

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.08.15	(73) Titular(es): CIRCASSIA LIMITED MAGDALEN CENTRE THE OXFORD SCIENCE PARK OXFORD OX4 4GA GB
(30) Prioridade(s): 2007.08.15 GB 0715949 2007.08.20 GB 0716224 2007.11.28 GB 0723337	(72) Inventor(es): RODERICK PETER HAFNER GB MARK LARCHE CA PAUL LAIDER GB
(43) Data de publicação do pedido: 2011.12.21	(74) Mandatário: FERNANDO ANTÓNIO FERREIRA MAGNO RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º 1200-195 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2015.07.15 212/2015	

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS PARA DESSENSIBILIZAÇÃO CONTRA ALERGÉNIOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO PÉPTIDOS PARA A PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE ALERGIA A ÁCAROS DO PÓ DOMÉSTICO, E EM PARTICULAR A COMBINAÇÕES ÓTIMAS DE PÉPTIDOS PARA A PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DA REFERIDA ALERGIA.

RESUMO

"Péptidos para dessensibilização contra alergénios"

A presente invenção refere-se a composições compreendendo péptidos para a prevenção ou tratamento de alergia a ácaros do pó doméstico, e em particular a combinações ótimas de péptidos para a prevenção ou tratamento da referida alergia.

DESCRIÇÃO

"Péptidos para dessensibilização contra alergénios"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a composições que compreendem péptidos para prevenção ou tratamento de alergia a ácaros do pó doméstico e, em particular, a combinações ótimas de péptidos para prevenção ou tratamento da referida alergia.

Antecedentes da Invenção

O reconhecimento de antigénios por células T requer que células apresentadoras de antigénio (APC) apresentem fragmentos de antigénio (péptidos) nas suas superfícies celulares em associação com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As células T utilizam os seus recetores de células T específicos dos antigénios (TCR) para reconhecer os fragmentos de antigénio apresentados pelas APC. Este reconhecimento atua como um gatilho para o sistema imunitário gerar uma gama de respostas para erradicar o antigénio que foi reconhecido.

O reconhecimento de antigénios externos pelo sistema imunitário de um organismo, como um ser humano, pode em alguns casos resultar em doenças, conhecidas como condições atópicas. São exemplos destas últimas as doenças alérgicas incluindo asma, dermatite atópica e rinite alérgica. Neste grupo de doenças, os linfócitos B geram anticorpos da classe IgE (em seres humanos) que se ligam a antigénios derivados externamente que são referidos como alergénios neste contexto uma vez que estas moléculas eliciam uma resposta alérgica. A produção de IgE específicos para alergénios depende dos linfócitos T que são também ativados pelo (são específicos para o) alergénio. Os anticorpos IgE específicos para o alergénio ligam-se à superfície de células como basófilos e mastócitos, em virtude da expressão por estas células de recetores de superfície para IgE.

A ligação cruzada de moléculas de IgE ligadas à superfície por um alergénio resulta na desgranulação destas células efectoras causando a libertação de mediadores inflamatórios tais como histamina, 5-hidroxitriptamina e mediadores

lipídicos, tais como sulfidoleucotrienos. Para além dos eventos dependentes de IgE, algumas doenças alérgicas como a asma são caracterizadas por eventos independentes de IgE.

As doenças alérgicas mediadas por IgE são atualmente tratadas com agentes que proporcionam alívio ou prevenção dos sintomas. São exemplos destes agentes os anti-histamínicos, os agonistas ² e os glucocorticosteroides. Adicionalmente, algumas doenças mediadas por IgE são tratadas por procedimentos de dessensibilização que envolvem a injeção periódica de componentes ou extratos alergénicos. Os tratamentos de dessensibilização podem induzir uma resposta de IgG que compete com IgE pelo alergénio, ou podem induzir células T supressoras específicas que bloqueiam a síntese de IgE dirigido contra o alergénio. Esta forma de tratamento nem sempre é eficaz e apresenta o risco de provocar efeitos secundários graves, particularmente choque anafilático geral. Isto pode ser fatal a menos que seja imediatamente detetado e tratado com adrenalina. Um tratamento terapêutico que reduzisse ou eliminasse a resposta alérgico-imunitária indesejada contra um alergénio particular, sem alterar a reatividade imunitária contra outros antigénios estranhos, nem desencadear ele próprio uma resposta alérgica, seria de grande benefício para os indivíduos alérgicos.

Os ácaros do pó doméstico são universalmente reconhecidos como uma importante causa de doenças alérgicas nos seres humanos e nos animais, incluindo asma, rinite alérgica e dermatite alérgica. Duas espécies estreitamente relacionadas de ácaros são responsáveis pela maioria dos casos de alergia aos ácaros do pó doméstico a nível mundial. São o *Dermatophagoides pteronyssinus* (predominante na Europa) e o *Dermatophagoides farinae* (predominante na América). Os alergénios dos ácaros do pó doméstico derivam principalmente de proteínas do revestimento do intestino do ácaro, que estão presentes nas fezes, e são tipicamente referidos como proteína Der p (para *D. pteronyssinus*) ou proteína Der f (para *D. farinae*). Um ácaro médio produzirá aproximadamente 20 peletes fecais por dia durante a sua vida: duas vezes o peso do seu próprio corpo. Um grama de pó pode tipicamente conter até 500 ácaros, enquanto um colchão pode ter mais de dois milhões. A quantidade de material de ácaros presente aumenta com a idade. Um décimo do peso de uma almofada com seis anos pode consistir em ácaros ou resíduos

de ácaros. Num tapete haverá tipicamente entre 1000 a 10 000 ácaros por metro quadrado.

As doenças alérgicas, particularmente a asma, são um problema enorme e crescente nos países industrializados. Calculou-se que 5-10% da população dos principais países industrializados sofre de asma. Desses, aproximadamente um quinto terá asma grave, requerendo hospitalização frequentemente. O custo da asma nos Estados Unidos foi calculado em 12,6 bilhões de dólares (7,9 bilhões de libras) por ano. Os valores para a Europa são ainda mais elevados. Um estudo canadiano estimou os custos da asma em média em 21 libras por ano para cada membro da população dos principais países industrializados. Só no Reino Unido, 2000 pessoas morrerão em resultado de asma todos os anos.

A asma é uma doença crónica causada por reações alérgicas e irritação no sistema respiratório. Entre 50% e 90% dos asmáticos que reagem ao material veiculado pelo ar são sensíveis aos alergénios dos ácaros do pó e num estudo britânico 10% da população geral reagiu a alergénios dos ácaros do pó. Quase duzentos milhões de americanos vivem em áreas gravemente afetadas por infestações por ácaros do pó doméstico. A sensibilização a este material ocorre na infância, principalmente entre os três e os seis meses de idade, mas a asma dura toda a vida.

Um tratamento terapêutico ou preventivo teria portanto grande benefício para os seres humanos que sofrem ou estão em risco de sofrer de alergia aos ácaros do pó doméstico.

Sumário da Invenção

Os presentes inventores verificaram que determinadas combinações de fragmentos peptídicos derivados do alergénio dos ácaros do pó do Grupo 1 (Der p 1, Der f 1), do alergénio dos ácaros do pó do Grupo 2 (Der p 2, Der f 2) e do alergénio dos ácaros do pó do Grupo 3 (Der p 7, Der f 7) são particularmente úteis na dessensibilização de indivíduos a esses alergénios. As combinações de polipéptidos da invenção foram selecionadas pela sua capacidade de induzir uma resposta de citóquinas numa proporção elevada de indivíduos de um painel de indivíduos alérgicos aos ácaros do pó doméstico.

Os polipéptidos da invenção foram inicialmente selecionados como epítomos de células T através da utilização de avaliações, tanto *in silico* como *in vitro*, das características de ligação péptido-MHC. Veja-se, por exemplo, a Tabela 3 que demonstra a capacidade de uma gama de péptidos derivados dos alergénios acima se ligar a múltiplos tipos de DR em ensaios de ligação ao MHC de classe II. Epítomos adicionais foram identificados por homologia. Estes polipéptidos candidatos foram então adicionalmente rastreados quanto a potencial utilização na criação de tolerância ("tolerabilização").

Uma dificuldade associada às abordagens de dessensibilização à base de imunização com péptidos reside em como selecionar um tamanho e uma região adequados do alergénio como base para o péptido ser utilizado na imunização. O tamanho do péptido de eleição é crucial. Se o péptido for demasiado pequeno, a vacina não será eficaz na indução de uma resposta imunológica. Se os péptidos forem demasiado grandes ou se for introduzido o antigénio inteiro num indivíduo, há o risco de induzir reações adversas, como anafilaxia, que podem ser fatais.

Os polipéptidos da invenção foram selecionados de modo a reterem a especificidade de células T, ao mesmo tempo que sendo suficientemente pequenos para não possuir uma estrutura terciária significativa que lhes permitisse manter a conformação de um epítomo de ligação a IgE da molécula completa. Os polipéptidos da invenção não induzem portanto ligação cruzada significativa de moléculas IgE específicas adjacentes em células como mastócitos e basófilos e consequentemente não causam uma libertação significativa de histamina.

Uma vantagem da invenção é a capacidade de combinações de péptidos terem como alvo largamente as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os recetores de células T (TCR) são altamente variáveis na sua especificidade. A variabilidade é gerada, tal como com as moléculas de anticorpos, através de eventos de recombinação genética no interior da célula. Os TCR reconhecem o antigénio sob a forma de péptidos curtos ligados a moléculas codificadas pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Estes produtos génicos são as mesmas moléculas que originam os "tipos de tecidos" utilizados nos transplantes e também são referidos

como moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA), designações que podem ser utilizadas indistintamente. As moléculas individuais do MHC possuem fendas de ligação aos péptidos que, devido ao seu formato e carga, apenas são capazes de se ligar a um grupo limitado de péptidos. Os péptidos ligados por uma molécula do MHC podem não ser necessariamente ligados por outras moléculas do MHC.

Quando uma molécula de proteína como um antígeno ou um alergénio é assimilada por células apresentadoras de antígeno tais como linfócitos B, células dendríticas, monócitos e macrófagos, a molécula é degradada enzimaticamente dentro da célula. O processo de degradação dá origem a fragmentos peptídicos da molécula que, se tiverem o tamanho, carga e formato apropriados, podem então ligar-se dentro da fenda de ligação aos péptidos de determinadas moléculas do MHC e ser subsequentemente exibidas na superfície de células apresentadoras de antígeno. Se os complexos péptido/MHC estiverem presentes na superfície da célula apresentadora de antígeno em números suficientes podem então ativar células T que são portadoras dos recetores de células T apropriados específicos do péptido/MHC.

Devido à natureza polimórfica do MHC, os indivíduos numa população não consanguínea como a humana irão expressar combinações diferentes de moléculas do MHC nas suas superfícies celulares. Uma vez que diferentes moléculas do MHC se podem ligar a diferentes péptidos da mesma molécula com base no tamanho, carga e formato do péptido, indivíduos diferentes irão apresentar um repertório diferente de péptidos ligados às suas moléculas do MHC. A identificação de epítomos peptídicos de ligação ao MHC universais numa população não consanguínea como a humana é mais difícil do que no caso de animais consanguíneos (como determinadas linhagens de ratinhos de laboratório). Com base na expressão diferencial do MHC entre indivíduos e nas diferenças inerentes na ligação e apresentação de péptidos, que esta origina, é improvável que possa ser identificado um péptido único que seja útil para terapia de dessensibilização em seres humanos.

As combinações de péptidos da invenção, contudo, proporcionam uma ampla cobertura de eficácia na população humana ao visarem múltiplas moléculas do MHC diferentes. Uma vacina

formulada com os péptidos da invenção teria, portanto, uma utilidade abrangente.

O trabalho dos inventores produziu combinações de péptidos com as seguintes características:

- a combinação induz uma resposta de citóquinas numa elevada proporção de indivíduos de um painel de indivíduos alérgicos aos ácaros do pó doméstico,
- os péptidos das combinações são solúveis.

Deste modo, a presente invenção proporciona uma composição para utilização na prevenção ou tratamento de alergia aos ácaros do pó doméstico compreendendo o polipéptido de HDM201 ESVKYVQSNNGAI (SEQ ID 80), ou uma sua variante que tem 9 a 30 aminoácidos de comprimento e compreende:

- a sequência do referido polipéptido; ou
- uma sequência que tem pelo menos 65% de homologia com a sequência do referido polipéptido; ou
- um fragmento da sequência do referido polipéptido que tem pelo menos nove aminoácidos de comprimento.

A invenção proporciona ainda o polipéptido de HDM201 ESVKYVQSNNGAI (SEQ ID 80) ou uma sua variante, conforme definido acima.

É aqui também descrita uma composição para utilização na prevenção ou tratamento de alergia aos ácaros do pó doméstico por criação de tolerância, compreendendo pelo menos um polipéptido selecionado entre HDM203B (SEQ ID NO: 83), HDM201 (SEQ ID NO: 80), HDM205 (SEQ ID NO: 85), HDM203A (SEQ ID NO: 82), HDM202 (SEQ ID NO: 81), SEQ ID NO: 1 a 79, 84, ou 86 a 104 (ou seja, qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 104) ou uma sua variante. Tipicamente, a composição compreende pelo menos quatro polipéptidos, em que os polipéptidos são independentemente selecionados entre qualquer um dos seguintes:

(i) um polipéptido de SEQ ID NO: 1 a 104; ou

(ii) uma variante de um polipéptido de acordo com (i), em que a referida variante é um polipéptido com 9 a 30 aminoácidos de comprimento, que compreende uma região que consiste em:

- qualquer das sequências de (i); ou
- uma sequência que tem pelo menos 65% de homologia com qualquer das sequências de (i), sequência essa que é capaz de criar tolerância num indivíduo a qualquer das sequências de (i); ou

(iii) uma variante de um polipéptido de acordo com (i), em que a referida variante é um polipéptido com 9 a 30 aminoácidos de comprimento que compreende uma região que consiste numa sequência que representa:

- um fragmento de qualquer das sequências de (i); ou
- um homólogo de um fragmento de qualquer das sequências de (i),

sequência essa que é capaz de criar tolerância num indivíduo a qualquer das sequências de (i) e que tem pelo menos 9 aminoácidos de comprimento, e em que o referido homólogo tem pelo menos 65% de homologia com quaisquer 9 aminoácidos contíguos em qualquer das sequências de (i).

Descrição das figuras

Figura 1 - Comparação de sequências de Der p 1 *versus* Der f 1 (Fig. 1A), Der p 2 *versus* Der f 2 (Fig. 1B) e Der p 7 *versus* Der f 7 (Fig. 1C). As regiões que contêm epítomos estão destacadas a cinzento. As localizações de péptidos específicos estão indicadas por linhas acima ou abaixo da sequência. A sequência de Der p 1 é a sequência disponível ao público com o n.º de acesso no NCBI P08176. As sequências correspondentes para Der p 2 e Der p 7 (Tabela 6) têm os n.º de acesso no NCBI P49278 e P49273, respetivamente. A sequência para Der f 1 é retirada do n.º de acesso no NCBI P16311, para Der f 2 é do n.º de acesso no NCBI Q00855 e para Der f 7 é do n.º de acesso no NCBI Q26456.

A Figura 2 mostra a percentagem de indivíduos responsivos a diferentes péptidos da invenção, medida pela produção de IL-13 ou IFN-gama.

As Figuras 3 e 4 mostram a percentagem de indivíduos responsivos a diferentes combinações de péptidos da invenção, medida pela produção de IL-13 ou IFN-gama.

Descrição das sequências aqui mencionadas

As SEQ ID NO: 1 a 104 proporcionam as sequências polipeptídicas como estabelecido nas Tabelas 3 a 8. As SEQ ID NO: 105 e seguintes proporcionam sequências adicionais.

Descrição detalhada da invenção

A invenção refere-se a péptidos e combinações de péptidos que podem ser utilizados na criação de tolerância. Os péptidos aqui descritos podem compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em, as sequências apresentadas em qualquer uma de: HDM203B (SEQ ID NO: 83), HDM201 (SEQ ID NO: 80), HDM205 (SEQ ID NO: 85), HDM203A (SEQ ID NO: 82), HDM202 (SEQ ID NO: 81), SEQ ID NO: 1 a 79, 84, ou 86 a 104 (isto é qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 104). Podem também ser utilizadas variantes destes péptidos específicos. As variantes podem compreender, consistir em, ou consistir essencialmente em sequências que são fragmentos de qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 104 ou homólogos de qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 104.

Numa concretização, a invenção refere-se a uma composição para utilização na prevenção ou tratamento de alergia aos ácaros do pó doméstico. Tipicamente, a composição compreende ou consiste em, pelo menos quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze ou doze polipéptidos, até um máximo de treze. Por outras palavras, a composição compreende entre quarto e treze polipéptidos. Os polipéptidos aqui descritos são selecionados independentemente, de qualquer dos seguintes:

(i) um polipéptido de SEQ ID NO: 1 a 104; ou

(ii) uma variante de um polipéptido de acordo com (i), em que a referida variante é um polipéptido com 9 a 30 aminoácidos de comprimento que compreende uma região que consiste em:

- qualquer das sequências de (i); ou
- uma sequência que tem pelo menos 65% de homologia com qualquer das sequências de (i), sequência essa que é capaz de criar tolerância num indivíduo a qualquer das sequências de (i), ou

(iii) uma variante de um polipéptido de acordo com (i), em que a referida variante é um polipéptido com 9 a 30 aminoácidos de

comprimento, que compreende uma região que consiste numa sequência que representa:

- um fragmento de qualquer das sequências de (i); ou
- um homólogo de um fragmento de qualquer das sequências de (i),

sequência essa que é capaz de criar tolerância num indivíduo a qualquer das sequências de (i) e que tem pelo menos 9 aminoácidos de comprimento, e em que o referido homólogo tem pelo menos 65% de homologia com quaisquer 9 aminoácidos contíguos em qualquer das sequências de (i).

A invenção também proporciona produtos e formulações que compreendem os polipéptidos da invenção e composições, produtos e vetores que compreendem polinucleótidos capazes de expressar os polipéptidos da invenção para utilização na prevenção ou tratamento de alergia a ácaros do pó doméstico por criação de tolerância. Esta criação de tolerância será tipicamente a um epítopo (por exemplo, a um epítopo do MHC de classe II) presente em qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104.

Fragmentos peptídicos de alergénios dos ácaros do pó do Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 7

Os principais alergénios dos ácaros do pó doméstico incluem o alergénio dos ácaros do pó do Grupo 1 (Der p 1, Der f 1), o alergénio dos ácaros do pó do Grupo 2 (Der p 2, Der f 2) e o alergénio dos ácaros do pó do Grupo 3 (Der p 7, Der f 7), em que Der p "X" e Der f "X" indicam que a proteína "X" é um homólogo que deriva de *D. pteronyssinus* e de *D. farinae*, respetivamente. Como é mostrado na Figura 1, cada uma das proteínas Der p é altamente homóloga à proteína Der f sua correspondente.

As regiões que compreendem epítopos de células T de ligação ao MHC de classe II estão particularmente bem conservadas entre os homólogos Der p e Der f de uma determinada proteína. Os péptidos derivados das regiões relevantes, por exemplo, da proteína 1 tanto de *D. pteronyssinus* como de *D. farinae* são portanto adequados para utilização na prevenção ou tratamento de alergia aos ácaros do pó doméstico, por criação de tolerância ao alergénio dos ácaros do pó do Grupo 1. Similarmente, os

péptidos derivados das regiões relevantes da proteína 2 de ambas as espécies são adequados para utilização na prevenção e tratamento de alergia aos ácaros do pó doméstico por criação de tolerância ao alergénio dos ácaros do pó do Grupo 2, e os péptidos derivados das regiões relevantes da proteína 7 de ambas as espécies são adequados para utilização na prevenção e tratamento de alergia aos ácaros do pó doméstico por criação de tolerância ao alergénio dos ácaros do pó do Grupo 7.

O alergénio do Grupo 1 é uma cisteína-protease homóloga à papaína. Verificou-se que esta enzima cliva a ocludina, um componente proteico das junções intercelulares fortes. Isto revela uma possível razão para as propriedades alergénicas ("alergenicidade") de certas enzimas. Ao destruir a integridade das junções fortes entre as células epiteliais, o Der p 1 e o Der f 1, podem ganhar um acesso anormal a células apresentadoras de antígeno subepiteliais, aos mastócitos residentes e aos eosinófilos.

A função do alergénio do Grupo 2 não é conhecida, embora o Der p 2 e o Der f 2 apresentem uma homologia distante com uma família de proteínas de ligação de lípidos. Mostrou-se que os níveis séricos de IgE em resposta a estimulação com Der p 2 *in vivo* representam aproximadamente um terço da resposta sérica total de IgE à estimulação com extratos de ácaros inteiros.

A função do alergénio do Grupo 7 também não é conhecida. Mostrou-se que os níveis séricos de IgE em resposta a estimulação com Der p 7 *in vivo* representam aproximadamente um quinto da resposta sérica total de IgE à estimulação com extratos de ácaros inteiros.

Os péptidos aqui descritos são derivados dos alergénios dos ácaros do pó do Grupo 1, do Grupo 2 e do Grupo 3, como mostrado nas Tabelas 3 a 8. Os termos "péptido" e "polipéptido" são utilizados aqui indistintamente. As proteínas acima são também aqui referidas como "os alergénios".

As Tabelas 3 a 8 apresentam as sequências dos péptidos, indicando a proteína progenitora da qual deriva cada péptido. As sequências nas Tabelas 4 a 6 estão dispostas em pares. Em cada par, a sequência superior foi selecionada como um epítipo de células T através da utilização de ensaios de ligação péptido-MHC. A sequência inferior foi selecionada através de

uma pesquisa de homologia no interior da sequência da proteína alternativa no correspondente Grupo de alergénios dos ácaros do pó. Por exemplo, o péptido HDM01 na Tabela 4 deriva de Der p 1, a sequência homóloga abaixo do péptido deriva de Der f 1.

Combinações de péptidos

A composição tipicamente compreende uma combinação de pelo menos quatro polipéptidos diferentes aqui descritos, até um máximo de treze polipéptidos diferentes. Deste modo, a composição da invenção pode consistir em quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze ou treze péptidos.

A composição da invenção pode tipicamente compreender pelo menos um polipéptido ou sua variante (por exemplo uma variante funcional) selecionado entre um péptido que deriva de cada um de Der p 1, Der p 2 e Der p 7 (ou os Der f equivalentes). As combinações de polipéptidos na composição da invenção são selecionadas para proporcionar uma cobertura o mais abrangente possível da população humana, i.e., a composição da invenção produzirá uma resposta imunitária numa elevada proporção de indivíduos alérgicos aos ácaros do pó, preferivelmente mais de 30%, 40%, 45%, 50%, 60% ou 70% dos indivíduos alérgicos aos ácaros do pó, num painel ou numa população desses indivíduos. O número de indivíduos numa população de indivíduos alérgicos aos ácaros do pó pode ser um qualquer número adequado tipicamente pelo menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou pelo menos 100 indivíduos. Preferivelmente, a população tem frequências de alelos do MHC dentro na gama de frequências que é representativa da população Caucasiana. Na Tabela 1 são mostradas frequências alélicas da população de referência para 11 famílias de alelos DR1B comuns (dados de *HLA Facts Book*, Parham and Barber).

As composições aqui descritas compreendem tipicamente pelo menos um polipéptido selecionado entre um polipéptido de HDM203B (SEQ ID NO: 83), HDM202 (SEQ ID NO: 81), HDM201 (SEQ ID NO: 80), HDM205 (SEQ ID NO: 85), HDM203A (SEQ ID NO: 82), ou uma sua variante. A composição compreende preferivelmente pelo menos dois, três ou quarto polipéptidos independentemente selecionados entre um polipéptido de HDM203B (SEQ ID NO: 83), HDM202 (SEQ ID NO: 81), HDM201 (SEQ ID NO: 80), HDM205 (SEQ ID NO: 85), HDM203A (SEQ ID NO: 82), ou uma sua variante, com a condição de não ser selecionado mais do que um polipéptido ou variante de SEQ ID NO: 82 e 83.

São variantes particulares de HDM202 (SEQ ID NO: 81), HDM202D (SEQ ID NO: 102; FKNRFLMSAEA), HDM202E (SEQ ID NO: 103; FKNRFLMSAE) e HDM202H (SEQ ID NO: 104; EFKNRFLMSAE), que são truncagens da sequência de HDM202. Está previsto que cada uma destas sequências possa ser modificada para adicionar pelo menos um (e até 6) resíduo(s) no terminal N e/ou C, selecionado(s) entre R, K, H, E e D.

Opcionalmente, a composição pode ainda compreender pelo menos um polipéptido adicional selecionado entre um péptido de qualquer de SEQ ID NO: 5, 51, 52, 100, 101, 72, 73, 74, ou uma sua variante. O pelo menos um polipéptido adicional é preferivelmente um polipéptido de qualquer de SEQ ID NO: 51, 73, 100 e 101.

Opcionalmente, a composição pode compreender adicionalmente pelo menos um polipéptido adicional selecionado entre um polipéptido de qualquer de SEQ ID NO: 1, 9, 21, 24, 48, 54, 56, 57, 62, 63, 65, 76, 84 e 86, ou uma sua variante. O pelo menos um polipéptido adicional é preferivelmente um polipéptido de qualquer de SEQ ID NO: 63 e 65, ou uma sua variante.

Também é aqui descrita uma composição que compreende entre quatro e treze polipéptidos, consistindo em:

- a) pelo menos um dos polipéptidos de SEQ ID NO: 83 e 82, ou suas variantes, preferivelmente SEQ ID NO: 83;
- b) pelo menos dois dos polipéptidos de SEQ ID NO: 80, 81 e 85, ou suas variantes; e opcionalmente
- c) pelo menos um dos polipéptidos de qualquer de SEQ ID NO: 5, 51, 52, 100, 101, 72, 73 e 74, ou uma sua variante, preferivelmente SEQ ID NO: 51, 73, 100 e 104 ou uma sua variante; e/ou
- d) pelo menos um dos polipéptidos de qualquer de SEQ ID NO: 1, 9, 21, 24, 48, 54, 56, 57, 62, 63, 65, 76, 84 e 86, ou uma sua variante, preferivelmente SEQ ID NO: 63 e 65, ou uma sua variante.

Também é aqui descrita uma composição para utilização na prevenção ou tratamento de alergia aos ácaros do pó, por criação de tolerância, que compreende entre quatro e treze sequências peptídicas, em que a composição consiste em:

a) pelo menos um dos polipéptidos com as seguintes sequências:

HDM203B DLRQMRTVTPIRMQGGSGS (SEQ ID NO: 83) e

HDM203A DLRQMRTVTPIRMQGGCGS (SEQ ID NO: 82);

ou uma sua variante, e;

b) pelo menos dois dos polipéptidos com as seguintes sequências:

HDM201 ESVKYVQSNNGAI (SEQ ID NO: 80);

HDM202 DEFKNRFLMSAEAFE (SEQ ID NO: 81); e

HDM205 SYRYVAREQS (SEQ ID NO: 85)

ou suas variantes, e, opcionalmente;

c) pelo menos um dos polipéptidos com as seguintes sequências:

HDM09A REALAQTHSAIAVI (SEQ ID NO: 5);

HDM03D RNQSLDLAEQELVDSASQH (SEQ ID NO: 51);

HDM03E RNQSLDLAEQELVD ASQH* (SEQ ID NO: 52);

HDM03V EQELVDSASQHG (SEQ ID NO: 100);

HDM03W ELVDSASQHG (SEQ ID NO: 101);

HDM101 NYCQIYPPNVNKIREA (SEQ ID NO: 72);

HDM101A NYSQIYPPNVNKIREA (SEQ ID NO: 73); e

HDM101B NY QIYPPNVNKIREA* (SEQ ID NO: 74)

ou uma sua variante, e/ou

d) pelo menos um dos polipéptidos com as seguintes sequências:

HDM01 IDLRQMRTVTPIR (SEQ ID NO: 1);

HDM21A KPFQLEAVFEANQNTK (SEQ ID NO: 9);

HDM48 TAIFQDTVRAEMTK (SEQ ID NO: 21);

HDM51A VDFKGELAMRNIEAR (SEQ ID NO: 24);

HDM01A IDLRQMRTVTPIRMQGGSG (SEQ ID NO: 48);

HDM06A RYVAREQSSRRP (SEQ ID NO: 54);

HDM07 PNVNKIREALAQT (SEQ ID NO: 56);

HDM19A DQVDVKDSANHEIKK (SEQ ID NO: 57);

HDM23C GLEVDPGIDPNASH (SEQ ID NO: 62);

HDM26B GVLSAIAATHAKIR (SEQ ID NO: 63);

HDM35A RGLKQMKRVGDANV (SEQ ID NO: 65);

HDM102A NAQRFGISNYSQI (SEQ ID NO: 76);

HDM204 SAYLAYRNQSLDLA (SEQ ID NO: 84); e

HDM206 DNGYGYFAANIDLMMIEE (SEQ ID NO: 86)

ou uma sua variante.

* = ácido aminobutírico.

Será notado que (a) a (d) acima indicados, representam critérios rigorosos e altamente seletivos para a identificação de combinações de péptidos adequadas. Por exemplo, se forem selecionados oito péptidos ao acaso entre as sequências da invenção, existiriam perto de 100 biliões de combinações possíveis para escolher. Em contraste, é útil considerar um exemplo de uma combinação de oito polipéptidos na qual os critérios acima são aplicados. Por exemplo, consideremos uma combinação em que são selecionados os seguintes polipéptidos:

i) quaisquer dois dos polipéptidos de SEQ ID NO: 80, 81 e 85 e pelo menos um dos polipéptidos de SEQ ID NO: 82 e 83; e

ii) dois outros polipéptidos selecionados dos polipéptidos de qualquer de SEQ ID NO: 5, 51, 52, 72, 73, 74, 100 e 101; e finalmente

iii) dois outros polipéptidos selecionados dos polipéptidos de qualquer de SEQ ID NO: 1, 9, 21, 24, 48, 54, 56, 57, 62, 63, 65, 76, 84 e 86.

Com base nesta seleção, o número de combinações possíveis representa menos de 0,0006% do total de combinações disponíveis se os critérios determinados pelos inventores não fossem aplicados.

Com base no acima referido, uma combinação particularmente preferida da invenção compreende ou consiste nos polipéptidos de HDM201 (SEQ ID NO: 80), HDM203B (SEQ ID NO: 83), HDM205 (SEQ ID NO: 85), HDM03W (SEQ ID NO: 101), HDM101A (SEQ ID NO: 73), HDM26B (SEQ ID NO: 63), HDM35A (SEQ ID NO: 65) e, opcionalmente, SEQ ID NO: 24, ou suas variantes.

Outra combinação preferida da invenção compreende ou consiste nos polipéptidos de HDM201 (SEQ ID NO: 80), HDM203B (SEQ ID NO: 83), HDM205 (SEQ ID NO: 85) e HDM03W (SEQ ID NO: 101).

Sujeito ao acima referido, a composição pode, opcionalmente, compreender outros polipéptidos até um total de treze polipéptidos únicos. Estes outros polipéptidos estão relacionados (ou seja, são tipicamente homólogos e/ou fragmentos de) com as outras sequências, i.e. SEQ ID NO: 1 a 104, que não estão entre os polipéptidos já selecionados. Os

péptidos adicionais são tipicamente variantes funcionais de um dos péptidos das SEQ ID NO: 1 a 104. Os polipéptidos adicionais podem ser idênticos a qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 104. A composição pode portanto compreender até treze polipéptidos diferentes, tal como proporcionado em qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104. Contudo, os polipéptidos adicionais opcionais não precisam de ser 100% idênticos a nenhuma de SEQ ID NO: 1 a 104. São preferivelmente pelo menos 65% idênticos a pelo menos 9 (por exemplo, pelo menos 10, 11, 12 ou 13) ou mais aminoácidos contíguos em qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104, que ainda não tenha sido selecionada entre o(s) polipéptido(s) previamente selecionados. Esses aminoácidos contíguos podem compreender um epítipo do MHC de classe II, por exemplo que se liga a qualquer uma das moléculas do MHC aqui mencionadas. Por outras palavras, a composição pode opcionalmente compreender polipéptidos adicionais, até um total de treze polipéptidos únicos, em que os polipéptidos adicionais:

(i) compreendem uma sequência que tem pelo menos 65% de identidade de sequência com pelo menos 9 ou mais aminoácidos contíguos em qualquer uma das SEQ ID NO: 1 a 104 não selecionadas em (a) a (d) acima; e

(ii) têm 9 a 30 aminoácidos de comprimento;

em que cada um diferente polipéptido se destina a utilização simultânea, separada ou sequencial, na prevenção ou tratamento de alergia aos ácaros do pó, por criação de tolerância.

É adicionalmente aqui descrito um produto que contém entre quatro e treze polipéptidos, como acima definido em (a) a (d); e opcionalmente:

(e) um polipéptido:

(i) que compreende uma sequência que tem pelo menos 65% de identidade com pelo menos 9 ou mais aminoácidos contíguos em qualquer uma de SEQ ID NO: 1 a 104 não selecionada acima em a), a d); e

(ii) 9 a 30 aminoácidos de comprimento; e opcionalmente

(f) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente, não selecionado em d); e opcionalmente

(g) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente, não selecionado em e) a f) acima; e opcionalmente

(h) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente, não selecionado em e) a g) acima; e opcionalmente

(i) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente, não selecionado em e) a h) acima; e opcionalmente

(j) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente, não selecionado em e) a i) acima; e opcionalmente

(k) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente, não selecionado em e) a j) acima; e opcionalmente

(l) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente, não selecionado em e) a k) acima; e opcionalmente

(m) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente, não selecionado em e) a l) acima; e opcionalmente

(n) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente não selecionado em e) a m) acima; e opcionalmente

(o) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente não selecionado em e) a n) acima; e opcionalmente

(p) um polipéptido como definido em e), mas adicionalmente não selecionado em e) a o) acima, para utilização simultânea, separada ou sequencial na prevenção ou tratamento de alergia ao pó dos ácaros por criação de tolerância.

É aqui também descrita uma composição para utilização na prevenção ou tratamento de alergia aos ácaros do pó doméstico por criação de tolerância, compreendendo um ou mais polipéptidos, em que o polipéptido é selecionado entre qualquer um dos seguintes:

(i) um polipéptido de qualquer um de HDM203B (SEQ ID NO: 83), HDM202 (SEQ ID NO: 81), HDM201 (SEQ ID NO:80), HDM205 (SEQ ID NO:85), HDM203A (SEQ ID NO: 82), SEQ ID NO: 1 a 79, 84, ou 86 a 104 (ou seja, qualquer um de SEQ ID NO: 1 a 104); ou

(ii) uma variante de um polipéptido de acordo com (i), em que a referida variante é um polipéptido com 9 a 30 aminoácidos de comprimento, que compreende uma região que consiste em:

- qualquer das sequências de (i); ou
- uma sequência que tem pelo menos 65% de homologia com qualquer das sequências de (i), sequência essa que é capaz de criar tolerância num indivíduo a qualquer das sequências de (i), ou

(iii) uma variante de um polipéptido de acordo com (i), em que a referida variante é um polipéptido com 9 a 30 aminoácidos de comprimento, que compreende uma região que consiste numa sequência que representa:

- um fragmento de qualquer das sequências de (i); ou
- um homólogo de um fragmento de qualquer das sequências de (i), sequência essa que é capaz de criar tolerância num indivíduo a qualquer das sequências de (i) e que tem pelo menos 9 aminoácidos de comprimento, e em que o referido homólogo tem pelo menos 65% de homologia com quaisquer 9 aminoácidos contíguos em qualquer das sequências de (i).

As composições ou produtos da invenção podem compreender variantes de qualquer das sequências acima definidas. A variante tipicamente compreende 1, 2, 3 ou mais dos epítomos do MHC de classe II presentes no péptido correspondente de SEQ ID NO: 1 a 104.

São aqui mencionadas variantes funcionais. Estas variantes podem ser capazes de criar tolerância num indivíduo a um epítomo do MHC de classe II presente no péptido correspondente de SEQ ID NO: 1 a 104, e, portanto compreenderão tipicamente uma sequência que se liga à mesma molécula do MHC de classe II e/ou é reconhecida por uma célula T que reconhece o epítomo correspondente no polipéptido de SEQ ID NO: de 1 a 104.

As variantes de SEQ ID NO: 1 a 104 podem ser fragmentos derivados por truncagem. Truncagem refere-se à remoção de um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais aminoácidos das extremidades N- e/ou C-terminais de um polipéptido de SEQ ID NO: de 1 a 104. Exemplos de truncagens adequadas são proporcionados para fins ilustrativos no Exemplo 5. Em particular, as truncagens de SEQ ID NO: 81 são proporcionadas como SEQ ID NO: de 102 a 104. Similarmente, várias das variantes preferidas de HDM03 (SEQ ID NO: de 89 a

101) são truncagens. As truncagens particularmente preferidas de HDM03 são HDM03V e HDM03W (SEQ ID NO: 100 e 101).

Os fragmentos também podem ser gerados por uma ou mais deleções internas, desde que os 9 aminoácidos nucleares que constituem o epítipo de células T não sejam substancialmente corrompidos.

Por exemplo, uma variante de SEQ ID NO: 1 pode compreender um fragmento de SEQ ID NO: 1, *i.e.* uma sequência mais curta. Isto pode incluir uma deleção de um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais aminoácidos da extremidade N-terminal de SEQ ID NO: 1 ou da extremidade C-terminal de SEQ ID NO: 1. Estas deleções podem ser efetuadas em ambas as extremidades de SEQ ID NO: 1. Uma variante de SEQ ID NO: 1 pode incluir aminoácidos adicionais (por exemplo da sequência da proteína progenitora da qual deriva o péptido) que se prolongam para além da(s) extremidade(s) de SEQ ID NO: 1. Uma variante pode incluir uma combinação das deleções e adições acima discutidas. Por exemplo, podem ser eliminados aminoácidos numa extremidade de SEQ ID NO: 1, mas aminoácidos adicionais da sequência completa da proteína progenitora, podem ser adicionados na outra extremidade de SEQ ID NO: 1. A mesma discussão de variantes acima, também se aplica a SEQ ID NO: 2 a 104.

Um péptido variante pode incluir uma ou mais substituições de aminoácidos na sequência de aminoácidos de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104 ou um seu fragmento. Um péptido variante pode compreender uma sequência que tem pelo menos 65% de identidade de sequência com pelo menos 9 ou mais aminoácidos contíguos em qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104. Mais preferivelmente, uma variante adequada pode compreender, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% de identidade de aminoácidos com pelo menos 9 aminoácidos contíguos de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104. Este nível de identidade de aminoácidos pode ser observado em qualquer secção do péptido, embora seja preferível na região nuclear. O nível de identidade de aminoácidos é sobre pelo menos 9 aminoácidos contíguos, mas pode ser sobre pelo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou pelo menos 16 ou 17 aminoácidos, dependendo do tamanho dos péptidos de comparação. Deste modo, qualquer dos

níveis de identidade acima especificados pode estar sobre todo o comprimento da sequência.

Em relação às sequências de aminoácidos, "identidade de sequência" refere-se a sequências que têm o valor estabelecido quando avaliadas usando ClustalW (Thompson *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov 11; 22 (22): 4673-80) com os seguintes parâmetros: Parâmetros de emparelhamento -Método: exato, Matriz: PAM, Penalidade por abertura de hiatos: 10,00, Penalidade por extensão de hiatos: 0,10; Parâmetros de alinhamento múltiplo - Matriz: PAM, Penalidade por abertura de hiatos: 10,00, % de identidade para atraso: 30, Penalização de hiatos finais: ativa, Distância de separação de hiatos: 0, Matriz negativa: não, Penalidade por extensão de hiatos: 0,20, Penalidades por hiatos específicos de resíduos: ativas, Penalidades por hiato hidrófilo: ativas, Resíduos hidrófilos: GPSNDQEKR. Na identidade de sequências num resíduo particular pretende-se a incluir resíduos idênticos que foram simplesmente derivatizados.

Um péptido variante pode compreender 1, 2, 3, 4, 5 ou mais, ou até 10, substituições de aminoácidos de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104. As variantes de substituição envolvem preferivelmente a substituição de um ou mais aminoácidos pelo mesmo número de aminoácidos e a realização de substituições conservativas de aminoácidos. Por exemplo, um aminoácido pode ser substituído por um aminoácido alternativo com propriedades semelhantes, por exemplo, outro aminoácido básico, outro aminoácido ácido, outro aminoácido neutro, outro aminoácido carregado, outro aminoácido hidrófilo, outro aminoácido hidrófobo, outro aminoácido polar, outro aminoácido aromático ou outro aminoácido alifático. Algumas propriedades dos 20 aminoácidos principais que podem ser utilizados para selecionar substitutos adequados são as seguintes:

Ala	alifático, hidrófobo, neutro	Met	hidrófobo, neutro
Cys	polar, hidrófobo, neutro	Asn	polar, hidrófilo, neutro
Asp	polar, hidrófilo, carregado (-)	Pro	hidrófobo, neutro
Glu	polar, hidrófilo, carregado (-)	Gln	polar, hidrófilo, neutro

Phe	aromático, hidrófobo, neutro	Arg	polar, hidrófilo, carregado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrófilo, neutro
His	aromático, polar, hidrófilo, carregado (+)	Thr	polar, hidrófilo, neutro
Ile	alifático, hidrófobo, neutro	Val	alifático, hidrófobo, neutro
Lys	polar, hidrófilo, carregado (+)	Trp	aromático, hidrófobo, neutro
Leu	alifático, hidrófobo, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrófobo

Outras variantes incluem aquelas nas quais em vez do aminoácido de ocorrência natural, o aminoácido que aparece na sequência é um seu análogo estrutural. Os aminoácidos utilizados nas sequências também podem ser modificados, e.g. marcados, desde que a função do péptido não seja significativamente afetada de forma adversa. Quando o péptido tem uma sequência diferente da sequência de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104 ou um seu fragmento, as substituições podem ocorrer ao longo de todo o comprimento da sequência, no interior da sequência de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104 ou fora da sequência de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 140. Por exemplo, as variações aqui descritas, tais como adições, deleções, substituições e modificações, podem ocorrer no interior da sequência de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 140. Um péptido variante pode compreender, ou consistir essencialmente em, a sequência de aminoácidos de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104 em que foram efetuadas uma, duas, três, quatro ou mais substituições de aminoácidos. Um péptido variante pode compreender um fragmento da proteína progenitora que seja maior do que qualquer de SEQ ID NO: 1 a 140. Nesta concretização, as variações aqui descritas, tais como substituições e modificações, podem ocorrer dentro e/ou fora da sequência de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104.

Os péptidos variantes da invenção têm 9 a 30 aminoácidos de comprimento, inclusive. Preferivelmente, podem ter de 9 a 20 aminoácidos ou, mais preferivelmente, de 13 a 17 de comprimento. Os péptidos podem ter o mesmo comprimento que as sequências peptídicas em qualquer de SEQ ID NO: 1 a 20.

Os péptidos podem ser quimicamente derivados do alergénio polipeptídico, por exemplo por clivagem proteolítica ou podem ser derivados num sentido intelectual do alergénio polipéptido, por exemplo fazendo uso da sequência de aminoácidos do alergénio polipéptido e sintetizando péptidos com base na sequência. Os péptidos podem ser sintetizados utilizando métodos bem conhecidos no estado da técnica.

Quando os polipéptidos compreendem resíduos que são tipicamente difíceis de conservar durante o fabrico, esses resíduos podem ser substituídos. Por exemplo, o glutamato forma espontaneamente piroglutamato em solução, particularmente quando presente no terminal N de um polipéptido. Assim, os resíduos dos péptidos da invenção que correspondem a glutamato na sequência de uma sequência de uma proteína de alergénio nativa, podem ser substituídos por piroglutamato nos péptidos da invenção quando esses resíduos estão presentes no terminal N de um péptido.

O termo "péptido" inclui não apenas moléculas nas quais os resíduos de aminoácidos estão unidos por ligações peptídicas (-CO-NH-) mas também moléculas nas quais a ligação peptídica está invertida. Estes peptidomiméticos retro-invertidos podem ser produzidos utilizando métodos conhecidos no estado da técnica, por exemplo tais como os descritos por Meziere et al. (1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237. Esta abordagem envolve a produção de pseudopéptidos contendo alterações que envolvem o esqueleto e não a orientação das cadeias laterais. Meziere et al. (1997) mostram que, pelo menos para respostas de células T auxiliares e do MHC de classe II, estes pseudopéptidos são úteis. Péptidos retro-invertidos, que contêm ligações NH-CO em vez de ligações peptídicas CO-NH, são muito mais resistentes à proteólise.

Similarmente, a ligação peptídica pode ser totalmente dispensada desde que seja utilizada uma porção ligante adequada que retenha o espaçamento entre os átomos de carbono dos resíduos de aminoácido; é particularmente preferido que a porção ligante tenha substancialmente a mesma distribuição de cargas e substancialmente a mesma planaridade que uma ligação peptídica. Será também notado que o péptido pode ser convenientemente bloqueado no seu terminal N ou terminal C de modo a ajudar a reduzir a suscetibilidade à digestão exoproteolítica. Por exemplo, o grupo amino N-terminal dos

péptidos pode ser protegido através da reação com um ácido carboxílico e o grupo carboxilo C-terminal do péptido pode ser protegido através de reação com uma amina. Outros exemplos de modificações incluem glicosilação e fosforilação. Outra modificação potencial é os hidrogénios nas aminas de cadeias laterais de R ou K poderem ser substituídos por grupos metileno ($-\text{NH}_2$ $-\text{NH}(\text{Me})$ ou $-\text{N}(\text{Me})$).

Os análogos de péptidos de acordo com a invenção podem também incluir variantes peptídicas que aumentam ou diminuem a semivida dos péptidos *in vivo*. Os exemplos de análogos capazes de aumentar a semivida de péptidos utilizados de acordo com a invenção incluem análogos peptoides dos péptidos, derivados de D-aminoácidos dos péptidos e híbridos péptido-peptoides. Outra concretização dos polipéptidos variantes utilizados de acordo com a invenção compreende formas de D-aminoácidos do polipéptido. A preparação de polipéptidos usando D-aminoácidos em vez de L-aminoácidos reduz grandemente qualquer degradação indesejada destes agentes por processos metabólicos normais, reduzindo as quantidades de agente que é necessário administrar, assim como a frequência da sua administração.

Os péptidos proporcionados pela presente invenção podem ser derivados de variantes de *splicing* das proteínas progenitoras codificadas por ARNm gerados por *splicing* alternativo de transcritos primários que codificam as cadeias das proteínas progenitoras. Os péptidos podem também ser derivados de mutantes de aminoácidos, variantes de glicosilação e outros derivados covalentes das proteínas progenitoras que retêm pelo menos uma propriedade de ligação ao MHC dos alérgenos. Os derivados exemplificativos incluem moléculas em que os péptidos da invenção são modificados covalentemente por substituição, química, enzimática ou por outro meio adequado, por uma porção que não um aminoácido de ocorrência natural. Também estão incluídas variantes de ocorrência natural das proteínas progenitoras em diferentes ácaros. Estas variantes podem ser codificadas por uma variante alélica ou representar uma variante de *splicing* alternativo.

As variantes acima descritas podem ser preparadas durante a síntese do péptido ou por modificação pós-produção, ou quando o péptido está sob uma forma recombinante usando técnicas conhecidas de mutagénesse dirigida ao local, mutagénesse

aleatória ou clivagem enzimática e/ou ligação de ácidos nucleicos.

De acordo com a invenção, os péptidos adicionais que a composição pode compreender são preferivelmente variantes funcionais de qualquer de SEQ ID NO: 1 a 104. Ou seja, os péptidos são preferivelmente capazes de induzir uma resposta imunitária. Em particular, os péptidos são preferivelmente capazes de induzir a produção de citóquinas em indivíduos alérgicos aos ácaros do pó doméstico. Tipicamente, a composição da invenção compreenderá portanto pelo menos um polipéptido ou uma sua variante que produza uma resposta de citóquinas em mais de 30%, 35%, 40%, preferivelmente 45% ou 50% dos indivíduos numa população de indivíduos alérgicos aos ácaros do pó doméstico. O número de indivíduos num painel de indivíduos alérgicos aos ácaros do pó doméstico pode ser qualquer número superior a um, por exemplo pelo menos 20, 30, 40, 50, 80 ou pelo menos 100 indivíduos. Preferivelmente a composição compreende pelo menos dois, três ou, mais preferivelmente, quatro destes péptidos. Preferivelmente, a resposta de citóquinas é a produção de IL-13 ou IFN-gama. A produção de citóquinas pode ser medida por qualquer método adequado. Considera-se tipicamente que ocorreu a produção de uma citóquina em resposta a um péptido se o nível de citóquinas produzidas na presença do péptido está pelo menos 2, 3, 4 ou 5 vezes acima do nível de base da referida citóquina que é produzido na ausência de um estímulo (*i.e.*, o nível produzido pelo mesmo indivíduo na ausência do péptido ou de qualquer outro estímulo). Alternativamente, pode considerar-se que ocorreu produção de uma citóquina se a quantidade de citóquina produzida exceder um limite reconhecido, tipicamente 90, 95 ou, preferivelmente, 100 pg/ml, tipicamente a partir de uma amostra de aproximadamente $1,25 \times 10^6$ células em 250 µl.

Os métodos adequados para medição da produção de citóquinas incluem tipicamente a medição da libertação de citóquinas por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de uma amostra colhida de um indivíduo. A amostra é tipicamente sangue ou soro. A libertação de citóquinas pelas PBMC é medida após incubação das células na presença de um determinado péptido. Os sobrenadantes da mistura de incubação são então testados quanto à presença de uma citóquina, usando qualquer ensaio adequado, por exemplo um ensaio ELISA, ELISPOT ou citometria de fluxo. Os

métodos particularmente preferidos incluem ensaios de arranjos de contas Multiplex conforme descrito, por exemplo, em Jager *et al.*, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2003, Vol. 10(1) pág. 133-139. Tipicamente, a composição pode compreender pelo menos um péptido adicional ou uma sua variante que não esteja entre os polipéptidos já selecionados, até um total de treze péptidos diferentes, que produzem uma resposta de citóquinas em mais de 20%, 25%, preferivelmente 30%, 35% ou 40% dos indivíduos numa população de indivíduos alérgicos aos ácaros do pó doméstico.

A composição pode ainda compreender um ou mais péptidos adicionais ou suas variantes que não estejam entre os polipéptidos já selecionados, até um total de treze péptidos diferentes, que produzem uma resposta de citóquinas em mais 10%, 15%, preferivelmente 20% dos indivíduos numa população de indivíduos alérgicos aos ácaros do pó doméstico.

As variantes adequadas capazes de se ligar a TCR podem ser derivadas empiricamente ou selecionadas de acordo com critérios conhecidos. Num único péptido há determinados resíduos que contribuem para a ligação dentro da fenda de ligação ao antigénio do MHC e outros resíduos que interagem com regiões hipervariáveis do recetor de células T (Allen *et al* (1987) *Nature* 327: 713-5).

De entre os resíduos que contribuem para a interação com o recetor de células T, foi demonstrada a existência de uma hierarquia que se refere à dependência de ativação das células T mediante substituição de um determinado resíduo peptídico. Utilizando péptidos que tiveram uma ou mais substituições de resíduos de contacto com o recetor de células T por um aminoácido diferente, vários grupos demonstraram efeitos profundos no processo de ativação de células T. Evavold & Allen (1991) *Nature* 252: 1308-10) demonstraram a dissociação da proliferação de células T e da produção de citóquinas. Neste modelo *in vitro*, um clone de células T específico para os resíduos 64-76 da hemoglobina (no contexto de I-E^k), foi provocado com um análogo peptídico no qual tinha sido efetuada uma substituição conservativa de ácido glutâmico por ácido aspártico. Esta substituição não interferiu significativamente com a capacidade do análogo se ligar a I-E^k.

Após a provocação *in vitro* de um clone de células T com este análogo não foi detetada qualquer proliferação embora a secreção de IL-4 se tenha mantido, assim como a capacidade do clone de ajudar as respostas de células B. Num estudo subsequente, o mesmo grupo demonstrou a separação da citólise mediada por células T da produção de citóquinas. Neste caso, a primeira permaneceu inalterada, enquanto a última foi comprometida. A eficácia de ligandos peptídicos alterados *in vivo* foi inicialmente demonstrada num modelo murino de EAE (encefalomielite alérgica experimental) por McDevitt e colaboradores (Smilek *et al* (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9633-9637). Neste modelo a EAE é induzida por imunização com o péptido encefalitogénico Acl-11 de MBP (proteína básica de mielina). A substituição na posição quatro (lisina) por um resíduo de alanina gerou um péptido que se ligou bem ao seu elemento de restrição (A^uA^u), mas que não era imunogénico na estirpe suscetível PL/JxSJLFl e que, além disso, evitou o início da EAE quando administrado quer antes quer após a imunização com o péptido encefalitogénico. Assim, podem ser identificados resíduos nos péptidos que afetam a capacidade dos péptidos para induzir várias funções de células T.

Vantajosamente, os péptidos podem ser concebidos de modo a favorecer a proliferação de células T e a indução de dessensibilização. Metzler e Wraith demonstraram a melhoria da capacidade tolerogénica de péptidos nos quais foram efetuadas substituições que aumentam a afinidade péptido-MHC (Metzler & Wraith (1993) *Int Immunol* ~ : 1159-65). Foi demonstrado por Sloan-Lancaster *et al.* (1993) *Nature* 363: 156-9, que um ligando peptídico alterado pode provocar anergia profunda e de longa duração em células T clonadas.

As composições da invenção são capazes de induzir uma resposta de fase tardia num indivíduo que está sensibilizado aos alérgenos. O termo "resposta de fase tardia" inclui o significado estabelecido em *Allergy and Allergic Diseases* (1997) A.B. Kay (Ed.), Blackwell Science, pp 1113-1130. A resposta de fase tardia pode ser qualquer resposta de fase tardia (LPR). Preferivelmente, os péptidos são capazes de induzir uma resposta asmática tardia (LAR) ou uma resposta rinitica tardia ou uma resposta cutânea de fase tardia ou uma resposta ocular de fase tardia. Pode-se determinar se um péptido particular pode ou não originar uma LPR, utilizando métodos bem

conhecidos no estado da técnica; um método particularmente preferido é o descrito por Cromwell O, Durham SR, Shaw RJ, Mackay J e Kay AB. Provocation tests and measurements of mediators from mast cells and basophils in asthma and allergic rhinitis. Em: Handbook of Experimental Immunology (4) Chapter 127, Editor: Weir DM, Blackwell Scientific Publications, 1986.

Assim, preferivelmente, os péptidos individuais da invenção são capazes de induzir uma LPR num indivíduo que tenha sido sensibilizado aos alérgenos. Pode-se determinar se um indivíduo foi ou não sensibilizado aos alérgenos, através de procedimentos bem conhecidos como o teste de escarificação com soluções de extratos de alérgeno, indução de LPR cutâneas, história clínica, provocação com alérgenos e prova cutânea RAST (teste radioalergoabsorvente) para medição de IgE específica do alérgeno. O médico poderá determinar se é ou não expectável que um indivíduo específico beneficie do tratamento, com base, por exemplo, nesses testes.

A dessensibilização ou criação de tolerância num indivíduo aos alérgenos significa a inibição ou redução de reações alérgicas dos tecidos induzidas pelos alérgenos em indivíduos apropriadamente sensibilizados. Demonstrou-se que as células T podem ser ativadas seletivamente e depois tornadas não responsivas. Além disso, a anergização ou eliminação destas células T conduz à dessensibilização do paciente relativamente a um alérgeno particular. A dessensibilização manifesta-se como uma redução da resposta a um alérgeno ou a um péptido derivado do alérgeno, ou preferivelmente por uma eliminação dessa resposta, na segunda e posteriores administrações do alérgeno ou do péptido derivado do alérgeno. A segunda administração pode ser efetuada depois de passado um período de tempo adequado para permitir a ocorrência da dessensibilização; ou seja, preferivelmente qualquer período entre um dia e várias semanas. É preferido um intervalo de cerca de duas semanas.

Embora as composições da invenção sejam capazes de induzir uma LPR num indivíduo alérgico a ácaros do pó, deverá ser notado que quando uma composição é utilizada para tratar um paciente é preferível que seja utilizada uma concentração suficientemente baixa da composição para que não ocorra qualquer LPR observável mas que a resposta seja suficiente para dessensibilizar parcialmente as células T de forma a que a dose

seguinte (preferivelmente superior) possa ser dada, e assim por diante. Desta maneira, a dose é acumulada para conferir uma dessensibilização completa, mas frequentemente sem nunca induzir uma LPR no paciente. Contudo, a composição ou o péptido é capaz de o fazer numa concentração mais elevada do que aquela em que é administrado.

As composições da invenção preferivelmente são capazes de induzir uma resposta de fase tardia em 50% ou mais de um painel de indivíduos alérgicos a ácaros do pó da população. Mais preferivelmente, as composições são capazes de induzir uma LPR em 55% ou mais, 60% ou mais, 65% ou mais, 70% ou mais, 75% ou mais, 80% ou mais, 85% ou mais, ou 90% ou mais de indivíduos sensibilizados num painel. Pode-se determinar se as composições são, ou não, capazes de induzir uma LPR numa determinada percentagem de um painel de indivíduos, através de métodos que são bem conhecidos no estado da técnica.

Será entendido que os péptidos da invenção compreendem um epítipo de células T que consiste em 9 aminoácidos nucleares, que são a sequência mínima essencial necessária para a ligação ao MHC de classe II. Contudo, os péptidos podem também compreender resíduos adicionais que flanqueiam os 9 aminoácidos nucleares. Os péptidos podem portanto compreender uma região que contém um epítipo de células T, no qual alguns resíduos podem ser modificados sem afetar a função do epítipo. Deste modo, variantes funcionais dos péptidos, como definido acima, incluem péptidos que são alterados para melhorar a sua solubilidade relativamente à sequência nativa dos péptidos. Uma solubilidade melhorada é vantajosa para a criação de tolerância nos indivíduos a alergénios dos quais os péptidos da invenção derivam, já que a administração de agentes fracamente solúveis aos indivíduos causa respostas inflamatórias indesejáveis e que não criam tolerância. A solubilidade dos péptidos pode ser melhorada alterando os resíduos que flanqueiam a região que contém um epítipo de células T. Um péptido da invenção pode ser manipulado para ser mais solúvel, de forma a compreender:

i) em posição N-terminal relativamente aos resíduos do péptido que flanqueiam um epítipo de células T: um a seis aminoácidos contíguos que correspondem aos dois a seis aminoácidos contíguos em posição imediatamente N-terminal em relação aos referidos

resíduos na sequência da proteína da qual o péptido deriva; e/ou

ii) em posição C-terminal relativamente aos resíduos do péptido que flanqueiam um epítipo do células T: um a seis aminoácidos contíguos que correspondem aos um a seis aminoácidos contíguos em posição imediatamente C-terminal em relação aos referidos resíduos na sequência da proteína da qual o péptido deriva; ou

iii) tanto em posição N-terminal como em C-terminal relativamente aos resíduos do péptido que flanqueiam um epítipo de células T, pelo menos um aminoácido selecionado entre arginina, lisina, histidina, glutamato e aspartato.

Opcionalmente, os péptidos podem adicionalmente ser manipulados para serem mais solúveis, de forma que:

i) quaisquer resíduos de cisteína na sequência nativa do péptido são substituídos por serina ou ácido 2-aminobutírico; e/ou

ii) quaisquer resíduos no terminal N ou no terminal C da sequência nativa do péptido, que não estão compreendidos num epítipo de células T, são eliminados; e/ou

iii) quaisquer dois aminoácidos consecutivos compreendendo a sequência Asp-Gly nos até quatro aminoácidos no terminal N ou no terminal C da sequência nativa do péptido, que não estão compreendidos num epítipo de células T, são eliminados.

Ácidos nucleicos e vetores

Os péptidos individuais que constituem as composições e produtos da invenção podem ser administrados diretamente ou podem ser administrados indiretamente por expressão de uma sequência de codificação. Por exemplo, pode ser proporcionado um polinucleótido que codifica um péptido da invenção, como qualquer um dos péptidos acima descritos. Um péptido da invenção pode assim ser produzido a partir de, ou entregue sob a forma de, um polinucleótido que o codifica e é capaz de o expressar. Em qualquer referência aqui a utilização, entrega ou administração de um péptido da invenção pretende-se incluir a utilização, entrega ou administração indiretas desse péptido através de expressão a partir de um polinucleótido que o codifica.

As expressões "molécula de ácido nucleico" e "polinucleótido" são aqui utilizadas indistintamente e referem-se a uma forma polimérica dos nucleótidos de qualquer comprimento, sejam desoxirribonucleótidos, sejam ribonucleótidos, ou seus análogos. Os exemplos não limitantes de polinucleótidos incluem um gene, um fragmento de gene, ARN mensageiro (ARNm), ADNc, polinucleótidos recombinantes, plasmídeos, vetores, ADN isolado de qualquer sequência, ARN isolado de qualquer sequência, sondas de ácido nucleico e iniciadores (*primers*). Um polinucleótido da invenção pode ser proporcionado sob a forma purificada ou isolado.

Uma sequência de ácido nucleico que "codifica" um polipéptido selecionado é uma molécula de ácido nucleico que é transcrita (no caso do ADN) e traduzida (no caso do ARNm) num polipéptido *in vivo* quando colocada sob o controlo de sequências reguladoras apropriadas. Os limites da sequência de codificação são determinados por um códon iniciação na extremidade 5' (amino) e um códon de terminação da tradução na extremidade 3' (carboxilo). Para os fins da invenção, estas sequências de ácido nucleico podem incluir, mas não se lhes limitam, ADNc viral, ARNm procariota ou eucariota, sequências genómicas de ADN ou ARN viral ou procariota, e mesmo sequências de ADN sintéticas. Uma sequência de terminação da transcrição pode estar localizada a 3' da sequência de codificação.

Os polinucleótidos da invenção podem ser sintetizados de acordo com métodos bem conhecidos no estado da técnica, conforme descrito a título de exemplo em Sambrook et al. (19104, *Molecular Cloning - a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Press).

As moléculas de polinucleótidos podem ser proporcionadas sob a forma de uma cassette de expressão que inclui sequências de controlo ligadas operativamente à sequência inserida, permitindo assim a expressão do péptido da invenção *in vivo* num indivíduo alvo. Estas cassetes de expressão, por sua vez, são tipicamente proporcionadas em vetores (e.g., plasmídeos ou vetores virais recombinantes) que são adequados para utilização como reagentes para imunização com ácido nucleico. Estas cassetes de expressão podem ser administradas diretamente a um indivíduo hospedeiro. Alternativamente, pode ser administrado a um indivíduo hospedeiro um vetor compreendendo um

polinucleótido da invenção. Preferivelmente, o polinucleótido é preparado e/ou administrado usando um vetor genético. Um vetor adequado pode ser qualquer vetor capaz de transportar uma quantidade suficiente de informação genética e que permite a expressão de um péptido da invenção.

São também aqui descritos vetores de expressão que compreendem essas sequências polinucleotídicas. Assim, é descrito um vetor para utilização na prevenção ou tratamento de alergia a ácaros do pó por criação de tolerância que compreende quatro ou mais sequências polinucleotídicas que codificam diferentes polipéptidos da invenção e opcionalmente uma ou mais sequências polinucleotídicas adicionais que codificam diferentes polipéptidos, conforme aqui definido. O vetor pode compreender 4, 5, 6 ou 7 sequências polinucleotídicas que codificam diferentes polipéptidos da invenção.

Além disso, será notado que as composições e produtos da invenção podem compreender uma mistura de polipéptidos e polinucleótidos. Deste modo, é descrita uma composição ou um produto conforme aqui definidos, em que no lugar de um qualquer dos polipéptidos está um polinucleótido capaz de expressar o referido polipéptido.

Os vetores de expressão são construídos por rotina na biologia molecular e podem, por exemplo, envolver a utilização de ADN plasmídico e iniciadores, promotores, potenciadores e outros elementos apropriados, tais como por exemplo sinais de poliadenilação que podem ser necessários, e que estão posicionados na orientação correta, de modo a permitir a expressão de um péptido da invenção. Outros vetores adequados serão evidentes para os peritos na especialidade. A título de exemplo adicional a este respeito referimos Sambrook *et al.*

Assim, um polipéptido da invenção pode ser proporcionado através da entrega de um tal vetor a uma célula e permitindo a ocorrência da transcrição a partir do vetor. Preferivelmente, um polinucleótido aqui descrito ou para utilização como aqui descrito num vetor, está operativamente ligado a uma sequência de controlo capaz de proporcionar a expressão da sequência de codificação pela célula hospedeira, *i.e.*, o vetor é um vetor de expressão.

"Operativamente ligado" refere-se a uma disposição dos elementos em que os componentes assim descritos são configurados de modo a realizar a sua função usual. Assim, uma determinada sequência reguladora, como um promotor, operativamente ligada a uma sequência de ácido nucleico é capaz de efetuar a expressão dessa sequência quando estão presentes as enzimas corretas. O promotor não precisa de estar contíguo à sequência, desde que funcione para dirigir a sua expressão. Assim, por exemplo, podem estar presentes sequências intervenientes não traduzidas mas transcritas, entre a sequência promotora e a sequência de ácido nucleico, e a sequência promotora pode ainda assim ser considerada "operativamente ligada" à sequência de codificação.

Vários sistemas de expressão foram descritos no estado da técnica, cada um tipicamente consistindo num vetor contendo um gene ou sequência de nucleótidos de interesse operativamente ligados a sequências de controlo da expressão. Estas sequências de controlo incluem sequências promotoras da transcrição e sequências de iniciação e terminação da transcrição. Os vetores da invenção podem ser, por exemplo, plasmídeos, vírus ou vetores fágicos com uma origem de replicação, opcionalmente um promotor para a expressão do referido polinucleótido e opcionalmente um regulador do promotor. Um "plasmídeo" é um vetor sob a forma de um elemento genético extracromossómico. Os vetores podem conter um ou mais genes marcadores selecionáveis, por exemplo um gene de resistência à ampicilina no caso de um plasmídeo bacteriano ou um gene de resistência para um vetor fúngico. Os vetores podem ser utilizados *in vitro*, por exemplo para a produção de ADN ou ARN ou utilizados para transfectar ou transformar uma célula hospedeira, por exemplo, uma célula hospedeira de mamífero. Os vetores podem também ser adaptados para serem utilizados *in vivo*, por exemplo para permitir a expressão *in vivo* do polipéptido.

Um "promotor" é uma sequência de nucleótidos que inicia e regula a transcrição de um polinucleótido que codifica um polipéptido. Os promotores podem incluir promotores indutíveis (em que a expressão de uma sequência polinucleotídica operativamente ligada ao promotor é induzida por um analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores repressíveis (em que a expressão de uma sequência polinucleotídica operativamente ligada ao promotor é reprimida por um analito, cofactor, proteína reguladora, etc.) e promotores

constitutivos. Pretende-se incluir no termo "promotor" ou na expressão "elemento de controlo" regiões promotoras completas e segmentos funcionais (e.g., controlos da transcrição ou da tradução) dessas regiões.

Um polinucleótido, uma cassete de expressão ou um vetor aqui descritos podem adicionalmente compreender uma sequência de péptido de sinal. A sequência de péptido de sinal é geralmente inserida em ligação operativa com o promotor de forma a que o péptido de sinal seja expresso e facilite a secreção de um polipéptido codificado pela sequência de codificação também em ligação operativa com o promotor.

Tipicamente, uma sequência de péptido de sinal codifica um péptido de 10 a 30 aminoácidos, por exemplo 15 a 20 aminoácidos. Frequentemente, os aminoácidos são predominantemente hidrófobos. Numa situação típica, um péptido de sinal direciona uma cadeia polipeptídica crescente portadora do péptido de sinal para o retículo endoplasmático da célula de expressão. O péptido de sinal é clivado no retículo endoplasmático, permitindo a secreção do polipéptido através do aparelho de Golgi. Assim, um péptido da invenção pode ser proporcionado a um indivíduo através de expressão a partir de células dentro do indivíduo e secreção a partir dessas células.

Alternativamente, os polinucleótidos aqui descritos podem ser expressos de um modo adequado para permitir a apresentação de um péptido da invenção por uma molécula do MHC de classe II na superfície de uma célula apresentadora de antigénio. Por exemplo, um polinucleótido, uma cassete de expressão ou um vetor podem ser direcionados para células apresentadoras de antigénio, ou a expressão do péptido codificado pode ser preferencialmente estimulada ou induzida nessas células.

Os polinucleótidos de interesse podem ser utilizados *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* na produção de um péptido da invenção. Tais polinucleótidos podem ser administrados ou utilizados na prevenção ou tratamento de alergia por criação de tolerância.

Métodos para entrega de genes são conhecidos no estado da técnica. Veja-se, e.g., as patentes norte-americanas US 5399346, 5580859 e 55104466. A molécula de ácido nucleico pode ser introduzida diretamente no indivíduo recebedor, por exemplo através de injeção intramuscular ou intradérmica padrão;

entrega transdérmica de partículas; por inalação; topicamente; ou através dos modos de administração oral, intranasal ou mucosa. A molécula pode alternativamente ser introduzida *ex vivo* em células que tenham sido removidas de um indivíduo. Por exemplo, um polinucleótido, uma cassette de expressão ou um vetor podem ser introduzidos em APC de um indivíduo *ex vivo*. As células que contêm a molécula de ácido nucleico de interesse são reintroduzidas no indivíduo de forma que pode ser montada uma resposta imunitária contra o péptido codificado pela molécula de ácido nucleico. As moléculas de ácido nucleico utilizadas nessa imunização são aqui genericamente referidas como "vacinas de ácido nucleico".

Os polipéptidos, polinucleótidos, vetores ou células aqui descritos podem estar presentes numa forma substancialmente isolada. Podem ser misturados com transportadores ou diluentes que não interfiram com a sua utilização prevista e ainda assim ser considerados como substancialmente isolados. Podem também estar numa forma substancialmente purificada, caso em que geralmente compreenderão pelo menos 90%, e.g. pelo menos 95%, 98% ou 99%, das proteínas, polinucleótidos, células ou massa seca da preparação.

Células apresentadoras de antigénio (APC)

É também aqui descrita a utilização *in vitro* de um método de produção de uma população de APC que apresentam os péptidos da invenção na sua superfície, que podem ser subsequentemente utilizadas em terapia. Um tal método pode ser realizado *ex vivo* numa amostra de células obtida de um paciente. As APC produzidas deste modo formam portanto um agente farmacêutico que pode ser utilizado no tratamento ou prevenção da alergia a ácaros do pó por criação de tolerância. As células deverão ser aceites pelo sistema imunitário do indivíduo porque derivam desse indivíduo. A entrega de células que foram produzidas deste modo ao indivíduo do qual foram originalmente obtidas, constitui assim uma concretização terapêutica da presente divulgação.

Formulações e composições

Os péptidos, polinucleótidos, vetores e células aqui descritos podem ser proporcionados a um indivíduo quer individualmente, quer em combinação. Cada molécula ou célula pode ser proporcionada a um indivíduo numa forma isolada, substancialmente isolada, purificada ou substancialmente

purificada. Por exemplo, um péptido da invenção pode ser proporcionado a um indivíduo substancialmente isento de outros péptidos.

Embora seja possível que os péptidos, polinucleótidos ou composições de acordo com a invenção sejam apresentados numa forma em bruto, é preferível apresentá-los sob a forma de uma formulação farmacêutica. Assim, de acordo com um aspeto adicional da invenção, a presente invenção proporciona uma formulação farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de alergia a ácaros do pó por criação de tolerância, que compreende uma composição, um vetor ou um produto de acordo com a invenção, em conjunto com um ou mais transportadores ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis e opcionalmente um ou mais de outros ingredientes terapêuticos. O(s) transportador(es) deve(m) ser 'aceitáveis' no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da formulação e não serem prejudiciais para o indivíduo recebedor. Tipicamente, os transportadores para injeção e a formulação final são estéreis e apirogênicos.

A formulação de uma composição que compreende o péptido, os polinucleótidos ou células aqui descritos pode ser realizada utilizando técnicas e metodologias químicas padrão de formulação farmacêutica que estão todas prontamente disponíveis aos peritos.

Por exemplo, composições contendo uma ou mais moléculas ou células da invenção podem ser combinadas com um ou mais excipientes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis. Substâncias auxiliares, como agentes molhantes ou emulsionantes, substâncias tamponantes do pH, e similares, podem estar presentes no excipiente ou no veículo. Estes excipientes, veículos e substâncias auxiliares são geralmente agentes farmacêuticos que não induzem uma resposta imunitária no indivíduo que recebe a composição, e que podem ser administrados sem toxicidade indevida. Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não se lhes limitam, líquidos como água, solução salina, polietilenoglicol, ácido hialurónico e etanol. Sais farmacêuticamente aceitáveis também podem ser aqui incluídos, por exemplo, sais de ácidos minerais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos ou similares; e sais de ácidos orgânicos como acetatos, propionatos,

malonatos, benzoatos, e similares. Uma discussão exaustiva sobre excipientes, veículos e substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis está disponível em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991) .

Estas composições podem ser preparadas, embaladas ou comercializadas numa forma adequada para administração em *bolus* ou para administração contínua. Podem-se preparar, embalar ou comercializar composições injetáveis em formas de dosagem unitárias, por exemplo em ampolas ou recipientes multidose contendo um conservante. As composições incluem, mas não se lhes limitam, suspensões, soluções, emulsões em veículos oleosos ou aquosos, pastas, e formulações implantáveis de libertação sustentada ou biodegradáveis. Estas composições podem ainda compreender um ou mais ingredientes adicionais incluindo, mas não se limitando a, agentes de suspensão, estabilizantes ou dispersantes. Numa concretização de uma composição para administração parentérica, o ingrediente ativo é proporcionado em forma seca (e.g., um pó ou grânulos) para reconstituição com um veículo adequado (e.g., água estéril e apirogénica) antes da administração parentérica da composição reconstituída. As composições farmacêuticas podem ser preparadas, embaladas ou comercializadas sob a forma de uma suspensão ou solução aquosa ou oleosa estéril injetável. Esta suspensão ou solução pode ser formulada de acordo com o estado da técnica e pode compreender, para além do ingrediente ativo, ingredientes adicionais tais como agentes dispersantes, agentes molhantes ou agentes de suspensão aqui descritos. Estas formulações estéreis injetáveis podem ser preparadas usando um diluente ou solvente não tóxico, parentericamente aceitável, como água ou 1,3-butanodiol, por exemplo. Outros diluentes e solventes aceitáveis incluem, mas não se lhes limitam, solução de Ringer, solução isotónica de cloreto de sódio e óleos fixos, tais como mono- ou diglicéridos sintéticos. Outras composições passíveis de administração parentérica que são úteis incluem aquelas que compreendem o ingrediente ativo numa forma microcristalina, numa preparação lipossómica ou como um componente de um sistema polimérico biodegradável. Composições para libertação sustentada ou implantação podem compreender materiais poliméricos ou hidrófobos farmacêuticamente aceitáveis, tais como uma emulsão, uma resina permutadora de iões, um polímero pouco solúvel ou um sal pouco solúvel.

Alternativamente, os péptidos ou polinucleótidos aqui descritos podem ser encapsulados, adsorvidos a, ou associados a, transportadores particulados. Os transportadores particulados adequados incluem os derivados de polímeros de polimetilmetacrilato, bem como micropartículas de PLG derivadas de poli(lactidas) e poli(lactida-co-glicolida). Veja-se, e.g., Jeffery *et al.* (1993) *Pharm. Res.* 10: 362-368. Podem-se também utilizar outros polímeros e sistemas particulados, por exemplo, polímeros como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, assim como conjugados destas moléculas.

A formulação de qualquer dos péptidos, polinucleótidos ou células aqui mencionados dependerá de fatores como a natureza da substância e o método de entrega. Qualquer destas substâncias pode ser administrada numa variedade de formas de dosagem. Pode ser administrada oralmente (e.g., em comprimidos, pílulas, pastilhas, suspensões aquosas ou oleosas, pós ou grânulos dispersíveis), por via parentérica, epicutânea, subcutânea, por inalação, por via intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica, intradérmica, sublingual, intranasal, bucal, ou através de técnicas de infusão. A substância também pode ser administrada como supositórios. O médico será capaz de determinar a via de administração requerida para cada indivíduo particular.

As composições de formulações aqui descritas compreenderão uma concentração adequada de cada péptido/polinucleótido/célula que seja eficaz sem causar reações adversas. Tipicamente, a concentração de cada péptido na composição estará na gama de 0,03 a 200 nmol/ml. Mais preferivelmente, na gama de 0,3 a 200 nmol/ml, 3 a 180 nmol/ml, 10 a 150 nmol/ml ou 30 a 120 nmol/ml. A composição ou as formulações devem ter uma pureza superior a 95% ou 98% ou uma pureza de pelo menos 99%.

Assim, numa concretização, os péptidos, polinucleótidos, células ou composições aqui descritos, são utilizados para terapia em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos. Os agentes podem ser administrados separadamente, simultaneamente ou sequencialmente. Podem ser administrados na mesma composição ou em diferentes composições. Em conformidade, num método aqui descrito, o indivíduo pode também ser tratado com um outro agente terapêutico.

Pode portanto ser formulada uma composição que compreende uma molécula e/ou uma célula aqui descritas, e também uma ou mais outras moléculas terapêuticas. Uma composição da invenção pode, alternativamente, ser utilizada simultaneamente, sequencialmente ou separadamente com uma ou mais outras composições terapêuticas, como parte de um tratamento combinado.

Métodos terapêuticos e indivíduo a tratar

A presente divulgação refere-se a péptidos, polinucleótidos, vetores e células que são capazes de dessensibilizar ou criar tolerância em indivíduos humanos aos alergénios acima descritos e que são portanto úteis na prevenção ou tratamento de alergia a ácaros do pó. A invenção proporciona composições, produtos, vetores e formulações para utilização na prevenção ou tratamento de alergia a ácaros do pó por criação de tolerância. É aqui também descrito um método para criação de tolerância ou dessensibilização num indivíduo alérgico a ácaros do pó que compreende a administração ao indivíduo, individualmente ou em combinação, dos polipéptidos/polinucleótidos/células, conforme descrito acima.

O indivíduo a tratar com, ou que recebe, a composição ou formulação da invenção é preferivelmente um ser humano. Será notado que o indivíduo a tratar pode ser um indivíduo que se sabe estar sensibilizado aos alergénios, que pode estar em risco de ser sensibilizado ou que se suspeita estar sensibilizado. O indivíduo pode ser testado quanto à sua sensibilização usando técnicas bem conhecidas no estado da técnica e conforme aqui descrito. Alternativamente, o indivíduo pode ter uma história familiar de alergia a ácaros do pó. Pode não ser necessário testar um indivíduo quanto à sensibilização aos ácaros do pó porque o indivíduo pode apresentar sintomas de alergia quando exposto a ácaros do pó. "Exposição" significa proximidade a, por exemplo, uma peça de roupa, um colchão, uma almofada, uma fronha, um lençol, um cobertor ou outra roupa de cama, que não tenham sido lavados a mais de 50°C há mais de, aproximadamente, uma semana, ou um tapete, uma cortina ou uma peça de mobiliário estofado, que não tenham sido aspirados há mais de, aproximadamente, uma semana. Por proximidade entenda-se 10 metros ou menos, 5 metros ou menos, 2 metros ou menos, 1 metro ou menos ou 0 metros das peças acima descritas. Os sintomas da alergia podem incluir comichão nos olhos, corrimento

nasal, dificuldades respiratórias, pele avermelhada e irritada ou erupção cutânea.

O indivíduo a tratar pode ter qualquer idade. Contudo, preferivelmente, o indivíduo pode estar no grupo etário de 1 a 90, 5 a 60, 10 a 40 ou, mais preferivelmente, 18 a 35 anos.

Preferivelmente, o indivíduo a tratar pertence a uma população que tem frequências de alelos do MHC dentro da gama de frequências representativas da população caucasiana. As frequências alélicas da população de referência para 11 famílias de alelos DRB1 comuns estão apresentadas na Tabela 1 (dados de *HLA Facts Book*, Parham and Barber).

Tabela 1

DRB1	1	3	4	7	8	11	12	13	14	15	16
%	6,4	14,7	15,7	8,8	3,4	8,3	3,9	14,7	2,9	17,6	2,5
População de referência, %	9,4	11,1	12,8	13,2	3,7	13,4	2,3	10,2	3,2	10,7	3,6

As frequências de referência foram obtidas por análise de múltiplos estudos que reportam frequências e os valores apresentados são valores médios. Assim, preferivelmente, o indivíduo a tratar pertence a uma população que tem frequências de alelos do MHC equivalentes às da população de referência para os alelos indicados na Tabela 1 (tal como, para pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou todos os alelos), por exemplo, dentro da gama daqueles valores mais ou menos 1, 2, 3, 5, 10, 15 ou 20%.

Preferivelmente, o indivíduo pertence a uma população na qual as frequências alélicas dos seguintes alelos DRB1 são:

- 4 - pelo menos 9%
- 7 - pelo menos 10%
- 11 - pelo menos 8%

O indivíduo pode ter tido alergia a ácaros do pó durante pelo menos 2 semanas, 1 mês, 6 meses, 1 ano ou 5 anos. O indivíduo pode sofrer de erupção cutânea, congestão nasal, corrimento nasal e/ou tosse causadas pela alergia. O indivíduo pode, ou não, ter recebido administração de outras composições/compostos que tratam a alergia a ácaros do pó. O

indivíduo pode viver numa região geográfica que tenha uma humidade relativa diária média superior a 50%, preferivelmente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% ou 90%. O indivíduo pode viver numa região geográfica que se sabe suportar populações de ácaros do pó, por exemplo, a metade oriental dos Estados Unidos (e a maioria das cidades costeiras ocidentais dos Estados Unidos), áreas populosas do Canadá, Europa Ocidental, Japão, Coreia, e áreas costeiras da América do Sul, Austrália e África do Sul.

Imunoterapia de combinação

Uma vez que muitos indivíduos são alérgicos ou podem requerer dessensibilização a vários antigénios polipeptídicos, a presente invenção também proporciona meios de dessensibilização de indivíduos que são alérgicos a múltiplos antigénios. A "tolerância" induzida num indivíduo a um primeiro antigénio ou alergénio polipeptídico pode criar no indivíduo um "ambiente tolerogénico", em que respostas imunitárias inapropriadas a outros antigénios podem ser infra-reguladas de forma a proporcionar tolerância a outros antigénios.

Esta verificação significa que indivíduos alérgicos a múltiplos alergénios podem ser tratados num período tempo muito reduzido e que indivíduos gravemente alérgicos a alguns alergénios (e.g., amendoim), mas mais moderadamente alérgicos a outros alergénios (e.g., pelo de gato) podem beneficiar de uma terapia em que é estabelecida tolerância ao alergénio mais moderado e depois este ambiente tolerogénico é utilizado para proporcionar tolerância ao outro alergénio, mais extremo. Além disso, os indivíduos que sofrem de uma desordem autoimune que estão também sensibilizados (ou de outro modo imunes) a um antigénio ou alergénio não relacionado, podem beneficiar de um regime de tratamento no qual é primeiro estabelecida tolerância ao antigénio ou alergénio não relacionado e depois este ambiente tolerogénico é utilizado para proporcionar tolerância ao autoantigénio associado à desordem autoimune.

É portanto proporcionado um método para dessensibilização de um indivíduo alérgico aos ácaros do pó, ao antigénio dos ácaros do pó, conforme descrito acima, e a um ou mais outros antigénios polipeptídicos diferentes. O método implica, num primeiro passo, administrar ao indivíduo uma composição/ produto/ formulação (composição primária) de acordo com a invenção, conforme aqui descrito, e em que a administração é

realizada de um modo suficiente para gerar um estado hiporresponsivo contra o antigénio dos ácaros do pó. Uma vez estabelecido um estado hiporresponsivo em relação ao antigénio dos ácaros do pó, ou que pelo menos tenha ocorrido um desvio no sentido da dessensibilização, o método implica a administração de uma composição secundária compreendendo um segundo antigénio polipeptídico diferente ao qual se pretende sensibilizar o indivíduo. A administração da composição secundária é efetuada de modo a tirar partido do ambiente tolerogénico estabelecido pela utilização da composição primária, sendo agora possível estabelecer tolerância ao segundo antigénio polipeptídico diferente. A composição secundária é coadministrada com a primeira composição primária ou com um fragmento maior de Fel d1. O termo "coadministrada" designa a administração simultânea ou concomitante, e.g., quando os dois estão presentes na mesma composição ou são administrados em composições separadas quase ao mesmo tempo mas em locais diferentes, assim como a entrega de antigénios polipeptídicos em composições separadas em momentos diferentes. Por exemplo, a composição secundária pode ser entregue antes ou depois da entrega da primeira composição no mesmo local ou num local diferente. O tempo entre administrações pode variar desde cerca de vários segundos até cerca de vários minutos, várias horas ou mesmo vários dias. Além disso, podem ser empregues diferentes métodos de entrega.

O segundo antigénio polipeptídico é preferivelmente um alergénio diferente do alergénio dos ácaros do pó. Os alergénios adequados para utilização nos métodos da invenção podem, evidentemente, ser obtidos e/ou produzidos usando métodos conhecidos. As classes de alergénios adequados incluem, mas não se lhes limitam, outros alergénios dos ácaros do pó, pólenes, pelo de animal (especialmente pelo de gato), ervas, bolores, pós, antibióticos, venenos de picada de inseto e uma variedade de alergénios ambientais (incluindo químicos e metais), de fármacos e de alimentos. Os alergénios comuns de árvores incluem pólenes de choupo, álamo, freixo, vidoeiro, ácer, carvalho, olmo, noqueira-amarga e noqueira-pecã; os alergénios comuns de plantas incluem os de artemísia, ambrósia, tanchagem, azedas e anserina; os alergénios de contacto de plantas incluem os do carvalho venenoso, hera venenosa e urtigas; os alergénios comuns de ervas incluem os de azevém, fléolo, sorgo-bravo, relva das bermudas, festuca e poa; os alergénios comuns também podem ser obtidos de bolores ou fungos como a *Alternaria*, *Fusarium*,

Hormodendrum, *Aspergillus*, *Micropolyspora*, *Mucor* e actinomicetes termófilos; os alergénios epidérmicos podem ser obtidos a partir do pó doméstico ou orgânico (tipicamente de origem fúngica), ou de fontes animais, como penas de aves e pelo de cão; os alergénios alimentares comuns incluem alergénios do leite e do queijo (lactocínios), ovos, trigo, frutos secos (e.g., amendoim), marisco (e.g., crustáceos), ervilhas, feijão e glúten; os alergénios ambientais comuns incluem alergénios de metais (níquel e ouro), químicos (formaldeído, trinitrofenol e terebentina), látex, borracha, fibras (algodão ou lã), serapilheira, tinta para o cabelo, cosméticos, detergentes e perfumes; os alergénios comuns de fármacos incluem alergénios de anestésicos locais e salicilato; os alergénios de antibióticos incluem alergénios de penicilina, tetraciclinas e sulfonamida; e os alergénios comuns de insetos incluem alergénios de veneno de abelha, vespa e formiga e resíduos de barata. Os alergénios particularmente bem caracterizados incluem, mas não se lhes limitam, o alergénio principal dos gatos Fel d1, fosfolipase A2 (PLA) do veneno de abelhas, (Akdis *et al.* (1996) *J. Clin. Invest.* 98: 1676-1683), alergénio de pólen de videoeiro Bet v 1 (Bauer *et al.* (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107:536-541), e o alergénio de relva multiepitópico recombinante rKBG8.3 (Cao *et al.* (1997) *Immunology* 90: 46-51). Estes e outros alergénios adequados estão comercialmente disponíveis e/ou podem ser prontamente preparados na forma de extratos seguindo técnicas conhecidas.

Preferivelmente, o segundo alergénio polipeptídico é selecionado da lista de sequências de alergénios e números de acesso à base de dados (números de acesso ao Entrez do NCBI) abaixo. O NCBI é o National Center for Biotechnology Information e é uma divisão do US National Institutes of Health. O sítio da internet do NCBI, através do qual se pode aceder à base de dados é www.ncbi.nlm.nih.gov/. Sequências de alergénios e números de acesso à base de dados (números de acesso ao Entrez do NCBI):

Ácaros do pó doméstico*Dermatophagoides pteronyssinus*

Der p 1

MKIVLAIASLLALSAVYARPSSIKTFEYKKA FNKSYATFEDEEAARKNFLES
VKYVQSNNGGAINHLSLDEFKNRFLMSAEAFEHLKTQFDLNAETNACSIN
GNAPAEIDLRQMRVTPTIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNQSLDLA
EQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQR
FGISNYCQIYTPNVNKIREALAQTHSAIAVIIKIDLDAFRIHYDGRTHIQRDNGY
QPNYHAVNIVGYDNAQGVYDWVRNSWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEE
YPYVVIL

Der p 2

MMYKILCLSLVAAVARDQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIIRGKPF
QLEAVFEANQNTKTAKIEKASIDGLEVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYD
IKYTWNVPKIAPKSENVVTVKVMGDDGVLACAIATHAKIRD

Der p 3

MIYNILIVLLLAINTLANPILPASPNATTVGGEKALAGECPYQISLQSSSHFCGG
TILDEYWILTAACHCVAGQTASKLSIRYNSLKHSLGGEKISVAKIFAHEKYDSY
QIDNDIALIKLKSPMKLNQKNAKAVGLPAKGSVDKVGDVVRVSGWGYLEEG
SYSLPSELRRVDIAVVSKECNELYSKANA EVDN MICGGDVANGGKDSCQ
GDSGGPVVDVKNNQVVGIVSWGYGCARKGYPGVYTRVGNFIDWIESKRSQ

Der p 4

KYXNPHFIGXRSVITXLME

Der p 5

MKFIAFFVATLAVMTVSGEDKKHDYQNEFDLLMERIHEQIKKGELALFYLQ
EQINHFEKPTKEMKDKIVAEMDTIAMI DGVRGVLDRLMQRKDL DIFEQYN
LEMAKKSGDILERDLKKEEARVKKIEV

Der p 6

AIGXQPAEAEAPFQISLMK

Der p 7

MMKLLLIAAAAFVAVSADPIHYDKITEEINKAVDEAVAAIEKSETFDPMKVP
 DHSDKFERHIGIIDLKGEIDMRNIQVRGLKQMKRVGDANVKSEdGVVKAHL
 LVGVHDDVVSMEYDLAYKLGDIHPNTHVISDIQDFVVELSLEVSEEGNMTLT
 SFEVRQFANVVNHIGGLSILDPFAVLSDVLTAFQDTVRAEMTKVLAPAFKK
 EIERNNQ

Der p9

IVGGSNASPGDAVYQIAL

Dermatophagoides farinae

Der f 1

MKFVLAIASLLVLTVYARPASIKTFEFKKAFNKNYATVEEEEVARKNFLES
 LK YVEANKGA'NHLSDLSLDEFKNRYLMSAEAFEQLKTQFDLNAETSACRINSV
 NVPSELDLRLRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAYRNTSLDLSEQ
 ELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQQNGVVEERSYPYVAREQRCRRPNSQHYG
 ISNYCQIYPPDVKQIREALTQHTAIAVIIGIKDLRAFQHYDGRTIIQHDNGYQP
 NYHAVNIVGYGSTQGDDYWIVRNSWDTTWGDSGYGYFQAGNNLMMIEQY
 PYVVIM

Der f 2

MISKILCLSLLVAAVVADQVDVKDCANNEIKKVMVDGCHGSDPCIHRGKPF
 TLEALFDANQNTKTAKIEKASLDGLEIDVPGIDTNACHFMKCPLVKGQQYDI
 KYTWNVPKIAPKSENVVTVKLIgDNGVLACAIATHGKIRD

Der f 3

MMILTTVLLAANILATPILPSSPNATIVGGVKAQAGDCPYQISLQSSSHFCGG
 SILDEYWILTAACHCVNGQSAKKLSIRYNTLKHASGGEKIQVAETQHENYDS
 MTIDNDVALIKLKTPTMLDQTNAPVPLPAQGSdVKVGDKIRVSGWGYLQE
 GSYSLPSELQRVDIDVVSREQCDQLYSKAGADVSENMICGGDVANGGVDSC
 QGDSGGPVVDVATKQIVGIVSWGYGCAKRGYPGVYTRVGNFVDWIESKRS
 Q

Derf4

AVGGQDADLAEAPFQISLLK

Der f 7

MMKFLLIAAVAFVAVSADPHYDKITEEINKAIDDAIAAIEQSETIDPMKVTDH
ADKFERHVGIVDFKGELAMRNIEARGLKQMKRQGDANVKGEEGIVKAHLI
GVHDDIVSMEYDLAYKLGDLHPTTHVISDIQDFVVALSLEISDEGNITMTSFE
VRQFANVVNHIGGLSILDPIFGVLSDVLTAFQDQTVRKEMTKVLAPAFKRELE
KN

Sequências adicionais de alergénios de ácaros (acesso ao Entrez do NCBI):

1170095; 1359436; 2440053; 666007; 487661; 1545803; 84702;
84699; 625532; 404370; 1091577; 1460058; 7413; 9072; 387592.

Gato

Sequências de *Felis* (acesso ao Entrez do NCBI):

539716; 539715; 423193; 423192; 423191; 423190; 1364213;
1364212; 395407; 163827; 163823; 163825; 1169665; 232086;
1169666.

Látex

Sequências de hévea:

Hev b 1

MAEDEDNQQGQGEGLKYLGFVQDAATYAVTTFSNVYLFKDKSGPLQPGV
DIEGPKVKNVAVPLYNRFSYIPNGALKFVDSTVVASVTIHDRSLPPIVKDASIQV
VSAIRAAPEAARSLASSLPGQTKILAKVFYGEN

Hev b 3

MAEEVEEERLKYLDVRAAGVYAVDSFSTLYIYAKDISGPLKPGVDTIENVV
KTVVTPVYYIPLEAVKFVDKTVDSVTSLDGVVPPVIKQVSAQTSVAQDAP
RIVLDVASSVFNTGVQEGAKALYANLEPKAEQYAVITWRALNKIPLVPQVA
NVVVPTAVYFSEKYNDVVRGTTEQGYRVSSYLPLLPTKIKVFGDEAS

Sequências adicionais de hévea (acesso ao Entrez do NCBI):

3319923; 3319921; 3087805; 1493836; 1480457; 1223884; 3452147;
3451147; 1916805; 232267; 123335; 2501578; 3319662; 3288200;

1942537; 2392631; 2392630; 1421554; 1311006; 494093; 3183706;
3172534; 283243; 1170248; 1708278; 1706547; 464775; 2661042;
231586; 123337; 116359; 123062; 2213877; 542013; 2144920;
1070656; 2129914; 2129913; 2129912; 100135; 82026; 1076559;
82028; 82027; 282933; 280399; 100138; 1086972; 108697; 1086976;
1086978; 1086978; 1086976; 1086974; 1086972; 913758; 913757;
913756; 234388; 1092500; 228691; 1177405; 18839; 18837; 18835;
18833; 18831; 1209317; 1184668; 168217; 168215; 168213; 168211;
168209; 348137.

Azevém

Sequências de *Lolium*:

126385 Lol p 1

MASSSSVLLVVALFAVFLGSAHGIKVPPGNITA EYGDKWLD AKSTWYGK
PTGAGPKDNGGACGYKNVDKAPFNGMTGCGNTPIFKDGRGCGSCFEIKCTK
PESCSGEAVTVTITDDNEEPIAPYHFDLSGHAFGSMACKGEEQNVR SAGELEL
QFRRVKCKYPDDTKPTFHVEKASNP NYLAILVKYVDGDGDVVAVDIKEKGK
DKWIELKESWGAVWRIDTPDKLTGPFTVRYTTEGGTKSEFEDVIPEGWKADT
SYS AK

126386 Lol p 2a

AAPVEFTVEKGSDEKNLALSIKYNKEGDSMAEVELKEHGSNEWLALKKNGD
GVWEIKSDKPLKGPFNFRFVSEKGMNRNVFDDVVPADFKVGT TYKPE

126387 Lol p 3

TKVDLTVEKGSDAKTLVLNIKYTRPGDTLAEVELRQH GSEEWEPMTKKGNL
WEVKS AKPLTGPMNFRFLSKGGMKNVFDEVIPTAFTVGKTYTPEYN

2498581 Lol p 5a

MAVQKYTV ALFLRRGPRGGPGRSYAADAGYTPAAAATPATPAATPAGGWR
EGDDRRAEAAGGRQRLASRQPWPPLPTPLRRTSSRSSRPPSPSPPRASSPTSA
AKAPGLIPKLD TAYDVAYKAAEAHPRGQVRRLRHCPHRSLRVIAGALEVHA
VKPATEEVLA AKIPTGELQIVDKIDAAFKIAATAANAAPTNDKFTVFESA FNK
ALNECTGGAMRPTSSSPSRPRSSRPTPPPSPAAPEVKYAVFEAALTKAITAM
TQAQKAGKPAAAAATAAATVATAAATAAAVLPPPLL VVQSLISLLIYY

2498582 Lol p 5b

MAVQKHTVALFLAVALVAGPAASYAADAGYAPATPATPAAPATAATPATP
ATPATPAAVPSGKATTEEQKLIEKINAGFKAAVAAAAVPPADKYKTFVETF
GTATNKAFVEGLASGYADQSKNQLTSKLDAAALKLAYEAAQGATPEAKYDA
YVATLTEALRVIACTLEVIHAVKPAAEVVKVGAIPAAEVQLIDKVDAAYRTA
ATAANAAPANDKFTVFENTFNNAIKVSLGAAYDSYKFIPTLVAAVKQAYAA
KQATAPEVKYTVSETALKKAVTAMSEAEKEATPAAAATATPTPAAATATAT
PAAAYATATPAAATATATPAAATATPAAAGGYKV

455288 Lol p isoforma 9

MAVQKHTVALFLAVALVAGPAASYAADAGYAPATPATPAAPATAATPATP
ATPATPAAVPSGKATTEEQKLIEKINAGFKAAVAAAAVPPADKYKTFVETF
GTATNKAFVEGLASGYADQSKNQLTSKLDAAALKLAYEAAQGATPEAKYDA
YVATLTEALRVIACTLEVIHAVKPAAEVVKVGAIPAAEVQLIDKVDAAYRTA
ATAANAAPANDKFTVFENTFNNAIKVSLGAAYDSYKFIPTLVAAVKQAYAA
KQATAPEVKYTVSETALKKAVTAMSEAEKEATPAAAATATPTPAAATATAT
PAAAYATATPAAATATATPAAATATPAAAGGYKV

1582249 Lol p 11

DKGPGFVVTGRVYCDPCRAGFETNVSHNVEGATVAVD CRPFDGGESKLKAE
ATTDKDGWYKIEIDQDHQEEICEVVLAKSPDKSCSEIEFRDRARVPLTSNXG
IKQQGIRYANPIAFFRKEPLKECGGILQAY

Sequências adicionais de *Lolium* (acesso ao Entrez do NCBI):

135480; 417103; 687261; 687259; 1771355; 2388662; 631955;
542131; 542130; 542129; 100636; 626029; 542132; 320616; 320615;
320614; 100638; 100634; 82450; 626028; 100639; 283345; 542133;
1771353; 1763163; 1040877; 1040875; 250525; 551047; 515377;
510911; 939932; 439950; 2718; 168316; 168314; 485371; 2388664;
2832717; 2828273; 548867.

Oliveira

Sequências de oliveira

416610 Ole e 1

EDIPQPPVSQFHIQGQVYCDTCRAGFITELSEFIPGASLRLQCKDKENGDTVFT
EVGYTRAEGLYSMLVERDHKNEFCETLISSGRKDCNEIPTEGWAKPSLKFKL
NTVNGTTRTVNPLGFFKKEALPKCAQVYNKLGMYPPNM

Parietária

Sequências de parietária:

2497750 Par j P2

MRTVSMAALVVIAAALAWTSSAEPAPAPAGGEEACGKVVDIMPCLHFVKG
EEKEPSKECCSGTKKLSEEVKTTEQKREACKCIVRATKGISGIKNELVAEVPK
KCDIKTTLPITADFDCKSIQSTIFRGYY

1352506 Par j P5

MVRALMPCLPFVQGKEKEPSKGCCSGAKRLDGETKTGPQRVHACECIQTAM
KTYSDIDGKLVSEVPKHCGIVDSKLPPIDVNMDCKTVGVVPRQPQLPVSLRH
GPVTGPSDPAHKARLERPQIRVPPPAPEKA

1532056 Par j P8

MRTVSMAALVVIAAALAWTSSAELASAPAGGEGPCGKVVHHIMPCLKFVKG
EEKEPSKSCCSGTKKLSEEVKTTEQKREACKCIVAATKGISGIKNELVAEVPK
KCGITTTLPITADFDCKSIESTIFRGYY

1532058 Par j P9

MRTVSAPSAVALVVTVAAGLAWTSLASVAPPAPAGSEETCGTVVVRALMPC
LPFVQGKEKEPSKGCCSGAKRLDGETKTGLQRVHACECIQTAMKTYSDIDGK
LVSEVPKHCGIVDSKLPPIDVNMDCKTLGVVPRQPQLPVSLRHGPVTGPSDPA
HKARLERPQIRVPPPAPEKA

2497749 Par j P9

MRTVSARSSVALVVTVA AVLVTSSASVAPAPAGSEETCGTVVGALMPCL
PFVQGKEKEPSKGCCSGAKRLDGETKTGPQRVHACECIQTAMKTYSDIDGK
VSEVPKHCGIVDSKLPPIDVNMDCKTLGVLHYKGN

1086003 Par j 1

MVRLMPCLPFVQGEKEPSKGCCSGAKRLDGETKTGPQRVHACECIQTAM
 KTYSDIDGKLVSEVPKIICGIVDSKLPIDVNMDCKTVGVVPRQPQLPVSLRH
 GPVTGPSRSRPPTKHGWRDPRLEFRPPHRKKPNPAFSTLG

Sequências adicionais de *parietária* (acesso ao Entrez do NCBI):
 543659; 1836011; 1836010; 1311513; 1311512; 1311511; 1311510;
 1311509; 240971.

Fléolo

Sequências de *Phleum*:

Phl p 1

MASSSSVLLVVVLFVFLGSAYGIPKVPPGPNITATYGDKWLDKSTWYGKP
 TGAGPKDNGGACGYKDVDKPPFSGMTGCCNTPIFKSGRGCSCFEIKCTKPE
 ACSGEPVVVHITDDNEEPIAPYHFDLSGHAFGAMAKKGDEQKLSAGELELQ
 FRRVKCKYPEGTKVTFHVEKGSNPNYLALLVKYVNGDGDVVAVDIKEKGK
 DKWIELKESWGAIWRIDTPDKLTGPFTVRYTTEGGTKTEAEDVIPEGWKADT
 SYESK

Phl p 1

MASSSSVLLVVVLFVFLGSAHGIPKVPPGPNITATYGDKWLDKSTWYGKP
 TAAGPKDNGGACGYKDVDKPPFSGMTGCCNTPIFKSGRGCSCFEIKCTKPE
 ACSGEPVVVHITDDNEEPIAAYHFDLSGLAFGSMMAKKGDEQKLSAGEVEIQF
 RRVKCKYPEGTKVTFHVEKGSNPNYLALLVKFSGDGDVVAVDIKEKGKDK
 WIALKESWGAIWRIDTPEVLKGPFTVRYTTEGGTKARAKDVIPEGWKADTA
 YESK

Phlp 2

MSMASSSSSSLLAMAVLAALFAGAWCVPKVTFTVEKGSNEKHLAVLVKYE
 GDTMAEVELREHGSDEWVAMTKGEGGVWTFDSEEPLQGPFNFRFLTEKGM
 KNVFDDVVPEKYTIGATYAPEE

Ph1 p 5

ADLGYGGPATPAAPAEAAPAGKATTEEQKLIKINDGFKAALAAAAGVPPA
DKYKTFVATFGAASNKAFAEGLSAEPKGAAESSSKAALTSKLDAAAYKLAYK
TAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIIAGTLEVHAVKPAAEEVKVIPAGELQVIE
KVDSAFKVAATAANAAPANDKFTVFEEAFNNAIKASTGGAYESYKFIPALEA
AVKQAYAATVATAPEVKYTVFETALKKAFTAMSEAQKAAPATEATATAT
AAVGAATGAATAATGGYKV

Ph1 p 5

ADLGYGGPATPAAPAEAAPAGKATTEEQKLIKINDGFKAALAAAAGVPPA
DKYKTFVATFGAASNKAFAEGLSAEPKGAAESSSKAALTSKLDAAAYKLAYK
TAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIIAGTLEVHAVKPAAEEVKVIPAGELQVIE
KVDSAFKVAATAANAAPANDKFTVFEEAFNNAIKASTGGAYESYKFIPALEA
AVKQAYAATVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAAPATEATATAT
AAVGAATGAATAATGGYKV

Ph1 p 5b

AAAAVPRRGPGRGPGRSYTADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDIN
VGFKAAVAAAASVPAADKFKTFEAAFTSSSKAAAAPGLVPKLDAAYSVA
YKAAVGATPEAKFDSFVASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMKIPAGE
LQIIDKIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAYDTYKCIP
SLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQPATGAA
TVAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

Ph1 p 5a

ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAGADAAGKATTEEQKLIKINAGFKA
ALAGAGVQPADKYRTFVATFGPASNKAFAEGLSGEPKGAAESSSKAALTSK
LDAAYKLAYKTAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIIAGTLEVHAVKPAAEEV
KVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAANAAPANDKFTVFEEAFNDEIKASTGGA
YESYKFIPALEAAVKQAYAATVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAA
KPAAAATATATAAVGAATGAATAATGGYKV

Ph1 p 5

MAVQKYTVLFLAVALVAGPAASYAADAGYAPATPAAAGAEAGKATTEEQ
KLIEDINVGFKAAVAAAASVPAADKFKTFEAAFTSSSKAATAKAPGLVPKLD
AAYSVSYSYKAAVGATPEAKFDSFVASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGM
AKIPAGELQIIDKIDAAFKVAATAAATAPADTVFEEAFNKAIKESTGGAYDTY
KCIPSLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQPAT
GAATVAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

Ph1 p 5

MAVQKYTVLFLAVALVAGPAASYAADAGYAPATPAAAGAEAGKATTEEQ
 KLIEDINVGFKA AVAAAASVPAADKFKTFEAAFTSSSKAATAKAPGLVPKLD
 AAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFVASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEDEPAW
 PKIPAGELQIIDKIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAY
 DTYKCIPSLEAAVKQAYAAATVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQ
 PATGAATVAAGAATTATGAASGAATVAAGGYKV

Ph1 p 5

ADAGYAPATPAAAGAEAGKATTEEQKLIEDINVGFKA AVAAAASVPAADKF
 KTFEAAFTSSSKAATAKAPGLVPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFVAS
 LTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAATAAAT
 APADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAAATVAAAP
 QVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQPATGAATVAAGAATTAAGAASGAA
 TVAAGGYKV

Ph1 p 5

SVKRSNGSAEVIIRGAVPRRGPRGGPGRSYAADAGYAPATPAAAGAEAGKA
 TTEEQKLIEDINVGFKA AVAAAASVPAADKFKTFEAAFTSSSKAATAKAPGL
 VPKLDAAYSVAYKAAVGATPEAKFDSFVASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTE
 EEPGMAKIPAGELQIIDKIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKES
 TGGAYDTYKCIPSLEAAVKQAYAAATVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEV
 QKVSQPATGAATVAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

Ph1 p 5

MAVHQYTVLFLAVALVAGPAGSYAADLGYPATPAAPAAGYTPATPAAP
 AGAEPAGKATTEEQKLIEKINAGFKAALAAAAGVPPADKYRTFVATFGAAS
 NKAFAEGLSGEPKGAAESSSKAALTSKIDAAYKLAYKTAEGATPEAKYDAY
 VATVSEALRIIAGTLEVHAVKPAAEEVKVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAA
 NAAPANDKFTVFEEAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEAAVKQAYAAATVAT
 APEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAAPAAAATATATAAVGAATGAATA
 ATGGYKV

Ph1 p 5

ADLGYPGPATPAAPAEAPAGKATTEEQKLIEKINDGFKAALAAAAGVPPA
 DKYKTFVATFGAASNKAFAEGLSAEPKGAAESSSKAALTSKIDAAYKLAYK
 TAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIIAGTLEVHAVKPAAEEVKVIPAGELQVIE
 KVDSAFKVAATAANAAPANDKFTVFEEAFNNAIKASTGGAYESYKFIPALEA

AVKQAYAATVATAPEVKYTVFETALKKAFTAMSEAQKAAKPATEATATAT
AAVGAATGAATAATGGYKV

Ph1 p 5b

AAAAVPRRGPRGGPGRSYTADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDIN
VGFKAAVAAAASVPAADKFKTFEAAFTSSSKAAAAPGLVPKLDAAYSVA
YKAAVGATPEAKFDSFVASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGE
LQIIDKIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEAAFNKAIKESTGGAYDTYKCIP
SLEAAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQPATGAA
TVAAGAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

Ph1 p 5a

ADLGYPATPAAPAAGYTPATPAAPAGADAAGKATTEEQKLIEKINAGFKA
ALAGAGVQPADKYRTFVATFGPASNKAFAEGLSGEPKGAAESSSKAALTSK
LDAAYKLAYKTAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIIAGTLEVHAVKPAAEEV
KVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAANAAPANDKFTVFEAAFNDEIKASTGGA
YESYKFIPALEAAVKQAYAATVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAA
KPAAAATATATAAVGAATGAATAATGGYKV

Ph1 p 5

AVPRRGPRGGPGRSYAADAGYAPATPAAAGAAEAGKATTEEQKLIEDINVG
KAAVAAAASVPAGDKFKTFEAAFTSSSKAATAKAPGLVPKLDAAYSVAYKA
AVGATPEAKFDSFVASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQII
DKIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEAAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLE
AAVKQAYAATVAAAPQVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQPATGAATVA
AGAATTATGAASGAATVAAGGYKV

Ph1 p 5b

MAVPRRGPRGGPGRSYTADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVG
FKAAVAARQRPAADKFKTFEASPRHPRPLRQGAGLVPKLDAAYSVAYKAA
VGATPEAKFDSFVASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIID
KIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEAAFNKAIKESTGGAYDTYKCIPSLEA
AVKQAYAATVAAAAEVKYAVFEAALTKAITAMSEVQKVSQPATGAATVAA
GAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

Ph1 p 5

MAVHQYTVALFLAVALVAGPAASYAADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAP
AEAAPAGKATTEEQKLEKINAGFKAALAAAAGVQPADKYRTFVATFGAAS
NKAFAEGLSGEPKGAAESSKAALTSKLDAAAYKLAYKTAEGATPEAKYDAY
VATLSEALRIIAGTLEVIIHAVKPAAEEVKVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAA
NAAPANDKFTVFEEAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEAAVKQAYAATVAT
APEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAAPAAAATATATAAVGAATGAATA
ATGGYKV

Ph1 p 5

EAPAGKATTEEQKLEKINAGFKAALARRLQPADKYRTFVATFGPASNKAF
EGLSGEPKGAAESSKAALTSKLDAAAYKLAYKTAEGATPEAKYDAYVATLS
EALRIIAGTLEVHAVKPAAEEVKVIPAAELQVIEKVDAAFKVAATAANAAPA
NDKFTVFEEAFNDEIKASTGGAYESYKFIPALEAAVKQAYAATVATAPEVKY
TVFETALKKAITAMSEAQKAAPPLPPPPQPPPLAATGAATAATGGYKV

Ph1 p 5

MAVHQYTVALFLAVALVAGPAASYAADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAP
AEAAPAGKATTEEQKLEKINAGFKAALAAAAGVQPADKYRTFVATFGAAS
NKAFAEGLSGEPKGAAESSKAALTSKLDAAAYKLAYKTAEGATPEAKYDAY
VATLSEALRIIAGTLEVHAVKPAAEEVKVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAA
NAAPANDKFTVFEEAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEAAVKQAYAATVAT
APEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAAPAAAATATATAAVGAATGAATA
ATGGYKV

Ph1 p 5b

MAVPRRGPRGGPGRSYTADAGYAPATPAAAGAAAGKATTEEQKLIEDINVG
FKAAVAARQRPAADKFKTFEASPRHPRPLRQGAGLVPKLDAAYSVAAYKAA
VGATPEAKFDSFVASLTEALRVIAGALEVHAVKPVTEEPGMAKIPAGELQIID
KIDAAFKVAATAAATAPADDKFTVFEEAFNKAIKESTGGAYDITYKCIPSLEA
AVKQAYAATVAAAAEVKYAVFEAALT KAITAMSEVQKVSQPATGAATVAA
GAATTAAGAASGAATVAAGGYKV

Ph1 p 5a

ADLGYPATPAAPAAGYTPATPAAPAGADAAGKATTEEQKLIKINAGFKA
ALAGAGVQPADKYRTFVATFGPASNKAF AEGLSGEPKGAAESSSKAALTSK
LDAAYKLAYKTAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIIAGTLEVHAVKPAEEV
KVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAANAAPANDKFTVFEEAFNDEIKASTGGA
YESYKFIPALEAAVKQAYAATVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAA
KPPPLPPPPQPPPLAATGAATAATGGYKV

Ph1 p 5

MAVHQYTVALFLAVALVAGPAASYAADLGYPATPAAPAAGYTPATPAAP
AEAAPAGKATTEEQKLIKINAGFKAALAAAAGVQPADKYRTFVATFGAAS
NKAF AEGLSGEPKGAAESSSKAALTSK LDAAYKLAYKTAEGATPEAKYDAY
VATLSEALRIIAGTLEVIIHAVKPAEEVKVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAA
NAAPANDKFTVFEEAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEAAVKQAYAATVAT
APEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKA AKPAAAATATATAAVGAATGAATA
ATGGYKV

Ph1 p 6

MAAIHKFMVAMFLAVAVVLGLATSPTAEGGKATTEEQKLIEDVNASFRAAM
ATTANVPPADKYKTFEAAFTVSSKRNLADAVSKAPQLVPKLDEVYNAAYNA
ADHAAPEDKYEAFVLHFSEALRIIAGTPEVHAVKPGA

Ph1 p 6

SKAPQLVPKLDEVYNAAYNAADHAAPEDKYEAFVLHFSEALHIIAGTPEVHA
VKPGA

Ph1 p 6

ADKYKTFEAAFTVSSKRNLADAVSKAPQLVPKLDEVYNAAYNAADHAAPE
DKYEAFVLHFSEALHIIAGTPEVHAVKPGA

Ph1 p 6

TEEQKLIEDVNASFRAAMATTANVPPADKYKTLEAAFTVSSKRNLADAVSK
APQLVPKLDEVYNAAYNAADHAAPEDKYEAFVLHFSEALRIIAGTPEVHAVK
PGA

Phl p 6

MAAHKFMVAMFLAVAVVLGLATSPTAEGGKATTEEQKLIEDINASFRAAMA
TTANVPPADKYKTFEAAFTVSSKRNLADAVSKAPQLVPKLDEVYNAAYNAA
DHAAPEDKYEAFVLHFSEALHIIAGTPEVHAVKPGA

Phlp 6

MVAMFLAVAVVLGLATSPTAEGGKATTEEQKLIEDVNASFRAAMATTANVP
PADKYKTFEAAFTVSSKRNLADAVSKAPQLVPKLDEVYNAAYNAADHAAP
EDKYEAFVLHFSEALRIIAGTPEVHAVKPGA

Phl p 7

MADDMERIFKRFDTNNGDGKISLSELTDALRTLGSTSADEVQRMMAEIDTDGD
GFIDFNEFISFCNANPGLMKDVAKVF

Phl p 11

MSWQTYVDEHLMCEIEGHHLASAAILGHIDGTVWAQSADFPQFKPEETGIM
KDFDEPGHLAPTGMFVAGAKYMWIQGEPGRVIRGKKGAGGITIKKTGQALV
VGIYDEPMTPGQCNMVVERLGDYLV EQGM

Sequências adicionais de *Phleum* (acesso ao Entrez do NCBI):

458878; 548863; 2529314; 2529308; 2415702; 2415700; 2415698;
542168; 542167; 626037; 542169; 541814; 542171; 253337; 253336;
453976; 439960.

Vespa (e relacionados)

Sequências de *Vespula*:

465054 ALERGÉNIO VES V 5

MEISGLVYLIIIVTIIDLPGKANNYCKIKCLKGGVHTACKYGLKPNCGNKV
VVSYGTLTKQEKQDILKEHNDFRQKIARGLETRGNPGPQPPAKNMKNLVWND
ELAYVAQVWANQCQYGHDTCDVAKYQVGQNVALTGSTAAKYDDPVKLV
KMWEDEVKDYNPKKKFSGNDFLKTGHYTQMVWANTKEVGCGSIKYIQEK
WHKHVLCNYGPSGNFMNEELYQTK

1709545 ALERGÉNIO VES M 1

GPKCPFNSDTVSIIETRENRNRDLYTLQTLQNHPEFKKKTITRPVVFITHGFTS
 SASEKNFINLAKALVDKDNMVISIDWQTAACNEYPGLKYAYYPTAASNT
 RLVGQYIATITQKLVKDYKISMANIRLIGHSLGAHVSGFAGKRVQELKLGKYS
 EIIGLDPARPSFDSNHCSERLCETDAEYVQIIHTSNYLGTEKILGTVDGYMNG
 KNNPGCGRFFSEVCSHTRAVIYMAECIKHECCLIGIPRSKSSQPISRCTKQECV
 CVGLNAKKYPSRGSFYVPVESTAPFCNNKGKII

1352699 ALERGÉNIO VES V 1

MEENMNLKYLLLFFVYFVQVLNCCYGHGDPLSYELDRGPKCPFNSDTVSIIET
 RENNRNRDLYTLQTLQNHPEFKKKTITRPVVFITHGFTSSASETNFINLAKALVD
 KDNMVISIDWQTAACNEAAGLYLYPTAARNTRLVGQYIATITQKLVK
 IITYKISMANIRLIGHSLGAHASGFAGKKVQELKLGKYSEIIGLDPARPSFDSNH
 CSERLCETDAEYVQIIHTSNYLGTEKTLGTVDGYMNGKNNQPGCGRFFSEVC
 SHSRAVIYMAECIKHECCLIGIPKSKSSQPISRCTKQECV CVGLNAKKYPSRGS
 FYVPVESTAPFCNNKGKII

1346323 ALERGÉNIO VES V 2

SERPKRVFNTYWNVPTFMCHQYDLYFDEVTFNFKRNSKDDFQGDKIAIFYD
 PGEFPALLSLKDGYKKRNGGVPQEGNITHLQKFLENLDKIYPNRNFSGIGVI
 DFERWRPIFRQNWGNMKIHKNFSIDLVRNEHPTWNKKMTELEASKRFEKYA
 RFFMEETLKLAKKTRKQADWGYGYGYPCFNMSPNNLVPECDVTAMHENDK
 MSWLFNNQNVLLPSVYVRQELTPDQRIGLVQGRVKEAVRISNNLKHSPKVL
 YWWYVYQDETNTFLTETDVKKTFQEIVNGGDGHIWGSSSDVNSLSKCKRL
 QDYLLTVLGPIAINVTEAVN

549194 ALERGÉNIO VES VI

SKVNYCKIKCLKGGVHTACKYGTSTKPNCGKMVVKAYGLTEAEKQEILKVH
 NDFRQKVAKGLETRGNPGPQPPAKNMNNLVWNDELANIAQVWASQCNYG
 HDTCKDTEKYPVGQNIKRSTTAALFDSPGKLVKMWENEVKDFNPNIWSK
 NNLKKTGHYTQMVWAKTKEIGCGSVKYVKDEWYTHYLCNYGPSGNFRN
 EKI.YEKK

Sequências adicionais de *Vespula* (acesso ao Entrez do NCBI):

549193; 549192; 549191; 549190; 5491104; 117414; 126761; 69576;
 625255; 6271104; 627188; 627187; 482382; 112561; 627186;
 627185; 1923233; 1047645; 1047647; 745570; 225764; 162551.

Sequências de alergénios de árvores (principalmente de videoeiro) :

114922 Bet v 1

MGVFN YETETTSVIP AARLFKAFIL DGNLFPKVAPQA ISSVENIEGNGGPGTI
KKISFPEGFPFKYVKDRVDEV DHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIKIVAT
PDGGSILKISNKYHTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVESYLLAHSDAY
N

130975 Bet v 2

MSWQIYVDEHLMCDIDGQASNSLASAIVGHDGSVWAQSSSFPQFKPQEITGI
MKDFEEPCHILAPTGLHLGGIKYMV IQGEAGAVIRGKKGSGGITIKKTGQALV
FGIYEEPVTPGQCNMVVERLGDY LIDQGL

1168696 Bet v 3

MPCSTEAMEKAGHGHASTPRKRSLSNSSFRLRSESLNTRLRLRRIFDI.FDKNSD
GIITVDELSRALNLLGLETDLSELESTVKSFTREGNIGLQFEDFISLHQSLNDSY
FAYGGEDEDDNEEDMRKSILSQEADSFGGFKVFEDEDGDGYISARELQMV L
GKLG FSEGSEIDRVEKMIVSVDSNRDGRVDFFEFKDMMRSVLVRSS

809536 Bet v 4

MADDDHPQDKAERERIFKRFDANGDGKISAAELGEALKTLGSITPDEVKHMM
AEIDTDGDGFISFQEFTDFGRANRGLLKDVAKIF

543675 Que a I - *Quercus alba* = carvalhos (fragmento)

GVFTXESQETSVIAPAXLFKALFL

543509 Car b I - *Carpinus betulus* - carpa europeia (fragmento)

GVFN YEAETPSVIP AARLFKSYVLDGDKLIPKVAPQAI XK

543491 Aln g I - *Alnus glutinosa* = amieiro (fragmento)

GVFN YEAETPSVIP AARLFKAFILDGDKLLPKVAPEAVSSVENI

1204056 *Rubisco*

VQCMQVWPPLGLKKFETLSYLPPLSSEQLAKEVDYLLRKNLIPC LEFELEHGF
VYREHNRS PGYYDGRYWTMWKLP MFGCNDSSQVLKELEECKKAYPSAFIRI
IGFDDK

Sequências adicionais de alergénios de árvores (acesso ao Entrez do NCBI):

131919; 128193; 585564; 1942360; 2554672; 2392209; 2414158; 1321728; 1321726; 1321724; 1321722; 1321720; 1321718; 1321716; 1321714; 1321712; 3015520; 2935416; 464576; 1705843; 1168701; 1168710; 1168709; 1168708; 1168707; 1168706; 1168705; 1168704; 1168703; 1168702; 1842188; 2564228; 2564226; 2564224; 2564222; 2564220; 2051993; 18131041; 15368104; 534910; 534900; 5341048; 1340000; 1339998; 2149808; 66207; 2129477; 1076249; 1076247; 629480; 481805; 81443; 1361968; 1361967; 1361966; 1361965; 1361964; 1361963; 1361962; 1361961; 1361960; 1361959; 320546; 629483; 629482; 629481; 541804; 320545; 81444; 541814; 629484; 474911; 452742; 1834387; 298737; 298736; 1584322; 1584321; 584320; 1542873; 1542871; 1542869; 1542867; 1542865; 1542863; 1542861; 1542859; 1542857; 1483232; 1483230; 1483228; 558561; 551640; 488605; 452746; 452744; 452740; 452738; 452736; 452734; 452732; 452730; 452728; 450885; 17938; 17927; 17925; 17921; 297538; 510951; 2104331; 2104329; 166953.

Amendoim

Sequências de amendoim

1168391 Ara h 1

MRGRVSPMLLLLGLVLASVSATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQEPDD
LKQKACESRCKLEYDPRCVYDPRGHTGTTNQRSPPGERTRGRQPGDYDDD
RRQPRREEGGRWGPAGPREREREEDWRQPREDWRRPSHQPRKIRPEGREG
EQEWGTPGSHVREETSRRNNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFQSRQF
QNLQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGNNRKSFNL
DEGHIALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSY
LQGFSRNTLEAAFNAEFNEIRRVLLEENAGGEQEERGQRRWSTRSSENNEGVI
VKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEEGDITNPINLREGEPDLSNNFGKLFEVK
PDKKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELV
AVRKEQQQRGRREEEDEDDEEEEGSNREVRRYTARLKEGDVFIMPAAHPVAI
NASSELIILLGFGINAENNRHIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKL
IKNQKESHFVSARPSQSQSQSPSSPEKESPEKEDQEEENQGGKGPLLILKAFN

Ambrósia

Sequências de ambrósia

113478 Amb a 1

MGIKHCCYILYFTLALVTLQPVRS AEDLQQILPSANETRSLTTCGTYNIIDGC
 WRGKADWAENRKALADCAQGFAGKTIGGKDGDYITVTSELDDDVANPKEG
 TLRFGAAQNRPLWIFARDMVIRLDRELAINNDKTIDGRGAKVEHNAGFAIYN
 VKNIHINIIMHDIVVNPGGLIKSHDGPPVPRKGS DGAIGISGGSQIWDHCSLS
 KAVDGLIDAKHGSTHFTVSNCLFTQHIQYLLLFWD FDERGMLCTVAFNKFTD
 NVDQRM PNLRHGFVQVVNNNYERWGSYALGGSAGPTILSQGNRFLASDIKK
 EVVGRYGESAMSESINWNWRSYMDVFENG AIFVPSGVDPVLTPEQNAGMIP
 AEPGEAVLRLTSSAGVLSCQPGAPC

113479 Amb a 2

MGIKHCCYILYFTLALVTLVQAGRLGEEVDILPSPNDTRRSLQGCEAHNIIDK
 CWRCKPDWAENRQALGNCAQGFAGKATHGGKWGDYIMVTS DQDDDVVNP
 KEGTLRFGATQDRPLWIFQRDMIIYLQQEMVVTSDKTIDGRGAKVELVYGGI
 TLMNVKNVHHNIDHVRVLPGGRIKSNGGPAIPRHQSDGDAIHVTGSSDIWI
 DHCTLSKSF DGLVDVNWGSTGVTISNCKFTTHHEKAVLLGASDTHFQDLKMH
 VTLAYNIFTNTVHERMPRCRFGFFQIVNNFYDRWDKYAIGGSSNPTILSQGNK
 FVAPDFIYKKNVCLRTGAQEP EWM TWNWRTQNDVLENGAIFVASGSDPVLT
 AEQNAGMMQAEPGDMVPQLTMNAGVLTCS PGAPC

113477 Amb a 1.3

MGIKQCCYILYFTLALVALLQPVRS AEGVGEILPSVNETRSLQACEALNIIDKC
 WRGKADWENNRQALADCAQGFAGKTYGGKWGDVYTVTSNLDDDVANPK
 EGT LRFAAAQNRPLWIFKNDMVINLNQELVVNSDKTIDGRGVKVEHNGGLT
 LMNVKNIIHNNIHVDVKVLPGGMIKSNDGPPILRQASDGD TINVAGSSQIWD
 HCSLSKSF DGLVDVTLGSTHVTISNCKFTQQSKAILLGADDTHVQDKGMLAT
 VAFNMFTDNVDQRMPCRF GFFQVVNNNYDRWGTYAIGGSSAPTILCQGNR
 FLAPDDQIKKNVLARTGTGAAESMAWNWRS DKLLENGAIFVTSGSDPVLT
 PVQSAGMIPAEPGEAAIKLTSSAGVFSCHPGAPC

113476 Amb a 1.2

MGIKHCCYILYFTLALVTLLQPVRSAEDVEEFLPSANETRRLKACEAHNIIDK
CWRCKADWANNRQALADCAQGFAKGTGGKHGADVTVTSKDDDDVANP
KEGTLRFAAAQNRPLWIFKRNMVHILNQELVVNSDKTIDGRGVKVNIVNAG
LILMNVKNIHNIHDIKVCPPGGMKSNKGPPILRQQSDGDAINVAGSSQIWI
DHCSLSKASDGLDITLGSSHVTVSNCKFTQHQQFVLLGADDTHYQDKGML
ATVAFNMFTDHVDQRMPCRFRGFFQVVNNNYDRWGTYAIGGSSAPTILSQG
NRFFAPDDIHKKNVLARTGTGNAESMSWNWRTDRDLLENGAIFLPSGSDPVL
TPEQKAGMIPAEPGEAVLRLTSSAGVLSCHQGAPC

113475 Amb a 1.1

MGIKHCCYILYFTLALVTLLQPVRSAEDLQEILPVNETRRLTSGAYNIIDGCW
RGKADWAENRKALADCAQGFKGTVGGKDGDIYTVTSELDDDDVANPKEGT
LRFGAAQNRPLWIFERDMVIRLDKEMVVNSDKTIDGRGAKVEIINAGFTLNG
VKNVIIHNNMHVDKVNPGGLIKSNDGPAAPRAGSDGDAISISGSSQIWDHCS
LSKSVDGLVDAKLGTTTLTVSNLSFTQHQQFVLLFGAGDENIEDRGMLATVAF
NTFTDNVDQRMPCRHRHGFQVVNNNYDKWGSYAIGGSSAPTILSQGNRFCA
PDERSKKNVLGRHGEAAAESMKWNWRTNKDVLENGAIFVASGVDPVLTPE
QSAGMIPAEPGESALSLTSSAGVLSQCPGAPC

Sequências de cedro

493634 precursor de Cry j IB

MDSPCLVALIIVFSFVIGSCFSDNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFGS
STMGGKGGDLYTVTNSDDDPVNPPGTLYGATRDRPLWIFSGNMNIKLKM
PMYLAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNVIIHGLYLYGCSTSVLGNVL
INESFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLTSTGVTISN
NLFFNHHKVMSLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGLV
HVANNNYDPWTIYAIGGSSNPITLSEGNSTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSCS
NWWVQSTQDVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGNAATPHLTQNA
GVLTCSLSKRC

493632 precursor de Cry j IA

MDSPCLVALLVLSFVIGSCFSDNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFSGS
STMGGKGGDLYTVTNSDDDPVNPAPGTLRYGATRDRPLWIIFSGNMNIKLK
MPMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNVHGLHLYGCSTSVLGN
VLINESFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLSSSTGVTI
SNNLFFNHHKVMLLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCGQRMPRARYGL
VHVANNNYDPWTIYAIGGSSNPILSEGNSFTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSC
SNWVWQSTQIDVFYNGAYFVSSGKYEGGNIYTKKEAFNVENGNAIPQLTKN
AGVLTCSLSKRC

1076242 precursor de Cry j II - cedro japonês

MAMKLIAPMAFLAMQLIIMAAEDQSAQIMLDSVVEKYLRNRSRLRKVEHS
RHDAINIFNVEKYGAVGDGKHDCTEAFSTAWQAACKNPSAMLLVPGSKKFV
VNNLFFNGPCQPHFTFKVDGIIAAYQNPASWKNNRIWLQFAKLTGFTLMGKG
VIDGQGKQWWAGQCKWVNGREICNDRDRPTAIKFDFTGLIIQGLKLMNSPE
FHLVFGNCEGVKIIIGISITAPRDSNPNTDGIDIFASKNFHLQKNTIGTGDDCVAIG
TGSSNIVIEDLICGPGHIGISIGSLGRENSRAEVSYPHVNGAKFIDTQNGLRIKT
WQGGSGMASHIYENVEMINSENPIINQFYCTASACQNQRSASVQIQDVTYK
NIRGTSATAAAIQLKCSDSMPCKDIKLSDISLKLTSKGKIASCLNDNANGYFSGH
VIPACKNLSPSAKRKESKSHKHPKTVMVENMRAYDKGNRTRILLGSRPPNCT
NKCHGCSPCKAKLVIVHRIMPQEYYPQRWICSCHGKIYHP

1076241 proteína Cry j II - cedro japonês

MAMKFIAPMAFVAMQLIIMAAEDQSAQIMLDSIEQYLRNRSRLRKVEHSR
HDAINIFNVEKYGAVGDGKHDCTEAFSTAWQAACKKPSAMLLVPGNKKFV
VNNLFFNGPCQPHFTFKVDGIIAAYQNPASWKNNRIWLQFAKLTGFTLMGKG
VIDGQGKQWWAGQCKWVNGREICNDRDRPTAIKFDFTGLIIQGLKLMNSPE
FHLVFGNCEGVKIIIGISITAPRDSNPNTDGIDIFASKNFHLQKNTIGTGDDCVAIG
TGSSNIVIEDLICGPGHIGISIGSLGRENSRAEVSYPHVNGAKFIDTQNGLRIKT
WQGGSGMASHIYENVEMINSENPIINQFYCTASACQNQRSASVQIQDVTYK
NIRGTSATAAAIQLKCSDSMPCKDIKLSDISLKLTSKGKIASCLNDNANGYFSGH
VIPACKNLSPSAKRKESKSHKHPKTVMVKNMGAYDKGNRTRILLGSRPPNCT
NKCHGCSPCKAKLVIVHRIMPQEYYPQRWMCSRHGKIYHP

541803 precursor de Cry j I - cedro japonês

**MDSPCLVALLVLSFVIGSCFSDNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFGS
STMGGKGGDLTYVTNSDDDPVNPPGTLRYGATRDRPLWIFSGNMNIKLM
PMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNVIIHGLHLYGCSTSVLGNVL
INESFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLSSSTGVTISN
NLFFNHHKVMLLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCCQRMPRARYGLV
HVANNNDPWITIYAIGGSSNPITLSEGNSTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSCS
NWWVQSTQDVFYNGAYFVSSGKYEGGNITYTKKEAFNVENGNA TPQLTKNA
GVLTCSLSKRC**

541802 precursor de Cry j I - cedro japonês

**MDSPCLVALLVFSFVIGSCFSDNPIDSCWRGDSNWAQNRMKLADCAVGFGS
STMGGKGGDLTYVTNSDDDPVNPAPGTLRYGATRDRPLWIFSGNMNIKLM
MPMYIAGYKTFDGRGAQVYIGNGGPCVFIKRVSNVIIHGLYLYGCSTSVLGN
VLINESFGVEPVHPQDGDALTLRTATNIWIDHNSFSNSSDGLVDVTLTSTGVTI
SNNLFFNHHKVMSLGHDDAYSDDKSMKVTVAFNQFGPNCCQRMPRARYGL
VHVANNNDPWITIYAIGGSSNPITLSEGNSTAPNESYKKQVTIRIGCKTSSSC
SNWWVQSTQDVFYNGAYFVSSGKYEGGNITYTKKEAFNVENGNA TPHLTQN
AGVLTCSLSKRC**

Cão

Sequências Caninas:

Can f 1

**MKTLLLTIGFSLIAILQAQDTPAIGKDTVAVSGKWYLKAMTADQEVPEKPD
VTPMILKAQKGGNLEAKITMLTNGQCQNITVVI.HKTSEPGKYTAYEGQRVV
FIQPSPVRDHYILYCEGELIIGRQIRMAKLLGRDPEQSQEALDFREFSRAKGL
NQEILELAQSETCSPGGQ**

Fragmento de albumina sérica

EAYKSEIAHRYNDLGEEHFRGLVL

Fragmento de albumina sérica

LSSAKERFKCASLQKFGDRAFKAWSVARLSQRFPKADFAEISKVVTDLTKVH
KECCHGDLLECADDRADLAKYMCENQDSISTKLKECCDKPVLEKSQCLAEV
ERDELPGDLPSLAADFVEDKEVCKNYQEAKDVFLGTFLYEYSRRHPEYSVSL
LLRLAKEYEATLEKCCATDDPPTCYAKVLDEFKPLVDEPQNLVKTNCELFEK
LGEYGFQNALLVRYTKKAPQVSTPTLVVEVSRKLGKVGTKCCKKPESERMS
CADDFLS

Can f 2

MQLLLLTVGLALICGLQAQEGNHEEPQGGLEELSGRWHSVALASNKSDLKP
WGHFRVFIHMSAKDGNLHGDILIPQDGQCEKVS LTAFKTATSNKFDLEYWG
HNDLYLA EVDPKSYLILYMINQYNDDTSLVAHLMVRDLSRQQDFLPAFESVC
EDIGLHKDQIVVLSDDDRQCQSRD

Proteínas adicionais de alérgénios de cão (acesso ao Entrez do NCBI) :

1731859

Cavalo

Sequências de *Equus*:

1575778 Equ c1

MKLLLLCLCLILVCAQQEENS DVAIRNFDISKISGEWYSIFLASDVKEKIEFNG
SMRVTVDVIRALDNSSLYAEYQTKVNGECTEFPMVFDKTEEDGVYSLNYDG
YNVFRISFENDEHIILYLVNFDKDRPFQLFEFYAREPDVSPEIKEEFVKIVQKR
GIVKENIIDLT KIDRCFQLRGNGVAQA

3121755 Equ c 2

SQXPQSETDYSQLSGEWNTIYGAASNIXK

Euroglyphus (ácaro)

Sequências de *Euroglyphus*:

Eur m 1 (variante)

TYACSINSVSLPSELDLRSLRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVASTESAYLAYRN
MSLDLAEQELVDCASQNGCHGDTIPRGIEYIQQNGVVQEHYYPYVAREQSC
HRPNAQRYGLKNYCQISPPDSNKIRQALTQHTAVAVIIGIKDLNAFRHYDGR
TIMQHDNGYQPNYHAVNIVGYGNTQGVDYWIVRNSWDTTWGDNGYGYFA
ANINL

Eur m 1 (variante)

TYACSINSVSLPSELDLRSLRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVASTESAYLAYRN
MSLDLAEQELVDCASQNGCHGDTIPRGIEYIQQNGVVQEHYYPYVAREQSC
HRPNAQRYGLKNYCQISPPDSNKIRQALTQHTAVAVIIGIKDLNAFRHYDGR
TIMQHDNGYQPNYHAVNIVGYGNTQGVDYWIVRNSWDTTWGDNGYGYFA
ANINL

Eur m 1 (variante)

ETNACSINGNAPAEIDLQMRVTPTIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAY
RNQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQHNGVVQESYYRYVAREQS
CRRPNAQRFGISNYCQIYPPNANKIREALAQTHSAIAVIIGIKDLDAFRHYDGR
TIIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAA
NIDL

Eur m 1 (variante)

ETSACRINSVNPSELDLRSLRTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLAY
RNTSLDLSEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQQNGVVEERSYPYVAREQQ
CRRPNSQHYGISNYCQIYPPDVKQIREALTQHTAIAVIIGIKDLRAHQHYDGR
TIIQHDNGYQPNYHAVNIVGYGSTQGVDYWIVRNSWDTTWGDSGYGYFQA
GNNL

Sequências de *Poa* (relva)

113562 ALERGÉNIO DO PÓLEN POA P 9

MAVQKYTVLFLVALVVGPAASYAADLSYGAPATPAAPAAGYTPAAPAGA
APKATTDEQKMIEKINVGFKAAVAAAAGGVPAANKYKTFVATFGAASNKAFA
EALSTEPKGAAVDSSKAALTSKLDAAAYKLAYKSAEGATPEAKYDDYVATLS
EALRIIAGTLEVIIGVKPAAEEVKATPAGELQVIDKVDAAFKVAATAANAAPA
NDKFTVFEEAFNDAIKASTGGAYQSYKFIPALEAAVKQSYAATVATAPAVK
YTVFETALKKAITAMSQAQKAAPAAAATGTATAAVGAATGAATAAAGGY
KV

113561 POA P 9

MAVHQYTVLFLAVALVAGPAASYAADVGYGAPATLATPATPAAPAAGYT
PAAPAGAAPKATTDEQKLIKINAGFKAAVAAAAGVPAVDKYKTFVATFGT
ASNKAFAEALSTEPKGAAAASSNAVLTSKLDAAAYKLAYKSABGATPEAKYD
AYVATLSEALRIIAGTLEVIIAVKPAGEEVKAIPAGELQVIDKVDAAFKVAAT
AANAAPANDKFTVFEEAFNDAIKASTGGAYQSYKFIPALEAAVKQSYAATV
ATAPAVKYTVFETALKKAITAMSQAQKAAPAAVTATATGAVGAATGAV
GAATGAATAAAGGYKTGAATPTAGGYKV

113560 POA P 9

MDKANGAYKTALKAASAVAPAEKFPVFQATFDKNLKEGLSGPDAVGFAKK
LDAFIQTSYLSSTKAAEPKEKFDLFLVLSLFEVLRFMAGAVKAPPASKFPAKPAP
KVAAYTPAAPAGAAPKATTDEQKLIKINVGFKAAVAAAAGVPAASKYKTF
VATFGAASNKAFAEALSTEPKGAAVASSKAVLTSKLDAAAYKLAYKSAEGAT
PEAKYDAYVATLSEALRIIAGTLEVHGVKPAAEEVKAIIPAGELQVIDKVDAA
FKVAATAANAAPANDKFTVFEEAFNDAIKASTGGAYQSYKFIPALEAAVKQ
SYAATVATAPAVKYTVFETALKKAITAMSQAQKAAPAAVTGTATSAVG
AATGAATAAAGGYKV

Sequências de barata

2833325 Cr p1

MKTALVFAAVVAFVAARFPDHKDYKQLADKQFLAKQRDVLRLFHRVHQHN
 ILNDQVEVGIPMTSKQTSATTVPPSGEAVHGV LQEGHARPRGEPFSVNYEKH
 REQAIMLYDLLYFANDYDTFYKTACWARDRVNEGMMYSFSIAVFHRDDM
 QGVMLPPPYEVYPYLFVDHVDVIHMAQKYWMKNAGSGEHSHVIPVNFTLR
 TQDHLLAYFTSDVNLNAFNTYYRYYYPSWYNTTLYGHNIDRRGEQFYTYK
 QIYARYFLERLSNDLPDVYPFYYSKPVKSAYNPNLRYHNGEEMPVRPSNMY
 VTNFDLYYIADIKNYEKRVEDAIDFGYAFDEHMKPHSLYHDVHGMEYLADM
 IEGNMDSPNFYFYGSYHYHMYHSMIGHIVDPYHKMGLAPSLEHPETVLRDPVF
 YQLWKRVDHLFQKYKNRLPRYTHDELA FEGVKVENVDVGKLYTYFEQYD
 MSLDMAVYVNNVDQISNVDVQLAVRLNHKPFTYNI EVSSDKAQDVYVAVF
 LGPKYDYLGREYDLNDRRH YFVEMDRFPYHVGAGKTVIERNSHDSNIIAPER
 DSYRTFYKKVQEAYEGKSQYYVDKGHNYCGYPENLLIPKGKKGGQAYTFY
 VIVTPYVKQDEHDFEPYNYKAFSYCGVGSEKYPDNKPLGYPFDRKIYSNDF
 YTPNMYFKDVIIFFHKKYDEVG VQGH

2231297 Cr p2

INEIHSIIGLPPFVPPSRRHARRGVGINGLIDDVAILPVDELKALFQEKLETSPD
 FKALYDAIRSPEFQSIISTLNAMQRSEIHQNL RDKGVDVDHFIQLIRALFGLSR
 AARNLQDDLNDFLHSL EPI SPRHRHGLPRQRRRSARVSAYLHADDFHKIITIE
 ALPEFANFYNFLKEHGLDVVDYINEIHSIIGLPPFVPPSRRHARRGVGINGLIDD
 VAILPVDELKALFQEKLETSPDFKALYDAIRSPEFQSIISTLNAMPEYQELLQN
 LRDKGVVDVDHFIRVDQGTIRTLSSGQRNLQDDI LNDFTALIP TDQILAIAMDYL
 ANDAEVQELVAYLQSDDFHKIITIEALPEFANFYNFLKEHGLDVVDYINEIHS
 IIGLPPFVPPSQRHARRGVGINGLIDDVAILPVDELKALFQEKLETSPDFKALY
 DAIDLRSSRA

1703445 Bla g 2

MIGLKLVTVLFAVATITHAAELQRVPLYKLVHVFINTQYAGITKIGNQNFLT
 VFDSTSCNVVVASQECVGGACVCPNLQKYEKLKPKYISDGNVQVKFFDTGSA
 VGRGIEDSLTISNLTSQQDIVLADELSQEV CILSADV VVGIAAPGCPNALKGK
 TVLENFVEENLIAPVFSIHARFQDGEHFG EIIFFGGSDWKYVDGEFTYVPLVG
 DDSWKFRLDGVKIGDTTVAPAGTQAIDTSKAII VGP KAYVNPINEAIGCVVE
 KTTTTRICKLDCSKIPSLPDVTFVINGRNFNISSQYYIQQNGNLCYSGFQPCGH
 SDHFFIGDFFVDHY YSEFNWENKIMGFGRSVE
 SV

1705483 Bla g 4

AVLALCATDTLANEDCFRHSI.VPNI.DYERFRGSWIIAAGTSEALTQYKCWI
DRFSYDDALVSKYTDSQGKNRTTIRGR TKFEGNKFTIDYNDKGKAFSAPYSV
LAIDYENYAIVEGCPAAANGHVTVQIRFSVRRFHPKLGDKEMIQHYTELDQV
NQHKKAIEEDLKHFNLKYEDLHSTCH

2326190 Bla g 5

YKLTICPVKALGEPVIRFLSYGEKDFEDYRFQEGDWPNI.KPSMPFGKTPVLEI
DGKQTHQSVAISRYLGKQFGLSGKDDWENLEIDMIVDTISDFRAAIANYHYD
ADENSKQKKWDPLKKETIPYYTKKFDEVVKANGGYLAAGKLTWADFYFVA
ILDYLNHMAKEDI.VANQPNLKALREKVLGLPAIKAWVAKRPPTDL

Sequências adicionais de barata (números de acesso do NCBI):

2580504; 1580797; 1580794; 1362590; 544619; 544618; 15315104;
1580792; 1166573; 1176397; 21047849.

Sequências de alergénios (genéricas):

Números de acesso do NCBI

2739154; 3719257; 3703107; 3687326; 3643813; 3087805; 1864024;
1493836; 1480457; 25910476; 25910474; 1575778; 763532; 746485;
163827; 163823; 3080761; 163825; 3608493; 3581965; 2253610;
2231297; 21047849; 3409499; 3409498; 3409497; 3409496; 3409495;
3409494; 3409493; 3409492; 3409491; 3409490; 34094104; 3409488;
3409487; 3409486; 3409485; 3409484; 3409483; 3409482; 3409481;
3409480; 3409479; 3409478; 3409477; 3409476; 3409475; 3409474;
3409473; 3409472; 3409471; 3409470; 3409469; 3409468; 3409467;
3409466; 3409465; 3409464; 3409463; 3409462; 3409461; 3409460;
3409459; 3409458; 3409457; 3409456; 3318885; 3396070; 3367732;
1916805; 3337403; 2851457; 2851456; 1351295; 549187; 136467;
1173367; 2499810; 2498582; 2498581; 1346478; 1171009; 126608;
114091; 2506771; 1706660; 1169665; 1169531; 232086; 4161048;
114922; 2497701; 1703232; 1703233; 1703233; 1703232; 3287877;
3122132; 3182907; 3121758; 3121756; 3121755; 3121746; 3121745;
3319925; 3319923; 3319921; 3319651; 33187104; 3318779; 3309647;
3309047; 3309045; 3309043; 3309041; 3309039; 3288200; 3288068;
2924494; 3256212; 3256210; 3243234; 3210053; 3210052; 3210051;
3210050; 3210049; 3210048; 3210047; 3210046; 3210045; 3210044;
3210043; 3210042; 3210041; 3210040; 3210039; 3210038; 3210037;

3210036; 3210035; 3210034; 3210033; 3210032; 3210031; 3210030;
3210029; 3210028; 3210027; 3210026; 3210025; 3210024; 3210023;
3210022; 3210021; 3210020; 3210019; 3210018; 3210017; 3210016;
3210015; 3210014; 3210013; 3210012; 3210011; 3210010; 3210009;
3210008; 3210007; 3210006; 3210005; 3210004; 3210003; 3210002;
3210001; 3210000; 3209999; 3201547; 2781152; 2392605; 2392604;
2781014; 1942360; 2554672; 2392209; 3114481; 3114480; 2981657;
3183706; 3152922; 3135503; 3135501; 3135499; 3135497; 2414158;
1321733; 1321731; 1321728; 1321726; 1321724; 1321722; 1321720;
1321718; 1321716; 1321714; 1321712; 3095075; 3062795; 3062793;
3062791; 2266625; 2266623; 2182106; 3044216; 2154736; 3021324;
3004467; 3005841; 3005839; 3004485; 3004473; 3004471; 3004469;
3004465; 2440053; 1805730; 2970629; 29591048; 2935527; 2935416;
809536; 730091; 585279; 584968; 2498195; 2833325; 2498604;
2498317; 2498299; 2493414; 2498586; 2498585; 2498576; 2497749;
2493446; 2493445; 1513216; 729944; 2498099; 548449; 465054;
465053; 465052; 548671; 548670; 548660; 548658; 548657;
2832430; 232084; 2500822; 2498118; 2498119; 2498119; 2498118;
1708296; 1708793; 416607; 416608; 416608; 416607; 2499791;
2498580; 2498579; 2498578; 2498577; 2497750; 1705483; 1703445;
1709542; 1709545; 17105104; 1352699; 1346568; 1346323; 1346322;
2507248; 11352240; 1352239; 1352237; 1352229; 1351935; 1350779;
1346806; 1346804; 1346803; 1170095; 1168701; 1352506; 1171011;
1171008; 1171005; 1171004; 1171002; 1171001; 1168710; 1168709;
1168708; 1168707; 1168706; 1168705; 1168704; 1168703; 1168702;
1168696; 1168391; 1168390; 1168348; 1173075; 1173074; 1173071;
1169290; 11610470; 1168402; 729764; 729320; 729979; 729970;
729315; 730050; 730049; 730048; 549194; 549193; 549192; 549191;
549190; 5491104; 549188; 549185; 549184; 549183; 549182;
549181; 549180; 549179; 464471; 585290; 416731; 1169666;
113478; 113479; 113477; 113476; 113475; 130975; 119656; 113562;
113561; 113560; 416610; 126387; 126386; 126385; 132270; 416611;
416612; 416612; 416611; 730035; 127205; 1352238; 125887;
549186; 137395; 730036; 133174; 114090; 131112; 126949; 129293;
124757; 129501; 416636; 2801531; 2796177; 2796175; 2677826;
2735118; 2735116; 2735114; 2735112; 2735110; 2735108; 2735106;
2735104; 2735102; 2735100; 2735098; 2735096; 2707295; 2154730;
2154728; 1684720; 2580504; 2465137; 2465135; 2465133; 2465131;
2465129; 2465127; 2564228; 2564226; 2564224; 2564222; 2564220;
2051993; 1313972; 1313970; 1313968; 1313966; 2443824; 2488684;
2488683; 2488682; 2488681; 2488680; 2488679; 2488678; 2326190;
2464905; 2415702; 2415700; 2415698; 2398759; 2398757; 2353266;

2338288; 1167836; 414703; 2276458; 1684718; 2293571; 1580797;
1580794; 2245508; 2245060; 1261972; 2190552; 1881574; 511953;
1532058; 1532056; 1532054; 1359436; 666007; 487661; 217308;
1731859; 217306; 217304; 1545803; 1514943; 577696; 516728;
506858; 493634; 493632; 2154734; 2154732; 543659; 1086046;
1086045; 2147643; 2147642; 1086003; 1086002; 1086001; 543675;
543623; 543509; 543491; 1364099; 2147108; 2147107; 1364001;
1085628; 631913; 631912; 631911; 2147092; 477301; 543482;
345521; 542131; 542130; 542129; 100636; 2146809; 480443;
2114497; 2144915; 72355; 71728; 319828; 1082946; 1082945;
1082944; 539716; 539715; 423193; 423192; 423191; 423190;
1079187; 627190; 6271104; 627188; 627187; 482382; 1362656;
627186; 627185; 627182; 482381; 85299; 85298; 2133756; 2133755;
1079186; 627181; 321044; 321043; 112559; 112558; 1362590;
2133564; 1085122; 10710471; 627144; 627143; 627142; 627141;
280576; 102835; 102834; 102833; 102832; 84703; 84702; 84700;
84699; 84698; 84696; 477888; 477505; 102575; 102572; 478272;
2130094; 629813; 629812; 542172; 542168; 542167; 481432;
320620; 280414; 626029; 542132; 320615; 320614; 100638; 100637;
100635; 82449; 320611; 320610; 280409; 320607; 320606; 539051;
539050; 539049; 539048; 322803; 280407; 100501; 100498; 100497;
100496; 1362137; 1362136; 1362135; 1362134; 1362133; 1362132;
1362131; 1362130; 1362129; 1362128; 100478; 21291041; 1076531;
1362049; 1076486; 2129817; 2129816; 2129815; 2129814; 2129813;
2129812; 2129805; 2129804; 2129802; 2129801; 2129800; 2129799;
479902; 479901; 2129477; 1076247; 629480; 1076242; 1076241;
541803; 541802; 280372; 280371; 1361968; 1361967; 1361966;
1361965; 1361964; 1361963; 1361962; 1361961; 1361960; 1361959;
320546; 2119763; 543622; 541804; 478825; 478824; 478823;
421788; 320545; 81444; 626037; 626028; 539056; 483123; 481398;
481397; 100733; 100732; 100639; 625532; 1083651; 322674;
322673; 81719; 81718; 2118430; 2118429; 2118428; 2118427;
419801; 419800; 419799; 419798; 282991; 100691; 322995; 322994;
101824; 626077; 414553; 398830; 1311457; 1916292; 1911819;
1911818; 1911659; 1911582; 467629; 467627; 467619; 467617;
915347; 1871507; 1322185; 1322183; 1047645; 1047647; 1850544;
1850542; 1850540; 2810417; 452742; 1842045; 1839305; 1836011;
1836010; 1829900; 18291049; 18291048; 18291047; 18291046;
18291045; 18291044; 1825459; 18010487; 159653; 1773369;
1769849; 1769847; 608690; 1040877; 1040875; 1438761; 1311513;
1311512; 1311511; 1311510; 1311509; 13116104; 1246120; 1246119;
1246118; 1246117; 1246116; 1478293; 1478292; 1311642; 1174278;

1174276; 1086972; 1086974; 1086976; 1086978; 1086978; 1086976;
1086974; 1086972; 999009; 999356; 999355; 994866; 994865;
913758; 913757; 913756; 913285; 913283; 926885; 807138; 632782;
601807; 546852; 633938; 544619; 544618; 453094; 451275; 451274;
407610; 407609; 404371; 409328; 299551; 299550; 264742; 261407;
255657; 250902; 250525; 1613674; 1613673; 1613672; 1613671;
1613670; 1613304; 1613303; 1613302; 1613240; 1613239; 1613238;
1612181; 1612180; 1612179; 1612178; 1612177; 1612176; 1612175;
1612174; 1612173; 1612172; 1612171; 1612170; 1612169; 1612168;
1612167; 1612166; 1612165; 1612164; 1612163; 1612162; 1612161;
1612160; 1612159; 1612158; 1612157; 1612156; 1612155; 1612154;
1612153; 1612152; 1612151; 1612150; 1612149; 1612148; 1612147;
1612146; 1612145; 1612144; 1612143; 1612142; 1612141; 1612140;
1612139; 1093120; 447712; 447711; 447710; 1587177; 158542;
1582223; 1582222; 15315104; 1580792; 886215; 15451047;
15451045; 15451043; 15451041; 15458104; 1545887; 1545885;
1545883; 1545881; 1545879; 1545877; 1545875; 166486; 1498496;
1460058; 972513; 1009442; 1009440; 1009438; 1009436; 1009434;
7413; 1421808; 551228; 452606; 32905; 1377859; 1364213;
1364212; 395407; 22690; 22688; 22686; 22684; 488605; 17680;
1052817; 1008445; 1008443; 992612; 706811; 886683; 747852;
939932; 19003; 1247377; 1247375; 1247373; 862307; 312284;
999462; 999460; 999458; 587450; 763064; 886209; 1176397;
1173557; 902012; 997915; 997914; 997913; 997912; 997911;
997910; 99790; 997908; 997907; 997906; 997905; 997904; 997903;
997902; 997901; 997900; 9971049; 9971048; 9971047; 9971046;
9971045; 9971044; 9971043; 9971042; 910984; 910983; 910982;
910981; 511604; 169631; 169629; 169627; 168316; 168314; 607633;
555616; 293902; 485371; 455288; 166447; 166445; 166443; 166435;
162551; 160780; 552080; 156719; 156715; 515957; 515956; 515955;
515954; 515953; 459163; 166953; 386678; 169865.

Os alergénios/antigénios particularmente preferidos incluem: proteína de pelo de gato Fel d1; proteínas dos ácaros do pó doméstico Der P1, Der P2 e Der P7; proteína de ambrósia amb a 1.1, a 1.2, a 1.3 ou a 1.4; proteínas de azevém lol p1 e lol p5; proteínas da fléolo phl p1 e phl p5; proteína da relva das Bermudas Cyn d 5; proteínas alternativas de *Alternaria* Alt a1, Alt a 2 e Enolase (Alta 6); proteína do vidoeiro Bet v1 e P14; proteínas da barata alemã Bla g 1, Bla g 2, Bla g 3, Bla g 4, Bla g 5 e Bla g 6; proteína da artemísia Art v 1; proteína do cardo-da-Rússia Sal k 1 e Sal k 2; amendoim Ara h1, Ara h2,

Ara h3, Ara h4, Ara h5, Ara h6, proteínas de transferência de lípidos ou profilinas de plantas ou um antigénio leucocitário humano.

Métodos de entrega

Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser entregues a um indivíduo *in vivo* usando uma variedade de vias e técnicas conhecidas. Por exemplo, uma composição pode ser proporcionada sob a forma de uma solução, suspensão ou emulsão injetáveis e ser administrada por injeção parentérica, subcutânea, epidérmica, intradérmica, intramuscular, intra-arterial, intraperitoneal, intravenosa, usando uma agulha e seringa convencionais ou usando um sistema de injeção de jacto líquido. As composições também podem ser administradas topicamente na pele ou tecido mucoso, tal como por via nasal, intratraqueal, intestinal, retal ou vaginal, ou proporcionadas sob a forma de um *spray* finamente dividido adequado para administração respiratória ou pulmonar. Outros modos de administração incluem a administração oral, supositórios, administração sublingual e técnicas de entrega transdérmica ativa ou passiva.

Quando se pretende administrar um péptido da invenção, prefere-se administrar o péptido num local no corpo onde este terá a possibilidade de entrar em contacto com células apresentadoras de antigénio adequadas, e onde tenha a oportunidade de entrar em contactar com células T do indivíduo. Quando se pretende administrar uma APC, prefere-se administrar a APC num local do corpo onde esta terá a possibilidade de entrar em contacto e ativar as células T adequados do indivíduo.

Regimes de entrega

A administração dos péptidos/polinucleótidos/células (como a composição que contém uma pluralidade de péptidos) pode ser através de qualquer método adequado, conforme descrito acima. As quantidades adequadas do péptido podem ser determinadas empiricamente, mas tipicamente estão na gama indicada adiante. Uma única administração de cada péptido pode ser suficiente para ter um efeito benéfico para o paciente, mas deve ser considerado que poderá ser benéfico se o péptido for administrado mais do que uma vez, caso em que os regimes de administração típicos podem ser, por exemplo, uma ou duas vezes por semana durante 2-4 semanas a cada 6 meses ou uma vez por

dia durante uma semana a cada quatro a seis meses. Notar-se-á que cada péptido ou polinucleótido, ou combinação de péptidos e/ou de polinucleótidos, pode ser administrado a um paciente individualmente ou em combinação.

As dosagens para administração dependerão de vários fatores incluindo a natureza da composição, a via de administração e o esquema e o horário do regime de administração. As doses adequadas de uma molécula aqui descrita podem ser da ordem de até 15 g, até 20 g, até 25 g, até 30 g, até 50 g, até 100 g, até 500 g ou mais, por administração. As doses adequadas podem ser inferiores a 15 g, mas pelo menos 1 ng, ou pelo menos 2 ng ou pelo menos 5 ng ou pelo menos 50 ng ou pelo menos 100 ng ou pelo menos 500 ng ou pelo menos 1 g ou pelo menos 10 g. Para algumas moléculas aqui descritas, a dose utilizada pode ser superior, por exemplo, até 1 mg, até 2 mg, até 3 mg, até 4 mg, até 5 mg ou superior. Estas doses podem ser proporcionadas numa formulação líquida, numa concentração adequada para permitir um volume apropriado para administração pela via selecionada.

Kits

A presente divulgação também se refere a uma combinação de componentes aqui descritos adequados para utilização num tratamento da invenção que estão embalados sob a forma de um *kit* num recipiente. Estes *kits* podem compreender uma série de componentes para permitir um tratamento da invenção. Por exemplo, um *kit* pode compreender um ou mais diferentes péptidos, polinucleótidos e/ou células aqui descritos, ou um ou mais péptidos, polinucleótidos ou células aqui descritos e um ou mais agentes terapêuticos adicionais adequados para administração simultânea, ou para administração sequencial ou separada. O *kit* pode conter opcionalmente outro(s) reagente(s) adequado(s), ou instruções ou similares.

A invenção é ilustrada pelos exemplos que se seguem.

Exemplo 1

Pesquisa da ligação ao MHC de Classe II

O objetivo deste estudo é identificar um painel distinto de péptidos com fortes afinidades para com os sete alótipos mais comuns do MHC de Classe II humano HLA-DRB 1* (abrangendo

no total cerca de 63% dos alótipos encontrados na população caucasiana média). Para identificar péptidos de ligação nos alérgenos dos ácaros do pó doméstico (HDM), Der p 1, Der p 2 e Der p 7, foram realizados ensaios de ligação *in vitro* com um subconjunto de péptidos dessas proteínas alergénicas. Os péptidos a testar nos ensaios de ligação foram inicialmente identificados através de uma abordagem *in silico* conhecida como "*peptide threading*" (realizada por Biovation, Ltd., Aberdeen, Escócia, RU). Trata-se de uma análise bioinformática de péptidos consecutivos de uma sequência quanto ao potencial para serem acomodados dentro da fenda de ligação de moléculas de HLA-DR do MHC de classe II. Este subconjunto de péptidos foi pré-rastreado quanto à solubilidade num meio aquoso e ácido e foi selecionado um painel final de 44 péptidos para teste num ensaio de ligação ao MHC de classe II, *in vitro*.

Métodos

O ensaio empregue é um ensaio de ligação competitiva ao MHC de classe II, onde cada péptido é analisado quanto à sua capacidade de deslocar um ligante de controlo conhecido de cada um dos alótipos do MHC de classe II humanos investigados. Os alótipos e os péptidos de controlo utilizados neste estudo são mostrados na Tabela 2:

Tabela 2. Péptidos de Controlo utilizados nos ensaios de ligação *in vitro*

Alótipo	Péptido de controlo	Sequência
DRB1*0101	Hemaglutinina de <i>Influenza</i> 307-319	PKYVKQNTLKLAT
DRB1*0301	<i>Myco. tuberculosis/leprae hsp</i> 65 2-16	AKTIAYDEEARRGLE
DRB1*0401	Hemaglutinina de <i>Influenza</i> 307-319	PKYVKQNTLKLAT
DRB1*0701	Hemaglutinina de <i>Influenza</i> 307-319	PKYVKQNTLKLAT
DRB1*1101	Hemaglutinina de <i>Influenza</i> 307-319	PKYVKQNTLKLAT
DRB1*1301	HLA-DQB1*0603 21-36	TERVRLVTRHIYNREE
DRB1*1501	Proteína básica de mielina humana 85-99	ENPVVHFFKNIIVTPR
DQB1*0602	Insulina Humana B 1-15	FVNQHLCGSHLVEAL

Cada um dos 44 péptidos de HDM (que são mostrados nas Tabelas 3A e 3B) foram analisados no ensaio de competição e rastreados quanto a ligação relativa comparativamente com o péptido de controlo. Devido à natureza do ensaio competitivo, os dados para cada péptido são representados como uma razão

entre a sua própria IC_{50} e a do péptido de controlo. Assim, um péptido que tem um valor de IC_{50} que tem paridade com o péptido de controlo tem uma afinidade de ligação idêntica, enquanto péptidos com uma razão inferior a um têm uma afinidade mais elevada e aqueles com uma razão maior que um têm uma afinidade mais baixa.

Resultados

A solubilidade em solução aquosa é um critério essencial para um péptido ser um agente terapêutico eficaz. Assim, em consequência do rastreio à solubilidade, eliminaremos péptidos muito hidrófobos com uma alta frequência de grandes resíduos de aminoácido hidrófobos em múltiplos registos de ligação. Esta é uma característica de ligantes promíscuos HLA-DRB1*. Os dados dos ensaios de ligação são mostrados na Tabela 3B. A ligação relativa de cada péptido é mostrada para cada um dos alótipos no estudo. Os dados mostram que 24 dos 44 péptidos testados se ligam a um ou mais dos alótipos do MHC de classe II. É observada uma gama de reações cruzadas com 5 péptidos a ligar-se apenas a um alótipo, 8 péptidos a ligar-se a dois, 9 péptidos a ligar-se a três e dois péptidos a ligar-se a quatro alótipos diferentes do MHC de classe II (vermelho). É também esperado que tais péptidos tenham a capacidade de ligar alótipos similares que não foram testados através da homologia das estruturas do MHC. Isto pode ser observado na reatividade cruzada de péptidos para DRB1 *0101, *0401, *0701 e *1101 em vários casos aqui. É também mostrado o estado de solubilidade do péptido nas maiores concentrações na solução aquosa do ensaio de ligação. O valor ilustra a mais baixa concentração à qual é observado um precipitado branco insolúvel. Parece não existir qualquer efeito inespecífico significativo da formação do precipitado nos ensaios. Vários péptidos que precipitam em concentrações elevadas também se ligam ao MHC de classe II; contudo, vários demonstram também ausência de capacidade para competir com os péptidos de controlo. É expectável que péptidos passíveis de formar precipitados possam exibir elevada afinidade e ligação promíscua devido à presença de muitos resíduos hidrófobos.

A % de pureza dos péptidos está indicada na Tabela 3A. Esta é significativa porque foi observado que as purezas variavam de 60-90%. Isto terá um efeito considerável na capacidade de um péptido para competir se este for relativamente impuro. Por

exemplo, o HDM23A e o HDM32 apresentam baixa afinidade de ligação; contudo, eles têm uma pureza reduzida (66,7% e 68,7%, respetivamente) comparativamente com outros péptidos de HDM. Portanto, se a pureza for tomada em consideração, eles podem ter, de facto, uma afinidade equivalente a um péptido de maior pureza.

Pode ser observado que alguns alótipos do MHC de classe II se ligam a mais péptidos do que outros; isto é expectável provavelmente porque existe uma variabilidade entre as posições das bolsas nas diferentes fendas de ligação do MHC de classe II. No entanto existem também várias diferenças bem caracterizadas entre as afinidades dos vários péptidos de controlo. Claramente, um péptido de controlo com alta afinidade será mais difícil de deslocar pelo péptido de HDM competidor, resultando na identificação de menos péptidos de ligação. Isto pode ser ilustrado pelos dados aqui apresentados. Por exemplo, o péptido de controlo, hemaglutinina de *Influenza* 307-319, tem uma afinidade variável consoante o alótipo, onde DRB1*0101 > *0401 > *0701 > *1101. Isto reflete-se no número de ligantes a cada um dos alótipos, onde DRB1*0101 tem o número mais baixo de ligantes (5) e DRB1*1101 tem o mais alto (14). Além disso, o ensaio de ligação para DRB1*1501 é muito rigoroso devido à alta afinidade de Proteína básica de miélina 85-99 para com este alótipo. No rastreio de elevado rigor, o péptido Fel d 1 EQVAQYKALPVVLENA, que foi testado num estudo anterior, originou uma razão de 0,97 indicando que com este nível de rigor podem ser identificados ligantes de alta afinidade.

Adicionalmente, para identificar ligantes de menor afinidade, o ensaio foi também realizado sob condições menos rigorosas. Todos os péptidos de ligação a Der p mostraram ter uma razão elevada quando testados contra este alótipo, mostrando que eram ligantes de baixa afinidade comparativamente com o péptido de controlo. O ensaio de ligação DQA1*0102/DQB1*0602 utiliza um péptido da cadeia B de insulina humana que tem menor afinidade comparativamente com os utilizados nos ensaios de DR. Isto estipula que o ensaio de DQ é muito sensível e tende a produzir valores de razões muito baixos para os ligantes mais fortes a este alótipo do MHC de classe II. Esta sensibilidade também explica o número relativamente elevado de péptidos de ligação DQ no painel selecionado. Finalmente, numa análise mais detalhada, verificou-se que os péptidos identificados como

ligantes para a superfamília de DRB1*0101, *0401, *0701, incorporam um motivo que é característico de ligantes promíscuos a esta família de alótipos onde: P1 = Y, F, W, L, I, V ou M (resíduos hidrófobos ou aromáticos grandes), P6 = S, T, C, A, P, V, I, M (resíduos pequenos, não carregados). Dos 16 péptidos (e.g. HDM 21B RGKPFQLEAVFEANQNT) identificados como ligantes a todos ou a uma combinação destes 3 alótipos, 14 (87,5%) contêm este motivo, o que sugere que estes são ligantes promíscuos com uma gama de afinidades para com os alótipos 1-4-7.

Conclusões

Mostrou-se que uma gama de péptidos têm a capacidade de ligar os alótipos do MHC de classe II testados e podem ser testados quanto à sua capacidade de estimular a proliferação *in vitro* de células T CD4+ e de estimular a secreção de citóquinas por células T.

Tabela 3A

Péptido	Sequência	Resíduos na progenitora	% de pureza	Teste de solubilidade	Precipitação no ensaio
HDM01	IDLRQMETVTPI R	112-124	79,2	SIM	Nenhuma
HDM02	RTVTPIRMQGGC G	118-130	79,6	SIM	Nenhuma
HDM03C	RNQSLLDLAEQEL VDCASQH	149-167	60,1	SIM	Nenhuma
HDM05	EYIQHNGVWQES Y	179-191	77,5	SIM	Nenhuma
HDM06	RYVAREQSCRRP N	193-205	79,7	SIM	Nenhuma
HDM07	PNVNKIREALAQ T	220-232	88,6	SIM	Nenhuma
HDM08	NKIREALAQTHS A	223-235	87,6	SIM	Nenhuma
HDM09A	REALAQTHSAIA VI	226-239	69,6	SIM	1000µM (2,9mg/ml)
HDM11	IGIKQLDAFREY D	240-252	77,6	SIM	Nenhuma
HDM12	KDLDAFRHYDGR T	243-255	72,9	SIM	Nenhuma
HDM13	RTIIQRDNGYQP NY	254-267	70,7	NÃO	Nenhuma
HDM16A	RNSWDTNWGDNG YG	287-300	70,00	SIM	Nenhuma
HDM17	NSVNVPSSEDLR SLRT	105-120	74,5	SIM	Nenhuma
HDM19	DQVDVKDCANEE IKK	18-32	81,4	SIM	Nenhuma
HDM20	CIITHRGKPFQLE A	44-56	77,4	SIM	Nenhuma

Péptido	Sequência	Resíduos na progenitora	% de pureza	Teste de solubilidade	Precipitação no ensaio
HDM21	KPFQLEAVFEANQNT	50-64	88,7	SIM	200µM (0,3mg/ml)
HDM21A	KPFQLEAVFEANQNTK	50-65	90,10	SIM	5000µM (9,3mg/ml)
HDM21B	RGKPPQLEAVFEANQNT	48-64	82,60	SIM	1000µM (1,98mg/ml)
HDM22A	EAVFEANQNTKTAK	55-68	90,30	SIM	Nenhuma
HDM23A	DGLEVDVPGIDPNACH	76-88	66,7	SIM	Nenhuma
HDM26A	DGVLACAIATHAKIR	131-145			1000µM (1,5mg/ml)
HDM27	AKIEIKASLDGLE	67-79	65,9	SIM	1000µM (1,4mg/ml)
HDM28	KAVDRAVAALIEKS	31-43	86,8	SIM	1000µM (1,3mg/ml)
HDM29	ETFDPMKVPDHS	44-56	84,7	SIM	Nenhuma
HDM29A	ETFDPMKVPDHS	44-57	91,7	SIM	Nenhuma
HDM29B	KSETFDPMKVPD	42-56	92,5	SIM	1000µM (1,7mg/ml)
HDM30	DKFERHIGIIDLK	56-68	81,4	SIM	5000µM (7,9mg/ml)
HDM31	IGIIDLKGELDMRN	62-75			1000µM (1,8mg/ml)
HDM31A	HIGIIDLKGELDMRN	61-75	66,40	SIM	1000µM (1,7mg/ml)
HDM32	IDLKGELDMRNIQ	65-77	68,7	SIM	5000µM (7,7mg/ml)
HDM32A	IDLKGELDMRNIQVR	65-79	85,20	SIM	5000µM (9,0mg/ml)
HDM33	LDMRNIQVRGLKQ	71-83	70,3	SIM	Nenhuma
HDM34	RNIQVRGLKQMKRVG	74-88	74,7	SIM	Nenhuma
HDM35	RGLKQMKRVGLEA	79-91	84,00	SIM	Nenhuma
HDM36	KRVGDANVKSE	85-97	82,9	SIM	Nenhuma
HDM37	ANVKSE	90-102	76,5	SIM	Nenhuma
HDM39	DDVVSMEYDLAYK	109-121	84,9	NÃO*	Nenhuma
HDM39A	HDDVVSMEYDLAYKL	108-121	80,9	SIM	1000µM (1,8mg/ml)

Péptido	Sequência	Resíduos na progenitora	% de pureza	Teste de solubilidade	Precipitação no ensaio
HDM40A	VSMEYDLAYKLG DLH	112-124	66,9	SIM	1000µM (1,8mg/ml)
HDM48	TAIFQDTVRAEM TK	187-200	79,1	SIM	1000µM (1,6mg/ml)
HDM49	DTVRAEMTKVLA P	192-204	69,5	SIM	Nenhuma
HDM50	KVLAPAFKKELE R	200-212	90,8	SIM	Nenhuma
HDM51	VDFKGEIAMRN E	65-77	79,8	SIM	1000µM (1,5mg/ml)
HDM51A	VDFKGEIAMRN EAR	65-79	82,1	SIM	Nenhuma

Tabela 3B

Péptido	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB 1*0701	DRB1*1101	DRB1*1301	DRB1*1501	DQA1*0102 DQB1*0602
HDM01		19,23		16				
HDM02							80	0,03
HDM03C								0,16
HDM05								
HDM06					30,36			0,86
HDM07								
HDM08								
HDM09A				0,49	21,15		200	
HDM11								
HDM12								
HDM13								
HDM16A								
HDM17								
HDM19								
HDM20				1,1	28		242,11	2,37
HDM21	92		11,15		11,73			
HDM21A	200		52,17		10,27			
HDM21B	13,5		0,78		4,1			
HDM22A			328,6		80			
HDM23A		347						0,76
HDM26A	42,3			16,28				0,61
HDM27								
HDM28								
HDM29								
HDM29A								
HDM29B								

Péptido	DRB1*0101	DRB1*0301	DRB1*0401	DRB 1*0701	DRB1*1101	DRB1*1301	DRB1*1501	DQA1*0102 DQB1*0602
HDM30				6,2				
HDM31								
HDM31A								
HDM32A								
HDM33				46,51	41,5	263,16		
HDM34					3,38	3,7	769,23	
HDM35					1,26			
HDM36								
HDM37								
HDM39								
HDM39A			76,19	0,71				0,1
HDM40A				2,29	6			
HDM48		211,26		15,71	13,57			
HDM49							671,43	1,7
HDM50								
HDM51				20,93	30,91			

Exemplo 2

Pesquisa de homologia

As sequências de cada um dos 24 péptidos acima identificados como de ligação ao MHC de classe II foram utilizadas para sondar a sequência da proteína alternativa no grupo dos alergénios dos ácaros do pó do qual a sequência progenitora deriva. Por exemplo, o péptido HDM01 na Tabela 3A é de Der p 1, portanto a sequência de HDM01 foi utilizada para sondar uma sequência homóloga em Der f 1. A mesma prática foi aplicada para todos os 24 péptidos acima identificados. Os péptidos identificados no Exemplo 1 e no Exemplo 2 são mostrados nas Tabelas 4 a 6.

Tabela 4

Péptido na Tabela 3A/B	Molécula progenitora	Sequência	Resíduos na progenitora	SEQ ID NO:
HDM01	<i>Der p 1</i>	IDLRQMRTVTPIR	112-124	1
	<i>Der f 1</i>	LDLRSLRTVTPIR	113-125	25
HDM02	<i>Der p 1</i>	RTVTPIRMQGGCG	118-130	2
	<i>Der f 1</i>	RTVTPIRMQGGCG	119-131	26

Péptido na Tabela 3A/B	Molécula progenitora	Sequência	Resíduos na progenitora	SEQ ID NO:
HDM03C	<i>Der p 1</i>	RNQSLDLAEQELVDCASQH	149-167	3
	<i>Der f 1</i>	RNTSLDLSEQELVDCASQH	150-168	27
HDM06	<i>Der p 1</i>	RYVAREQSCRRPN	193-205	4
	<i>Der f 1</i>	PYVAREQRCRRPN	194-206	28
HDM09A	<i>Der p 1</i>	REALAQTHSAIAVI	226-239	5
	<i>Der f 1</i>	REALTQTHTAIAVI	227-240	29

Tabela 5

Péptido na Tabela 3A/B	Molécula progenitora	Sequência	Resíduos na progenitora	SEQ ID NO:
HDM19	<i>Der p 2</i>	DQVDVKDCANHEIKK	18-32	6
	<i>Der f 2</i>	DQVDVKDCANNEIKK	18-32	30
HDM20	<i>Der p 2</i>	CIIHRGKPFQLEA	44-56	7
	<i>Der f 2</i>	CIIHRGKPFQLEA	44-56	31
HDM21	<i>Der p 2</i>	KPFQLEAVFEANQNT	50-64	8
	<i>Der f 2</i>	KPFTLEALFDANQNT	50-64	32
HDM21A	<i>Der p 2</i>	KPFQLEAVFEANQNTK	50-65	9
	<i>Der f 2</i>	KPFTLEALFDANQNTK	50-65	33
HDM21B	<i>Der p 2</i>	RGKPFQLEAVFEANQNT	48-64	10
	<i>Der f 2</i>	RGKPFTLEALFDANQNT	48-64	34
HDM22A	<i>Der p 2</i>	EAVFEANQNTKTAK	55-68	11
	<i>Der f 2</i>	EALFDANQNTKTAK	55-68	35
HDM23A	<i>Der p 2</i>	DGLEVDVPGIDPNACH	76-88	12
	<i>Der f 2</i>	DGLEIDVPGIDTNACH	76-88	36

Péptido na Tabela 3A/B	Molécula progenitora	Sequência	Resíduos na progenitora	SEQ ID NO:
HDM26A	<i>Der p 2</i>	DGVLACAIATHAKIR	131-145	13
	<i>Der f 2</i>	NGVLACAIATHGKIR	131-145	37

Tabela 6

Péptido na Tabela 3A/B	Molécula progenitora	Sequência	Resíduos na progenitora	SEQ ID NO:
HDM30	<i>Der p 7</i>	DKFERHIGIIDLK	56-68	14
	<i>Der f 7</i>	DKFERHVGIVDFK	56-68	38
HDM32	<i>Der p 7</i>	IDLKGELDMRNIQ	65-77	15
	<i>Der f 7</i>	VDFKGELAMRNIE	65-77	39
HDM33	<i>Der p 7</i>	LDMRNIQVRGLKQ	71-83	16
	<i>Der f 7</i>	LAMRNIEARGLKQ	71-83	40
HDM34	<i>Der p 7</i>	RNIQVRGLKQMKRVG	74-88	17
	<i>Der f 7</i>	RNIEARGLKQMKRQG	74-88	41
HDM35	<i>Der p 7</i>	RGLKQMKRVGDAN	79-91	18
	<i>Der f 7</i>	RGLKQMKRQGDAN	79-91	42
HDM39A	<i>Der p 7</i>	HDDVVSMEYDLAYKL	108-122	19
	<i>Der f 7</i>	HDDIVSMEYDLAYKL	108-122	43
HDM40A	<i>Der p 7</i>	VSMEYDLAYKLGDLH	112-126	20
	<i>Der f 7</i>	VSMEYDLAYKLGDLH	112-126	44
HDM48	<i>Der p 7</i>	TAIFQDTVRAEMTK	187-200	21
	<i>Der f 7</i>	TAIFQDTRKEMTK	187-200	45
HDM49	<i>Der p 7</i>	DTVRAEMTKVLAP	192-204	22
	<i>Der f 7</i>	DTVRKEMTKVLAP	192-204	46

Péptido na Tabela 3A/B	Molécula progenitora	Sequência	Resíduos na progenitora	SEQ ID NO:
HDM51	<i>Der f 7</i>	VDFKGE L AMRNIE	65-77	23
	<i>Der p 7</i>	ID L KGE L DMRNIQ	65-77	15
HDM51A	<i>Der f 7</i>	VDFKGE L AMRNIEAR	65-79	24
	<i>Der p 7</i>	ID L KGE L DMRNIQVR	65-79	47

Na Tabela 4, a sequência de Der p 1 da qual são derivadas as posições dos "resíduos na progenitora" está disponível ao público com o n.º de Acesso no NCBI P08176. As sequências correspondentes para Der p 2 (Tabela 5) e Der p 7 (Tabela 6) têm os n.º de acesso no NCBI P49278 e P49273, respetivamente. A sequência para Der f 1 é tomada do n.º de acesso no NCBI P16311, para Der f 2 do n.º de acesso no NCBI Q00855 e para Der f 7 do n.º de acesso no NCBI Q26456.

Exemplo 3

Pesquisa da ligação ao MHC de classe II

O objetivo deste estudo é identificar um painel distinto de péptidos com fortes afinidades para com os sete alótipos humanos mais comuns HLA-DRB1* do MHC de classe II (abrangendo no total cerca de 63% dos alótipos encontrados na população caucasiana média). De forma a identificar péptidos de ligação nos principais alergénios dos ácaros do pó doméstico Der p 1, Der p 2 e Der p 7, foram identificados péptidos através de uma abordagem *in silico* conhecida como "*peptide threading*" que utiliza o algoritmo EpiMatrix disponível comercialmente (EpiVax Inc.). Trata-se de uma análise bioinformática de péptidos a partir de uma sequência quanto ao potencial para serem acomodados dentro da fenda de ligação de moléculas de HLA-DR do MHC de classe II. O EpiMatrix é um algoritmo baseado em matrizes que classifica segmentos com 10 aminoácidos de comprimento, que se sobrepõem em 9 aminoácidos, de qualquer sequência polipeptídica, através da probabilidade estimada de ligação a cada uma das moléculas do MHC selecionadas. (De Groot *et al.*, *AIDS Research and Human Retroviruses* 13:539-41 (1997)). O procedimento para o desenvolvimento dos motivos da matriz foi publicado por Schafer *et al.*, *Vaccine* 16:1998 (1998). Neste exemplo, é avaliado o potencial de ligação para HLA DR1, DR2,

DR3, DR4, DR7, DR8, DR11, DR13 e DR15. Ligandos putativos do MHC são selecionados pontuando cada trecho 10-mero numa sequência de proteína. Esta pontuação é derivada através da comparação da sequência do 10-mero com a matriz de sequências de 10 aminoácidos que se sabe ligarem-se a cada alelo do MHC. Estudos retrospectivos demonstraram que o EpiMatrix prevê com exatidão os ligandos publicados do MHC (Jesdale et al., em *Vaccines '97* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1997)). Foi também confirmada uma previsão bem sucedida de péptidos que se ligam a múltiplas moléculas do MHC.

A probabilidade estimada de ligação a uma molécula do MHC selecionada é calculada através do EpiMatrix, como se segue. Os péptidos são pontuados estimando a promoção ou inibição relativas de ligação para cada aminoácido, comparativamente com os ligantes conhecidos do MHC para um determinado alelo do MHC. Esta informação é somada ao longo do péptido e é atribuída uma pontuação de resumo (pontuação EMX) ao péptido inteiro. Depois de comparar a pontuação EMX com as pontuações dos ligandos conhecidos do MHC, o EpiMatrix chega a uma "probabilidade estimada de ligação" (abreviada como EBP, mas não estritamente uma probabilidade). A EBP descreve a proporção de péptidos com pontuação no EpiMatrix tão elevadas ou mais elevadas que se irão ligar a uma determinada molécula do MHC. As EBP variam de 100% (muito alta probabilidade de ligação) a menos de 1% (muito baixa probabilidade de ligação).

As análises no EpiMatrix foram realizadas na sequência inteira de Der p 1 como publicada na base de dados do NCBI (N.º de acesso P08176). Esta análise identificou péptidos nucleares (e as suas sequências flanqueadoras) derivados das sequências anteriores que se prevê terem uma boa ligação ao MHC de classe II. Estas sequências são mostradas abaixo na Tabela 7A. As Tabelas 7B e 7C mostram as sequências para as análises equivalentes de sequências conhecidas de Der p 2 e de Der p 7, respetivamente (N.º de acesso no NCBI P49278 e P49273).

Nas Tabelas 7A-C: "resíduos na sequência" dá a localização do péptido dentro das sequências que foram analisadas. O péptido nuclear (aminoácidos do meio em **negrito**) define a sequência de ligação que foi, de facto, identificada durante a análise. Os flancos de estabilização (N-terminal e C-terminal, não estão em **negrito**) foram incluídos para utilização com a sequência nuclear

e são tipicamente necessários para ajudar no fabrico dos péptidos. O "número de acertos" refere-se ao número de afinidades de ligação elevada previstas para todos os tipos de MHC testados na sequência. A "pontuação do grupo EpiMatrix" é derivada do número de acertos normalizado para a dimensão do grupo. A pontuação do grupo é assim o excesso ou o défice nas propriedades de ligação ao MHC agregado previstas relativamente a um péptido padrão aleatório. Considera-se que uma pontuação de 10 ou superior indica propriedades amplas de ligação ao MHC. O EpiVax também analisou a hidrofobicidade dos péptidos que contêm epítomos. Consideram-se inadequadas para administração e/ou fabrico, pontuações superiores a 1.

TABELA 7A - Der p 1

SEQUÊNCIA DE ENTRADA (NCBI n.º)	RESÍDUOS NA SEQUÊNCIA (Incl. FLANCOS)	SEQUÊNCIA	Hidrofo- bicidade	ACERTOS NO EpiMatrix (Excl. FLANCOS)	PONTUAÇÃO DO GRUPOS EpiMatrix (Excl. FLANCOS)	SEQ ID NO:
P08176	1 - 21	MKIVLAIASLLLSAVY ARPS	1.42	22	38.91	105
P08176	51 - 67	LESVKYVQSNGGAINHL	-0.15	6	10.87	106
P08176	72 - 88	LDEFKNRFLMSAEAFEH	-0.49	6	10.55	107
P08176	111 - 134	EIDLRQMRTVTPIRMQG GCGSCWA	-0.24	16	26.34	108
P08176	142 - 159	ESAYLAYRNQSLDLAEQ E	-0.91	10	16.43	109
P08176	188 - 209	QESYYEYVAREQSCRRP NAQRF	-1.70	14	24.92	110
P08176	<u>296 - 313</u>	DNGYGYFAANIDLMIE E	-0.08	7	10.24	111

TABELA 7B - Der p 2

SEQUÊNCIA DE ENTRADA (NCBI n.º)	RESÍDUOS NA SEQUÊNCIA (Incl. FLANCOS)	SEQUÊNCIA	Hidrofo- bicidade	ACERTOS NO EpiMatrix (Excl. FLANCOS)	PONTUAÇÃO DO GRUPOS EpiMatrix (Excl. FLANCOS)	SEQ ID NO:
P49278	<u>1 - 22</u>	MMYKILCLSLVAAVAR DQVDV	1.24	14	21.8	112
P49278	<u>42 - 63</u>	EPCIIHRGKPFQLEAVF EANQN	-0.50	10	14.62	113

TABELA 7C – Der p 7

SEQUÊNCIA DE ENTRADA (NCBI n.º)	RESÍDUOS NA SEQUÊNCIA (Incl. FLANCOS)	SEQUÊNCIA	Hidrofo- bicidade	ACERTOS NO EpiMatrix (Excl. FLANCOS)	PONTUAÇÃO DE GRUPOS EpiMatrix (Excl. FLANCOS)	SEQ ID NO:
P49273	<u>1 – 17</u>	MMKLLLI AAAA FVAVSA	2.2	12	20.16	114
P49273	<u>70-92</u>	ELDMRNIQVRGLKQMKR VGDANV	-0.71	9	12.3	115

Exemplo 4*Seleção de péptidos para testes adicionais*

Com base nos péptidos e epítomos identificados nos Exemplos 1 a 3, os inventores selecionaram os péptidos mostrados na Tabela 8 para testes adicionais. Alguns dos péptidos selecionados podem ser considerados variantes dos péptidos dos Exemplos 1 a 3, mas também são considerados péptidos da invenção. Em particular, os resíduos em negrito na Tabela 8 indicam alterações do resíduo correspondente na sequência nativa da proteína progenitora. Estas alterações reduzem a formação de dímeros de péptidos e melhoram a solubilidade sem diminuir a funcionalidade de um péptido como um epítopo de células T. As alterações mostradas são a substituição de uma cisteína (C) na sequência nativa por uma serina (S) ou ácido 5-aminobutírico (), ou cistina (), como indicado.

Adicionalmente, algumas sequências podem compreender mais ou menos que resíduos da proteína progenitora da qual derivam, quando comparados com as sequências dos péptidos dos Exemplos 1 a 3. Assim, pode considerar-se que estas sequências representam variantes de extensão ou truncagem dos péptidos dos Exemplos 1 a 3. Por exemplo, o péptido HDM03F corresponde aos resíduos 149-165 de Der p 1. O HDM03E corresponde aos resíduos 149-167. Portanto, pode considerar-se HDM03F como uma variante truncada do HDM03E formada pela remoção de 2 resíduos do terminal N de HDM03E. As posições de "resíduos na progenitora" na Tabela 8 referem-se às sequências de Der p 1, Der p 2 e Der p 7 como utilizados nas Tabelas 4 a 7. Os péptidos indicados na Tabela 8 que têm um resíduo de glutamato (E) N-terminal, por exemplo HDM03K, L, V e W, podem ter o glutamato substituído por

piroglutamato para melhorar a estabilidade durante o fabrico, sem afetar a função do péptido. Os dados de testes adicionais destes péptidos (Exemplo 5) são tipicamente obtidos usando péptidos onde ocorreu essa substituição.

Tabela 8

Péptido	Molécula progenitor a	Sequência	Resíduos na progenitora	SEQ ID NO:
HDM01	Der p 1	IDLRQMRTVTPIR	112 - 124	1
HDM01A	Der p 1	IDLRQMRTVTPIRMQGGSG	112 - 130	48
HDM02A	Der p 1	RTVTPIRMQGG S G	118 - 130	49
HDM02B	Der p 1	RTVTPIRMQGG G	118 - 130	50
HDM03D	Der p 1	RNQSLDLAEQELVD S ASQH	149 - 167	51
HDM03E	Der p 1	RNQSLDLAEQELVD ASQH	149 - 167	52
HDM03F	Der p 1	RNQSLDLAEQELVD S AS	149 - 165	53
HDM03G	Der p 1	QSLDLAEQELVD ASQHG	151 - 168	89
HDM03H	Der p 1	LDLAEQELVD ASQHG	153 - 168	90
HDM03J	Der p 1	LAEQELVD ASQHG	155 - 168	91
HDM03K	Der p 1	EQELVD ASQHG	157 - 168	92
HDM03L	Der p 1	ELVD ASQHG	159 - 168	93
HDM03M	Der p 1	RNQSLDLAEQELVDCASQHG	149 - 168	94
HDM03N	Der p 1	RNQSLDLAEQELVD ASQHG	149 - 168	95
HDM03P	Der p 1	SAYLAHRNQSLDLAEQELVDCAS	143 - 166	96
HDM03R	Der p 1	QSLDLAEQELVD S ASQHG	151 - 168	97
HDM03S	Der p 1	LDLAEQELVD S ASQHG	153 - 168	98
HDM03T	Der p 1	LAEQELVD S ASQHG	155 - 168	99
HDM03V	Der p 1	EQELVD S ASQHG	157 - 168	100
HDM03W	Der p 1	ELVD S ASQHG	159 - 168	101
HDM06A	Der p 1	RYVAREQS S RRP	193 - 205	54
HDM06B	Der p 1	RYVAREQS RRP	193 - 205	55
HDM07	Der p 1	PNVNKIREALAQT	220 - 232	56
HDM09A	Der p 1	REALAQTHSAIAVI	226 - 239	5
HDM19A	Der p 2	DQVDVKDSANHEIKK	18 - 32	57
HDM19B	Der p 2	DQVDVKD ANHEIKK	18 - 32	58
HDM20A	Der p 2	IIHRGKPFQLEA	45 - 56	59

Péptido	Molécula progenitor a	Sequência	Resíduos na progenitora	SEQ ID NO:
HDM20B	Der p 2	SIIHRGKPFQLEA	44 – 56	60
HDM21	Der p 2	KPFQLEAVFEANQNT	50 – 64	8
HDM21A	Der p 2	KPFQLEAVFEANQNTK	50 – 65	9
HDM21B	Der p 2	RGKPFQLEAVFEANQNT	48 – 64	10
HDM22A	Der p 2	EAVFEANQNTKTAK	55 – 68	11
HDM23B	Der p 2	GLEVDVPGIDPNA	77 – 86	61
HDM23C	Der p 2	GLEVDVPGIDPNASH	77 – 88	62
HDM26B	Der p 2	GVLA S AIATHAKIR	132 – 145	63
HDM26C	Der p 2	GVLA AIATHAKIR	132 – 145	64
HDM30	Der p 7	DKFERHIGIIDLK	56 – 68	14
HDM32	Der p 7	IDLKGELDMRNIQ	65 – 77	15
HDM33	Der p 7	LDMRNIQVRGLKQ	71 – 83	16
HDM34	Der p 7	RNIQVRGLKQMKRVG	74 – 88	17
HDM35A	Der p 7	RGLKQMKRVGDANV	79 – 92	65
HDM39A	Der p 7	HDDVVSMEYDLAYKL	108 – 121	19
HDM39B	Der p 7	HDDVVSMEYDLAYKLGLDH	108 – 125	66
HDM40A	Der p 7	VSMEYDLAYKLGLDH	112 – 124	20
HDM40B	Der p 7	VSMEYDLAYKLGLDL	112 – 123	67
HDM48	Der p 7	TAIFQDTVRAEMTK	187 – 200	21
HDM48A	Der p 7	TAIFQDTVRAEMTKVLAP	187 – 204	68
HDM49	Der p 7	DTVRAEMTKVLAP	192 – 204	22
HDM51	Der p 7	VDFKGELAMRNIE	65 – 77	23
HDM51A	Der p 7	VDFKGELAMRNIEAR	65 – 79	24
HDM100	Der p 1	RFGISNYCQIYPPNVNK	208 – 224	69
HDM100A	Der p 1	RFGISNY S QIYPPNVNK	208 – 224	70
HDM100B	Der p 1	RFGISNY QIYPPNVNK	208 – 224	71
HDM101	Der p 1	NYCQIYPPNVNKIREA	213 – 228	72
HDM101A	Der p 1	NY S QIYPPNVNKIREA	213 – 228	73
HDM101B	Der p 1	NY QIYPPNVNKIREA	213 – 228	74
HDM102	Der p 1	NAQRFGISNYCQI	205 – 217	75
HDM102A	Der p 1	NAQRFGISNY S QI	205 – 217	76
HDM102B	Der p 1	NAQRFGISNY QI	205 – 217	77

Péptido	Molécula progenitora	Sequência	Resíduos na progenitora	SEQ ID NO:
HDM103	Der p 2	KGQQYDIKYTWNVPKIAP	99 - 116	78
HDM04	Der p 2	WNVPKIAPKSENV	109 - 121	79
HDM201	Der p 1	ESVKYVQSNGGAI	52 - 64	80
HDM202	Der p 1	DEFKNRFLMSAEAFE	73 - 87	81
HDM202D	Der p 1	FKNRFLMSAEA	75 - 85	102
HDM202E	Der p 1	FKNRFLMSAE	75 - 84	103
HDM202H	Der p 1	EFKNRFLMSAE	74 - 84	104
HDM203A	Der p 1	DLRQMRTVTPIRMQGGCGS	113 - 131	82
HDM203B	Der p 1	DLRQMRTVTPIRMQGG S GS	113 - 131	83
HDM204	Der p 1	SAYLAYRNQSLDLA	143 - 156	84
HDM205	Der p 1	SYRYVAREQS	190 - 199	85
HDM206	Der p 1	DNGYGYFAANIDLMMIEE	296 - 313	86
HDM206A	Der p 1	NGYGYFAANIDLMM	297 - 310	87
HDM207	Der p 7	DMRNIQVRGLKQMKRVGD	72 - 104	88

Exemplo 5

Ensaio de libertação de citóquinas e seleção de combinações de péptidos

Os perfis de secreção de citóquinas pelas PBMC são analisados em resposta à estimulação pelos péptidos usando os péptidos do Exemplo 3. Os sobrenadantes do ensaio de libertação de citóquinas são testados quanto à presença de 2 citóquinas, IFN- γ e IL-13, usando o ensaio ELISA. Os perfis de secreção de citóquinas pelas PBMC foram analisados em resposta à estimulação por péptidos usando os péptidos indicados. Os sobrenadantes do ensaio de libertação de citóquinas foram testados quanto à presença de 2 citóquinas, IFN- γ e IL-13, usando um ensaio ELISA ou um ensaio de arranjo de contas Multiplex.

Um ensaio típico de libertação de citóquinas requer 40×10^6 PBMC por indivíduo. Detalhadamente, 250 μ l de uma solução a 200 μ g/ml da concentração de péptido ou antigénio adequada são distribuídos nos poços apropriados de placas de 48 poços. As placas são então incubadas numa incubadora humidificada com 5% de CO₂ a 37°C durante um máximo de 4 horas. São então

adicionados a cada poço 250 μ l de uma suspensão de PBMC a 5×10^6 células/ml e as placas são devolvidas à incubadora por 5 dias. Após a estimulação, são colhidas amostras de sobrenadante de cultura para testes através dos ensaios ELISA ou de contas Multiplex, de acordo com os protocolos padrão.

As respostas de IL-13 e de IFN-gama a cada péptido foram pontuadas como epítomos de células T positivos desde que a quantidade de citóquina produzida no poço para esse péptido excedesse 100 pg/ml, *i.e.* 100 pg por $1,25 \times 10^6$ células. Assim, considerou-se que um indivíduo respondia a um péptido se as células desse indivíduo produzissem uma resposta superior a 100 pg/ml para IL-13 ou para IFN-gama. A percentagem de respondedores a cada péptido é mostrada na Figura 2.

Os cinco primeiros péptidos com percentagem de indivíduos com uma resposta de IL-13 ou IFN-gama superior a 100 pg/ml são HDM203B, HDM201, HDM205, HDM203A e HDM202, e (SEQ ID NO: 83, 80, 85, 82 e 81).

O HDM203A e o 203B são variantes da mesma sequência, sendo 203B modificado de forma que uma serina substitui uma cisteína (no terceiro resíduo a partir do terminal C) para obter melhores propriedades de fabrico e estabilidade. Assim, uma combinação preferida de péptidos deverá compreender pelo menos um destes péptidos ou uma sua variante.

Os péptidos seguintes mais potentes são HDM09A, HDM03D, HDM03E, HDM101, HDM101A, HDM101B (SEQ ID NO: 5, 51, 52, 72, 73 e 74). Uma combinação de péptidos preferida pode tipicamente compreender pelo menos um péptido adicional selecionado deste grupo. Deste grupo, o HDM03D e o HDM03E são variantes de sequência um do outro, em que serina e ácido aminobutírico (respetivamente) substituem cisteína (no quinto resíduo a partir do terminal C da sequência nativa de Der pi) para obter melhores propriedades de fabrico e estabilidade. Estas sequências são consideradas equivalentes.

Outras variantes de HDM03, nomeadamente HDM03V e HDM03W (SEQ ID NO: 100 e 101) também são consideradas adequadas. Estas variantes são fragmentos que compreendem uma truncagem até aos últimos onze ou dez (respetivamente) resíduos C-terminais de HDM03D. Estes péptidos não estão incluídos no ensaio acima

descrito, mas em teste foram considerados pelo menos equivalentes a HDM03D (dados não mostrados).

O HDM101, o HDM101A e o HDM101B são também variantes de sequência uns dos outros, em que o HDM101A tem uma serina e o HDM101B tem um ácido aminobutírico a substituir uma cisteína em HDM101 (terceiro resíduo a partir do terminal N). Todos os três péptidos da série HDM101 são considerados equivalentes, sendo o HDM101A ou o HDM101B preferidos em termos de propriedades de fabrico e estabilidade.

Dos restantes péptidos testados, os seguintes têm respostas em >25% dos indivíduos testados: HDM01 [Der p1], HDM01A [Der p1], HDM06A [Der p2], HDM07 [Der p1], HDM19A [Der p2], HDM21A [Der p2], HDM23C [Der p2], HDM26B [Der p2], HDM35A [Der p7], HDM48 [Der p7], HDM51A [Der f 7], HDM102A [Der p1], HDM204 [Der p1] e HDM206 [Der p1] (SEQ ID NO: 1, 48, 54, 56, 57, 9, 62, 63, 65, 21, 24, 76, 84 e 86 respetivamente). Uma combinação de péptidos preferida pode tipicamente compreender pelo menos um péptido adicional selecionado deste grupo. Quando se considera quais os péptidos adicionais a adicionar à mistura, os representantes deste grupo final devem ser escolhidos preferivelmente entre os epítomos retirados de Der p2 e Der p7, uma vez que os grupos anteriores são dominados por Der p 1. O HDM26B [Der p2] e o HDM35A [Der p7] são particularmente preferidos. Estudos adicionais (dados não apresentados) demonstram que estes são os péptidos com melhor desempenho entre Der p 2 e Der p 7, respetivamente.

A Figura 3 mostra o número de indivíduos que respondem a uma mistura nuclear de HDM201, HDM202, HDM203B e HDM205. O efeito incremental da adição de HDM03D e HDM101A, e o efeito incremental da adição de HDM26B e HDM35A, são também mostrados. O benefício de adicionar epítomos do segundo e do terceiro grupos de péptidos é claramente mostrado.

É importante que a adição dos péptidos 03D, 26B, 35A, 101A à mistura nuclear converteu 4 indivíduos de não respondedores para respondedores. É também evidente que a remoção de um dos péptidos 201, 202, 203B ou 205 da mistura não reduziria o número de respondedores globais às misturas propostas pois a maioria das pessoas têm três ou quatro respostas a este grupo de péptidos. Isto é demonstrado na Figura 4, que mostra resultados similares para uma mistura nuclear de HDM201, HDM203B e HDM205.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para utilização na prevenção ou tratamento de alergia a ácaros do pó doméstico compreendendo o polipéptido de HDM201 ESVKYVQSNGGAI (SEQ ID 80), ou uma sua variante que tem 9 a 30 aminoácidos de comprimento e compreende:

- a sequência do referido polipéptido; ou
- uma sequência que tem pelo menos 65% de homologia com a sequência do referido polipéptido; ou
- um fragmento da sequência do referido polipéptido que tem pelo menos nove aminoácidos de comprimento.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente:

- o polipéptido de HDM203B DLRQMRTVTPIRMQGGSGS ou uma sua variante como definido na reivindicação 1;
- o polipéptido de HDM205 SYRYVAREQS ou uma sua variante como definido na reivindicação 1; e
- o polipéptido de HDM03W ELVDSASQHG, ou uma sua variante como definido na reivindicação 1.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2 compreendendo adicionalmente:

- o polipéptido de HDM26B GVLASAIATHAKIR ou uma sua variante como definido na reivindicação 1;
- o polipéptido de HDM35A RGLKQMKRVGDANV ou uma sua variante como definido na reivindicação; e
- o polipéptido de HDM101A NYSQIYPPNVNKIREA ou uma sua variante como definido na reivindicação 1.

4. Composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o resíduo de glutamato presente no terminal N do polipéptido de HDM201 ESVKYVQSNGGAI e/ou do polipéptido de HDM03W ELVDSASQHG está substituído por piroglutamato.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que um ou mais dos polipéptidos possuem uma ou mais modificações selecionadas entre as seguintes:

- (i) acetilação N-terminal;
- (ii) amidação C-terminal;
- (iii) um ou mais hidrogénios nas aminas da cadeia lateral de Arginina e/ou Lisina substituídos por um grupo metileno;
- (iv) glicosilação;
- (v) fosforilação;
- (vi) quaisquer resíduos de cisteína na sequência nativa do polipéptido substituídos por serina ou ácido 2-aminobutírico; e/ou
- (vii) quaisquer resíduos hidrófobos nos até três aminoácidos no terminal N ou C da sequência nativa do polipéptido, que não estão compreendidos num epítipo de células T, eliminados; e/ou
- (viii) quaisquer dois aminoácidos consecutivos compreendendo a sequência Asp-Gly nos até quatro aminoácidos no terminal N ou C da sequência nativa do polipéptido, que não estão compreendidos num epítipo de células T, eliminados.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, que é uma solução compreendendo o, ou cada um dos polipéptidos, numa concentração na gama de 0,03 a 200 nmol/ml.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, em que a concentração está na gama de 0,3 a 200 nmol/ml.

8. Composição de acordo com a reivindicação 6, em que a concentração está na gama de 30 a 120 nmol/ml.

9. Composição para utilização na prevenção ou tratamento de alergia aos ácaros do pó compreendendo uma sequência polinucleotídica que, quando expressa, causa a produção de um polipéptido como definido na reivindicação 1.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores que é uma composição farmacêuticamente aceitável compreendendo adicionalmente um transportador ou diluente farmacêuticamente aceitáveis.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10 que é formulada para administração oral, administração nasal, administração epicutânea, administração subcutânea, administração sublingual, administração intradérmica, administração bucal ou para administração por inalação ou por injeção.

12. Polipéptido de HDM201 ESVKYVQSNGGAI (SEQ ID 80) ou uma sua variante como definido na reivindicação 1.

13. Polipéptido da reivindicação 12 em que o resíduo de glutamato presente no terminal N do polipéptido está substituído por piroglutamato.

14. Método *in vitro* para determinar se células T reconhecem um polipéptido como definido na reivindicação 1, compreendendo o contacto das referidas células T com o referido polipéptido e a deteção se as referidas células T são estimuladas pelo referido polipéptido.

15. Método *in vitro* para determinar se um indivíduo tem, ou está em risco de ter, uma condição, em que a condição é caracterizada por sintomas alérgicos em resposta a um alérgénio dos ácaros do pó doméstico, o método compreendendo testar se o indivíduo tem células T que respondem a uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, desse modo determinando se o indivíduo tem, ou está em risco de ter, a condição, opcionalmente, em que uma resposta imunitária de células T à referida composição é medida colocando a composição em contacto com células T numa amostra retirada do indivíduo, sob condições que permitem à composição e às células T interagir; e determinar se algumas das células T são, ou não, estimuladas e desse modo determinar se está presente ou ausente uma resposta imunitária de células T.

Lisboa, 2015-10-08

FIGURA 1A

Der p1 17	YARPSIKTFFELYKRAFNKSYATFEDEEARKNELESVKYVQSNNGAINHLSLSDLSIDEFK	76
Der f1 17	YARP+SIRKFEEL+KKAFFNK+YAT E+EE ARKNFLES+KYV++N GAINHLSLSDLSIDEFK	76
Der p1 77	NRFLMSAEAFEHKLTQFELNAETINACSLNG-NAFAE ETIRKONRELYATPARRMOGGGSCWAF	135
Der f1 77	NR+LMSAEAFE LKTQFDINAET+AC IN N P+E+DLR +RTVTPLRMOGGGSCWAF	135
Der p1 136	SGVAATESAYLLAY ENCSLELATQHEHVAASOHGCHGDTIPRGIEYIOHNGVQESYYRXX	193
Der f1 136	SGVAATESAYLLAYRN SLDL+EQELVDCASOHGCHGDTIPRGIEYIO NGV+E Y YV	196
Der p1 196	AREQ CRPN+Q +GISNYCQIYPR-V +JREAV OTH+ATAVIGIKKL AF+HYDGRT	255
Der f1 196	AREQ CRPN+Q +GISNYCQIYPR-V +JREAV OTH+ATAVIGIKKL AF+HYDGRT	256
Der p1 256	IIQRNGYQPNYHAVNIVGYSNAGVDYWIVRNSWDJTNMGDNGYGYFAANIDLKMLEEY 2	315
Der f1 256	IIQ DNGYQPNYHAVNIVGY + QG DYWIVRNSWDI WCD+GYGYF A +LMIE+Y 2	316
Der p1 316	YVVILL 320	
Der f1 316	YVVI+	
Der p1 321	YVIM 321	

FIGURA 1B

Der p2 1 ~~MMYKILCLSLVPAVARNDQVDDVADNHEIKVVLVPBGHSEPELHKGKQQLHANEVDA~~ 60
M+ KILCLSLVPAV DQVVKCCAN+EIKV+V GCHGS+PCITHGKPF IEA+F-A
Der f2 1 ~~MISKILCLSLVPAAVNAPQVQVMDQNNELIKVAVVDGCHGSDPGLHKGKQQLHANEVDA~~ 60
~~NONTKAKIEIKASIDGIEEDVBDLBNACHYMKCPVLVKGOQYDIKYTNVNPXIAPIXSEN~~ 120
~~NONTKAKIEIKAS+DGLE+DVPGID NACH+MKCPVLVKGOQYDIKYTNVNPXIAPIXSEN~~
~~NONTKAKIEIKASIDGIEEDVBDLBNACHYMKCPVLVKGOQYDIKYTNVNPXIAPIXSEN~~ 120
Der p2 121 ~~VVVTVKVMGDGALAGAPAHAKTRD~~ 146
VVVTVK++GD+GVLACAIATH KIRD
Der f2 121 ~~VVVTVKRITGDNGLVGGVHGGVTRD~~ 146

FIGURA 1C

Der p7 1 ~~MMKLLLIAAAAFVAVSADPIHYDKITEELINKAVDAAVAALEKSETEEDPMKVDPDHSOKKEER~~ 60
MMK LLIAA AFVAVSADPIHYDKITEELINKA+D+A+AAIE+SET DPMKVDPH+DKTER
Der f7 1 ~~MMKLLIAAVAFAVVSADPIHYDKITEELINKAIDDAIAAIEQSEWIDPMKVDPHAEKKEER~~ 60
~~MMKLLIAAFAVVSADPIHYDKITEELINKAIDDAIAAIEQSEWIDPMKVDPHAEKKEER~~ 120
~~H+GI+D KGEL MRNI+ RGIKOMKR GDANVK E+G+VXAHLLGVIEDD+VSMEYDILAY~~
~~HVGIYDLEKSELAMRNITFAKGIKOMRGGDANVKGETGIVKAILLGVHDDIVSYEMADILAY~~ 120
Der p7 61 ~~KLGLDHPNPTHVISDIQDFVELSLEVSEECNMNTTSFEVRQFANVNVNHIGLSTLDPIFA~~ 180
KLGLDHPNPTHVISDIQDFVELSLEVSEECNMNTTSFEVRQFANVNVNHIGLSTLDPIFA
Der f7 121 ~~KLGLDHPNPTHVISDIQDFVALSLEISDEGNITMCSFEVRQFANVNVNHIGLSTLDPIFG~~ 180
KLGLDHPNPTHVISDIQDFVALSLEISDEGNITMCSFEVRQFANVNVNHIGLSTLDPIFG
Der p7 181 ~~VLSDDLPLTQDQVVRVEMKQVAPAFKXLBEN~~ 213
VLSDDLPLTQDQVVRVEMKQVAPAFKXLBEN
Der f7 181 ~~VLSDDLPLTQDQVVRVEMKQVAPAFKRELEEN~~ 213
VLSDDLPLTQDQVVRVEMKQVAPAFKRELEEN





