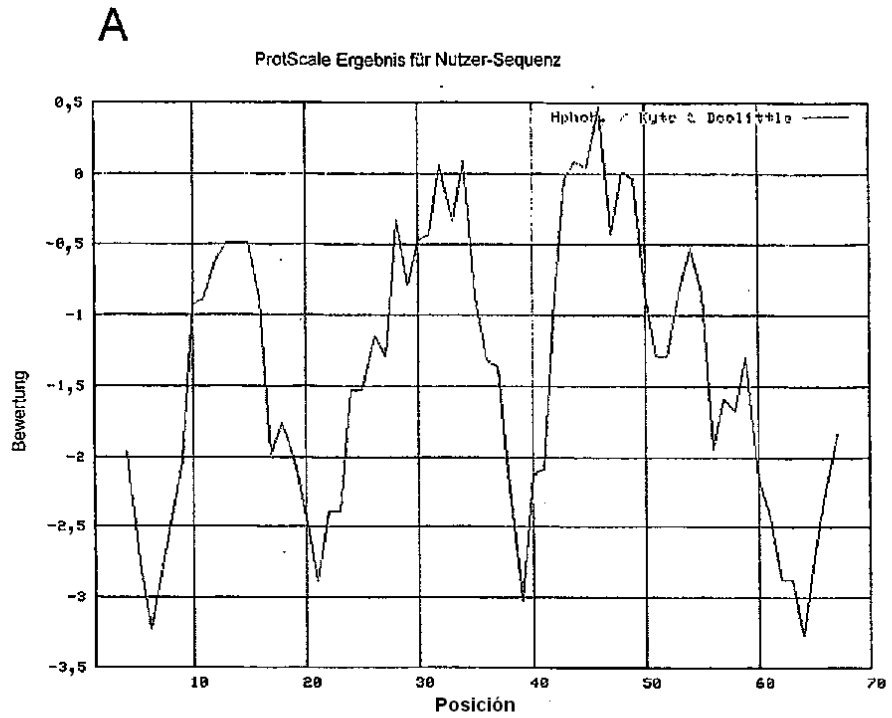


Fig. 5



B

```

1  MANDNDDDP TTVHPTTTEQPDDKEECPSREFGYFADPKDP 40
   NDDDP TTV
     PTTTVHPTT
       TTTVHPTT
         TTVHPTTE
           TVHPTTTEQ
             TTEQPDDK
               TTEQPDDKE

41  HKFYICSNWEAVHKDCPGNTRWNEDEETCT 70
     FYICSNWEA
       YICSNWEAV
         ICSNWEAVH
           SNWEAVHKD
             AVHKDCPGN
               TRWNEDEET

```

Fig. 6