

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712421-0 A2**

(22) Data de Depósito: 11/06/2007
(43) Data da Publicação: 19/06/2012
(RPI 2163)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 19/00
A61K 38/16
A61K 39/35

(54) Título: PROTEÍNA HIPOALERGÊNICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, HOSPEDEIRO, ANTICORPO, FORMULAÇÃO DE VACINA, USOS DE UMA PROTEÍNA HIPOALERGÊNICA, DE UM COMPLEXO HIPOALERGÊNICA E DE UMA PROTEÍNA DE CAPSÍDEO VIRAL DE UM VÍRUS DA FAMÍLIA PICORNAVIRIDAE, MOLÉCULA HIPOALERGÊNICA, E, USO DE UMA MOLÉCULA HIPOALERGÊNICA, UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, UM VETOR OU UM ANTICORPO.

(57) Resumo: PROTEÍNA HIPOALERGÊNICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, HOSPEDEIRO, ANTICORPO, FORMULAÇÃO DE VACINA, USOS DE UMA PROTEÍNA HIPOALERGÊNICA, DE UM COMPLEXO HIPOALERGÊNICO E DE UMA PROTEÍNA DE CAPSÍDEO VIRAL DE UM VÍRUS DA FAMÍLIA DE PICORNAVIRIDAE, MOLÉCULA HIPOALERGÊNICA, E, USO DE UMA MOLÉCULA HIPOALERGÊNICA, UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, UM VETOR OU UM ANTICORPO. A presente invenção diz respeito a uma proteína hipoalergênica que consiste de pelo menos uma molécula hipoalergênica derivada de um alérgeno, que é fundido ou conjugado a pelo menos uma segunda proteína não alérgênica ou fragmento desta.

(30) Prioridade Unionista: 09/06/2006 AT A 994/2006

(73) Titular(es): Biomay Ag

(72) Inventor(es): Birgit Linhart, Hans Grönlund, Ines Swoboda, Johanna Tinhofer, Kerstin Westrißschnig, Margarete Focke-Tejkl, Marianne Van Hage, Peter Valent, Renate Reininger, Rudolf Valenta, Susanne Spitzauer, Susanne Vrtala, Theresia Popow-Kraupp

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT AT2007000281 de 11/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/140505 de 13/12/2007

“PROTEÍNA HIPOALERGÊNICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, HOSPEDEIRO, ANTICORPO, FORMULAÇÃO DE VACINA, USOS DE UMA PROTEÍNA HIPOALERGÊNICA, DE UM COMPLEXO HIPOALERGÊNICO E DE UMA PROTEÍNA DE CAPSÍDEO VIRAL DE UM VÍRUS DA FAMÍLIA DE PICORNAVIRIDAE, MOLÉCULA HIPOALERGÊNICA, E, USO DE UMA MOLÉCULA HIPOALERGÊNICA, UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, UM VETOR OU UM ANTICORPO”

A presente invenção diz respeito a novas moléculas hipoalergênicas e usos destas.

A alergia do tipo I é uma doença de hipersensibilidade mediada por IgE que afeta quase 25 % da população. Isto é fundamentado na re-cognição de antígenos de inseto, veneno, alergeno de alimentos e alergeno de contato de transportados pelo ar nocivos derivados de fontes de antígenos nocivos *per se*, tais como pólen, insetos, bolor e proteínas animais pela imunoglobulina E específica. A reticulação de anticorpos de IgE ligados por células atuadoras leva a uma liberação de mediadores inflamatórios (por exemplo, histamina, leucotrienos) e, desta maneira aos sintomas imediatos de alergia (por exemplo, rinoconjuntivite, asma, dermatite, anafilaxia). A ativação de célula T por intermédio de mecanismo dependentes de IgE bem como independentes de IgE contribui com a inflamação alérgica crônica.

Provavelmente, as únicas formas causativas de tratamento de alergia é a imunoterapia específica de alergeno, que está fundamentada na administração repetida de quantidades crescentes de extratos de alergeno para a maioria das fontes. Numerosos estudos clínicos documentaram a eficácia clínica da imunoterapia de injeção e existe evidência de diversos mecanismos imunológicos básicos deste tratamento. Devido à dificuldade de preparar extratos de alergeno de alta qualidade de certas fontes de alergeno e o fato de que a administração de alergenos a pacientes pode causar efeitos colaterais

graves, a imunoterapia específica de alérgeno pode ser apenas recomendada para certos grupos de pacientes e manifestações de doenças. É especialmente difícil tratar pacientes com co-sensibilizações a diversas fontes de alérgeno diferentes e pacientes que sofrem de manifestações de doença graves, tais como asma alérgico. O asma alérgico é uma das manifestações mais vigorosas de alergia, porque esta afeta gravemente a qualidade de vida diária, causa uma taxa alta de admissões de hospitalidade e pode manifestar, por si só em formas ameaçadoras de vida sérias que requerem cuidado intensivo do paciente.

Os extratos de alérgeno preparados a partir de fontes naturais são brutos por natureza e é impossível de influenciar a qualidade e as quantidades de alérgenos individuais em tais preparações por meios técnicos. Estes também contêm numerosos compostos não alérgênicos indefinidos e diversos estudos recentes indicam a qualidade fraca de tais extratos e documenta sua heterogeneidade grande.

Na última década, grande progresso foi feito no campo da caracterização de alérgeno molecular usando-se a tecnologia de DNA recombinante. Um grande número dos alérgenos que evocam doença importantes foram caracterizados abaixo do nível molecular e alérgenos recombinantes que imitam a complexidade de epítipo de extratos de alérgeno naturais foram produzidos. Além disso, diversos grupos de pesquisa usaram o conhecimento com respeito às estruturas de alérgeno para o desenvolvimento de vacinas alérgicas novas definidas. Engenharia genética, química peptídeo sintética e conjugação de alérgenos com seqüências de DNA imunoestimuladoras foram usadas para a redução da atividade alérgênica das novas vacinas e, desta maneira, da taxa de efeitos colaterais induzidos por terapia. Os primeiros estudos clínicos promissores foram conduzidos com tais derivados de alérgeno. Interessantemente, é dito que embora a reatividade de IgE de alérgenos recombinantes geneticamente projetados e peptídeos

contendo epítipo de célula T sintético derivado de alérgeno possa ser fortemente reduzida ou ainda abolida, estes derivados ainda podem induzir efeitos colaterais sistêmicos que aparecem várias horas após a injeção. Por exemplo, foi relatado que os peptídeos de epítipo de célula T do alérgeno de gato principal, Fel d 1, asma induzido e hiperreatividade brônquica diversas horas após a injeção intracutânea e existe evidência forte de que este efeito é mediado pela célula T e restrito por MHC.

Este resultado indica que a remoção da reatividade de IgE diminui os efeitos colaterais mediados por IgE visto que nenhuma reação imediata foi registrada no curso destes estudos de imunoterapia. Entretanto, os epítopos de célula T específicos de alérgeno que foram preservados nos derivados de alérgeno recombinantes bem como nas misturas de peptídeo são responsáveis pelos efeitos colaterais tardios (por exemplo, dermatite muito problemática ou atópica, manifestação de pele alérgica mediada por célula T crônica). Os efeitos colaterais causados no caso de derivados de alérgeno recombinantes foram relativamente brandos no caso das vacinas de peptídeo de célula T puderem ser superadas pela dosagem adequada. Ambos os dois novos métodos, portanto, parecem muito promissores para a imunoterapia de rinoconjuntivite alérgica mas pode ter limitações quando ocorre o tratamento de diversas formas de asma alérgico, onde a indução de efeitos colaterais tardios no pulmão pode ser muito problemática.

A fim de administrar e conseqüentemente provocar uma resposta imune eficiente contra peptídeos, polipeptídeos e proteínas, adjuvantes e/ou carreadores são regularmente usados. O adjuvante de Freund completo, por exemplo, é um dos adjuvantes mais potentes disponíveis. Entretanto, por causa de seus efeitos colaterais, seu uso não é aprovado para seres humanos. Portanto, existe uma necessidade de composições de vacina capazes de induzir respostas imunes fortes contra peptídeos e polipeptídeos derivados de alérgenos e, é claro, de outros antígenos que evitam o uso do

adjuvante de Freund completo. Além disso, enquanto o BSA foi usado de maneira bem sucedida como um carreador em modelos animais este pode não ser apropriado para o uso em composições de vacina humana por causa do risco de reações adversas tal como o risco de transmissão de doença priônica (doença de Creutzfeldt-Jakob variante). Um outro desafio para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra alergenó é a necessidade de uma resposta imune capaz de diminuir rapidamente os alergenó em um indivíduo ou animal. Portanto, altas concentrações de anticorpos específicos de alergenó no sangue, que são principalmente do subtipo IgG, são necessários. Nas superfícies de mucosa, os anticorpos IgA são o subtipo primário.

A toxina da cólera, uma proteína carreadora conhecida na técnica, também é usada regularmente como um adjuvante, eliminando a necessidade do adjuvante de Freund completo em uma composição de vacina. Entretanto, a toxina da cólera aumenta os níveis de anticorpo IgE totais e específicos e leva a reações inflamatórias associadas com IgE.

Devido aos efeitos colaterais provocados pela maioria das proteínas carreadoras usadas para a vacinação, existe uma necessidade quanto a sistemas carreadores que são capazes de estimular respostas imunes contra alergenó ou outros antígenos, sem usar adjuvantes tóxicos, sem usar proteínas carreadores deficientemente toleradas e, em certas situações, sem estímulo de respostas imunes potencialmente patológicas. Novos sistemas carreadores que encontram estas especificações podem ser usados com relação à informação de novos conjugados e composições adequadas para o tratamento ou prevenção de doenças como as doenças alérgicas.

Em Bohle B. et al. (J. Immunol. 172 (11) (2004): 6642-6648) uma proteína de fusão recombinante que compreende uma proteína de camada S e a porção Bet v 1 é descrita. Esta molécula compreende a proteína Bet v 1 hiperalérgica natural.

O WO 2004/004761 diz respeito a partículas semelhantes a vírus que são fundidos a um imunogênio e que podem ser usados para a imunização.

No WO 2004/003143, o uso de proteínas de fusão que compreende uma partícula semelhante a vírus e uma molécula hiperalérgica como imunogênio para a vacinação é divulgado.

É um objetivo da presente invenção fornecer medicamentos e carreadores que superam as desvantagens mencionadas acima e permitem uma vacinação de alérgeno com os efeitos colaterais reduzidos.

Portanto, a presente invenção diz respeito a uma proteína hipoalérgica que consiste de pelo menos uma molécula hipoalérgica derivada de um alérgeno, que é fundido ou conjugado a pelo menos uma segunda proteína não alérgica ou fragmento desta.

A fim de provocar uma resposta imune intensificada contra uma molécula, em particular de uma molécula hipoalérgica de acordo com a presente invenção, a dita molécula é fundida (por engenharia genética) ou conjugada (pelas reações químicas) a um carreador. Um carreador convencional e regularmente utilizado é, por exemplo, KLH (hemocianina de lapa buraco de fechadura). O KLH, que é isolado do molusco marinho gigante *Megathura crenulata*, é uma das proteínas carreadoras mais populares usados para criar um imunogênio para injeção. O KLH induz uma resposta de anticorpo forte por causa de sua massa grande por que esta não é uma proteína de mamífero.

A segunda proteína (o "carreador" ou "proteína carreadora") a ser fundida ou conjugada a uma molécula hipoalérgica da invenção não é derivada de um alérgeno ("não alérgica"). Entretanto, a proteína carreadora usada na presente invenção pode apresentar reatividade de célula T e/ou provocar uma resposta imune contra ela mesma e a molécula hipoalérgica fundida ou conjugada a esta quando administrado a um corpo animal ou

humano. Conseqüentemente, se a proteína carreadora for derivada de um patógeno (por exemplo, vírus, bactérias, etc.), anticorpo (protetor) direcionado ao dito carreador e patógenos são produzidos.

Como usado neste, "proteína hipoalergênico" significa uma proteína/polipeptídeo de fusão de um carreador de uma fonte não alérgica com uma molécula hipoalérgica. Além disso, uma "proteína hipoalérgica" também é pretendida ser um produto de conjugação (por exemplo, ligação química, adsorção) de um carreador com uma molécula hipoalérgica.

"Hipoalérgico" como usado neste, refere-se a moléculas com potencial alérgico reduzido. Tais moléculas têm uma capacidade diminuída para provocar reações alérgicas em um indivíduo comparado com a proteína do tipo selvagem a partir das quais estas moléculas são derivadas.

A pelo menos uma molécula hipoalérgica derivada de um alérgeno e fundida/conjugada a uma segunda proteína é preferivelmente truncado de terminal C e/ou N. A "truncação de terminal C e/ou N", como usado neste, significa que os resíduos de aminoácido do terminal N ou do terminal C ou ambos do terminal N e C do alérgeno do tipo selvagem são removidos por anulação de pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30 resíduos de aminoácido.

As moléculas hipoalérgicas, isto é, peptídeos/polipeptídeos, compreende preferivelmente de 10 a 50 aminoácidos, mais preferivelmente de 15 a 40 aminoácidos, em particular, de 20 a 30 aminoácidos e apresentam reatividade IgE reduzida. Estas moléculas são designadas excluir os epítopos de célula T que podem causar efeitos colaterais mediadas pela célula T. Os epítopos e as moléculas de célula T que apresentam a resposta da célula T reduzida podem ser determinados e identificados pelos métodos conhecidos pela pessoa habilitada na técnica (por exemplo, Bercovici N. et al. Clin Diagn Lab Immunol. (2000) 7:859-864).

Foi observado que é possível projetar vacinas de peptídeo derivadas de alergenios como os alergenios de pólen de grama principais, por exemplo, Phl p 1 e para o alergenio de pólen de bétula, Bet v 1, usando-se peptídeos expostos de superfície. Os dados obtidos mostram que tais vacinas de peptídeo podem ser produzidos para qualquer alergenio cuja estrutura primária é conhecida de acordo com o mapeamento de epítipo de IgE, os dados de estrutura tri-dimensional ou predição auxiliada por computador de domínios expostos por superfície. Entretanto, a seleção de peptídeos adequados que podem ser usados para a vacinação permanecer crucial, porque nem todos os peptídeos identificados com estes métodos podem ser utilizados na vacinação. Os peptídeos adequadamente usados para os propósitos de vacinação devem apresentar capacidade de ligação de IgE reduzida e – a fim de reduzir ou evitar os efeitos colaterais tardios – apresenta a reatividade de célula T reduzida.

O termo "derivado de um alergenio", como usado neste, significa que as moléculas hipoalergênicas de acordo com a presente invenção são obtidos diretamente de um alergenio por fragmentação ou truncação. A seqüência de aminoácido das moléculas hipoalergênicas da presente invenção são preferivelmente pelo menos 80 % idênticos, mais preferivelmente pelo menos 90 % idênticos, mais preferivelmente pelo menos 95 % idênticos, em particular 100 % idênticos, para o estiramento da seqüência amino do alergenio do tipo selvagem, a partir do qual a molécula hipoalergênica é derivada. Entretanto, as moléculas que não são 100 % idênticos aos fragmentos de alergenio do tipo selvagem devem ser capazes de ligar-se com pelo menos 60 %, preferivelmente pelo menos 70 %, mais preferivelmente pelo menos 80 %, mais preferivelmente pelo menos 90 % de concentração para um anticorpo ou para anticorpos, preferivelmente a anticorpos de IgG, que são direcionados aos fragmentos de alergenio do tipo selvagem.

Os graus de identidade de uma primeira seqüência de

aminoácido a um segundo aminoácido pode ser determinado por uma comparação direta entre ambas as seqüências de aminoácido usando-se certos algoritmos. Tais algoritmos são, por exemplo, incorporados em vários programas de computador (por exemplo, "BLAST 2 SEQUENCES (blastp)" (Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-25; Corpet F, Nucl. Acids Res. (1988) 16:10881-10890).

As moléculas truncadas de acordo com a presente invenção pode ser definida como as partes sendo do alérgeno completo que induz a ativação menor de células T específicas de alérgeno do que o alérgeno do tipo selvagem completo (preferivelmente pelo menos a 30 %, mais preferivelmente pelo menos uma redução de 50 %, mais preferivelmente pelo menos uma de 70 %), apresenta uma atividade alérgênica maior do que 50 % (preferivelmente maior do que 70 %) como avaliado por ensaios de ligação de IgE e a capacidade de induzir a ativação de célula mediada por IgE e quando ligado a um carreador como descrito induzir os anticorpos de IgG que apresenta a ligação de IgE policlonal de pacientes alérgicos ao alérgeno do tipo selvagem completo.

Os peptídeos devem conter seqüências dos alérgenos para evitar sobreposições com os mimótopos. Os mimótopos, entretanto, que são imitações de peptídeo pequenas (menores do que 15 aminoácidos) de pedaços de antígenos e são obtidos de bibliotecas de peptídeo randômico não representam moléculas derivadas de alérgeno originais como definido neste. Estes não podem ser suados de acordo com a invenção porque estes são muito pequenos para induzir uma resposta de IgG de bloqueio robusto.

As moléculas hipoalérgênicas de acordo com a presente invenção podem ser obtidas pelos métodos recombinantes ou síntese química. Alternativamente, é claro, também é possível obter as moléculas pela clivagem enzimática ou química do alérgeno do tipo selvagem ou um polipeptídeo/proteína que abriga a molécula de interesse.

A molécula hipoalergênica pode compreender preferivelmente pelo menos duas moléculas de alérgeno truncadas derivadas de pelo menos um alérgeno, em que a ordem dos fragmentos de alérgeno truncados diferem da ordem dos fragmentos no alérgeno do tipo selvagem se pelo menos as duas moléculas forem derivadas do mesmo alérgeno.

A molécula hipoalergênica de acordo com a presente invenção pode compreender uma ou mais (preferivelmente pelo menos 2, mais preferivelmente pelo menos 3) moléculas hipoalergênicas como definido neste, desta maneira, resultando em uma proteína de fusão. As moléculas hipoalergênicas simples da proteína de fusão que, é claro, também precisa da capacidade de ligação de IgE e precisa de epítomos de célula T, podem ser derivadas de alérgenos da mesma origem e/ou diferente. Se as moléculas forem derivadas do mesmo alérgeno, a ordem na proteína de fusão hipoalergênica não deve ser idêntica à ordem no alérgeno do tipo selvagem (isto evita a reconstituição e a formação de locais de ligação) (ver, por exemplo, WO2004/065414, Linhart B and Valenta R (Int Arch Allergy Immunol. (2004) 134:324-31)).

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção a pelo menos uma molécula hipoalergênica é fundida ao terminal N e/ou terminal C da dita pelo menos uma segunda proteína ou fragmento desta.

O alérgeno ou os fragmentos deste podem ser conjugados quimicamente, por exemplo, ou pelos métodos recombinantes um ao outro. Se o alérgeno ou fragmento deste for conjugado quimicamente a um carreador, o dito alérgeno ou fragmento deve ser fornecido com um resíduo de cisteína terminal (resultando em um grupo sulfidril livre). Ao dito resíduo de cisteína terminal, (terminal N ou C) qualquer proteína carreadora ativada por maleimida pode ser conjugada, desta maneira, criando um complexo de imunogênio/carreador. Se o alérgeno ou fragmento deste não tiver um grupo sulfidril em um terminal, química EDC (cloridreto de 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil) carbodiimida) a fim de ligar as aminas (lisina) ou ácidos carboxílicos (ácido glutâmico, aspártico ou 5'-fosfato) à proteína carreadora pode ser utilizada.

Se a molécula hipoalergênica fundida ao terminal N ou C do carreador, métodos recombinantes são utilizados.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção a pelo menos uma segunda proteína é uma proteína viral, em particular RNA ou DNA viral, bacteriana, fúngica ou de protozoário.

A pelo menos uma segunda proteína ("carreador") pode ser de qualquer um da origem mencionada acima. Entretanto, em particular é preferido usar proteínas que provoquem uma resposta imune contra a proteína, por si só e a molécula hipoalergênica fundida ou conjugada a este. Devido à indução de formação de anticorpos (protetores) também direcionados a pelo menos uma segunda proteína, a proteína hipoalergênica de acordo com a presente invenção também pode ser utilizada como vacina para a dita segunda proteína e sua fonte de origem (por exemplo, vírus, bactérias, fungos). É claro, também é possível usar proteínas carreadoras bem conhecidas na técnica (por exemplo, KLH) pelo menos como a segunda proteína.

A proteína viral de acordo com a presente invenção é, preferivelmente uma proteína de capsídeo.

As proteínas de capsídeo virais são especialmente adaptadas porque estas induzem a atividade antiviral, provocam a formação de anticorpos com adesão de bloco de vírus, por exemplo, rinovírus, a células epiteliais, apresentam uma atividade imunomoduladora em torno de uma resposta de Th1, aumenta a imunogenicidade do peptídeo (isto é, antipeptídeo superior e em consequência, níveis superiores de anticorpos IgG protetores), são adaptados e experimentados para a vacinação profilática (vacinação viral) e são seguros, quando as proteínas de capsídeo são usadas naqueles seres

humanos estão continuamente expostos (por exemplo, rinovírus).

De acordo com uma outra forma de realização preferida da presente invenção a pelo menos uma proteína de capsídeo viral é derivada de um vírus patogênico humano, preferivelmente um vírus da família de pi-
5 cornaviridae.

O vírus da família de picornaviridae é, preferivelmente do gênero de rinovírus, preferivelmente das espécies de rinovírus humanos, em particular, rinovírus humano 89 e 14. A proteína de capsídeo pode ser VP1, VP2, VP3 e/ou VP4.

10 O alérgeno a ser fundido a uma proteína de capsídeo viral é preferivelmente selecionado do grupo que consiste de alérgenos de pólen de bétula principal, em particular Bet v 1 e Bet v 4, alérgenos de pólen de capim-rabo-de-rato principal, em particular Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 e Phl p 7, alérgenos de ácaro do pó doméstico, em particular Der p 1 e Der p 2,
15 alérgeno de gato principal Fel d 1, alérgenos de abelha principais, alérgenos de vespa principais, profilinas, especialmente Phl p 12 e alérgenos de ácaro de armazenagem, especialmente Lep d 2.

Outros alérgenos adaptados a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser derivados da seguinte tabela.

ALERGENOS

Nome das Espécies	Nome do alérgeno	ID Biochem. ou nome obsoleto	MW proteína	cDNA (C) ou (P) Acc.No.	Referência,
Ambrosia artemisiifolia					
erva de santiago curta					
	Amb a 1	antígeno E	8	C	8, 20
	Amb a 2	antígeno K	38	C	8, 21
	Amb a 3	Ra3	11	C	22
	Amb a 5	Ra5	5	C	11, 23
	Amb a 6	Ra6	10	C	24, 25
	Amb a 7	Ra7	12	P	26
Ambrosia trifida					
erva de santiago gigante					
	Amb t 5	Ra5G	4.4	C	9, 10, 27
Artemisia vulgaris					
artemísia					

	Art v 1		27-29	C	28
	Art v 2		35	P	28A
	Art v 3	proteína de transf. de lipídeo	12	P	53
	Art v 4	profilina 14	C	29	
<i>Helianthus annuus</i>					
<i>girassol</i>					
	Hel a 1		34		29A
	Hel a 2	profilina	15.7	C	Y15210
<i>Mercurialis annua</i>					
	Mer a 1	profilina	14-15	C	Y13271
<i>Caryophyllales</i>					
<i>Chenopodium album</i>					
<i>lamb's-quarter, erva-formigueira,</i>					
	Che a 1		17	C	AY049012, 29B
<i>goosefoot branco</i>					
	Che a 2	profilina	14	C	AY082337
	Che a 3	polcalcina	10	C	AY082338
<i>Salsola kali</i>					
<i>cardo russo</i>					
	Sal k 1		43	P	29C
<i>Rosales</i>					
<i>Humulus japonicus</i>					
<i>Japanese hop</i>					
	Hum j 4w		C		AY335187
<i>Parietaria judaica</i>					
	Par j 1	proteína de transf. de lipídeo 1	15	C	ver lista dos isoalergenos
	Par j 2	proteína de transf. de lipídeo 2		C	ver lista dos isoalergenos
	Par j 3	profilina	C		ver lista dos isoalergenos
<i>Parietaria officinalis</i>					
	Par o 1	proteína de transf. de lipídeo	15		29D
<i>B. Grasses</i>					
<i>Poales</i>					
<i>Cynodon dactylon</i>					
<i>grama de Bermuda</i>					
	Cyn d 1		32	C	30, S83343
	Cyn d 7			C	31, X91256
	Cyn d 12	profilina	14	C	31a, Y08390
	Cyn d 15		9	C	AF517686
	Cyn d 22w	enolase		data	pendente
	Cyn d 23	Cyn d 14	9	C	AF517685
	Cyn d 24	p.relacionado com patogênese	21	P	pendente
<i>Dactylis glomerata</i>					
<i>grama orchard</i>					
	Dac g 1	AgDg1	32	P	32
	Dac g 2		11	C	33, S45354
	Dac g 3			C	33A, U25343
	Dac g 5		31	P	34
<i>Festuca pratensis</i>					
<i>festuca do prado</i>					

	Fes p 4w		60	-	
Holcus lanatus					
grama veludo	Hol l 1			C	Z27084
Lolium perenne					
grama do centeio	Lol p 1 grupo I	27	C		35, 36
	Lol p 2 grupo II	11	P		37, 37A, X73363
	Lol p 3 grupo III	11	P		38
	Lol p 5 Lol p IX, Lol p Ib	31/35	C		34, 39
	Lol p 11 hom: inib. de tripsina	16			39A
Phalaris aquatica					
grama de canário	Pha a 1			C	40, S80654
Phleum pratense					
Capim rabo-de rato	Phl p 1	27	C		X78813
	Phl p 2		C		X75925, 41
	Phl p 4		P		41A
	Phl p 5 Ag25	32	C		42
	Phl p 6		C		Z27082, 43
	Phl p 11 inib. de tripsina hom.	20	C		AF521563, 43A
	Phl p 12 profilina		C		X77583, 44
	Phl p 13 poligalacturonase	55-60	C		AJ238848
Poa pratensis					
grama azul do Kentucky	Poa p 1 grupo I	33	P		46
	Poa p 5	31/34	C		34, 47
Sorghum halepense					
grama de Johnson	Sor h 1			C	48
C. Trees					
Arecales					
Phoenix dactylifera					
tamareira	Pho d 2 profilina	14,3	C		Asturias p.c.
Fagales					
Alnus glutinosa					
amireiro	Aln g 1	17	C		S50892
Betula verrucosa					
betula	Bet v 1	17	C		ver lista dos isoalergenos
	Bet v 2 profilina	15	C		M65179
	Bet v 3		C		X79267
	Bet v 4	8	C		X87153, S54819
	Bet v 6 h: isoflavona redutase	33.5	C		ver lista dos isoalergenos
	Bet v 7 ciclofilina	18	P		P81531
Carpinus betulus					
Árvore em forma de chifre	Car b 1	17	C		ver lista dos isoalergenos
Castanea sativa					
castanheira					

	Cas s 1	22	P	52
	Cas s 5 chitinase			
	Cas s 8 proteína de transf. de lipídeo	9.7	P	53
<i>Corylus avellana</i>				
aveleira	Cor a 1	17	C	ver lista dos isoalergenos
	Cor a 2 profilina	14	C	
	Cor a 8 proteína de transf. de lipídeo	9	C	
	Cor a 9 11S prot. semelhante à globulina	40/?	C	Beyer p.c.
	Cor a 10 prot. de ligação luminal	70	C	AJ295617
	Cor a 11 7S prot. semelhante a vicilina	48	C	AF441864
<i>Quercus alba</i>				
carvalho branco				
	Que a 1	17	P	54
Lamiales				
Oleaceae				
<i>Fraxinus excelsior</i>				
freixo	Fra e 1	20	P	58A, AF526295
<i>Ligustrum vulgare</i>				
alfena	Lig v 1	20	P	58A
<i>Olea europea</i>				
oliveira	Ole e 1	16	C	59, 60
	Ole e 2 profilina	15-18	C	60A
	Ole e 3	9.2		60B
	Ole e 4	32	P	P80741
	Ole e 5 superóxido dismutase	16	P	P80740
	Ole e 6	10	C	60C, U86342
	Ole e 7	?	P	60D, P81430
	Ole e 8 prot. de ligação de Ca ²⁺	21	C	60E, AF078679
	Ole e 9 beta-1,3-glucanase	46	C	AF249675
	Ole e 10 glicosil hidrolase hom. 11	C		60F, AY082335
<i>Syringa vulgaris</i>				
lilás	Syr v 1	20	P	58A
Plantaginaceae				
<i>Plantago lanceolata</i>				
English plantain				
	Pla l 1	18	P	P842242
Pinales				
<i>Cryptomeria japonica</i>				
sugi	Cry j 1	41-45	C	55, 56
	Cry j 2		C	57, D29772
<i>Cupressus arisonica</i>				
cipreste				
	Cup a 1	43	C	A1243570
<i>Cupressus sempervirens</i>				
cipreste comum				
	Cup s 1	43	C	ver lista dos isoalergenos
	Cup s 3w	34	C	ref pendente
<i>Juniperus ashei</i>				
cedro da montanha				
	Jun a 1	43	P	P81294
	Jun a 2		C	57A, AJ404653
	Jun a 3	30	P	57B, P81295

Juniperus oxycedrus				
junípero espinhoso				
	Jun o 4 hom: calmodulina	29	C	57C, AF031471
Juniperus sabinoides				
cedro da montanha				
	Jun s 1	50	P	58
Juniperus virginiana				
cedro vermelho oriental				
	Jun v 1	43	P	P81825, 58B
Platanaceae				
Platanus acerifolia				
árvore plana London				
	Pla a 1	18	P	P82817
	Pla a 2	43	P	P82967
	Pla a 3 proteína de transf. de lipídeo	10	P	Iris p.c.
D. Mites				
Acarus siro				
arthropod				
mite				
	Aca s 13 prot. de ligação de ácido graxo	14*	C	AJ006774
Blomia tropicalis				
mite				
	Blo t 1 cisteína protease	39	C	AF277840
	Blo t 3 tripsina	24*	C	Cheong p.c.
	Blo t 4 alfa amilase	56	C	Cheong p.c.
	Blo t 5		C	U59102
	Blo t 6 quimotripsina	25	C	Cheong p.c.
	Blo t 10 tropomiosina	33	C	61
	Blo t 11 paramiosina	110	C	AF525465, 61A
	Blo t 12 Bt11a		C	U27479
	Blo t 13 Bt6, prot. de lig. de ácido graxo		C	U58106
	Blo t 19 anti-microbial pep. hom.	7.2	C	Cheong p.c.
Dermatophagoides farinae				
ácaro do pó doméstico americano				
	Der f 1 cisteína protease	25	C	69
	Der f 2	14	C	70, 70A, ver lista dos isoalergenos
	Der f 3 tripsina	30	C	63
	Der f 7	24-31	C	SW:Q26456, 71
	Der f 10 tropomiosina		C	72
	Der f 11 paramiosina	98	C	72A
	Der f 14 mag3, apolipoporina		C	D17686
	Der f 15 98k chitinase	98	C	AF178772
	Der f 16 gelsolina/villina	53	C	71A
	Der f 17 Proteína EF de ligação de Ca	53	C	71A
	Der f 18w 60k chitinase	60	C	Weber p.c.
Dermatophagoides microceras				
Acarino do pó doméstico				
	Der m 1 cisteína protease	25	P	68
Dermatophagoides pteronyssinus				
ácaro do pó doméstico europeu				
	Der p 1 antígeno P1, cisteína protease	25	C	62, ver lista dos isoalergenos
	Der p 2	14	C	62A-C, ver lista dos isoalergenos
	Der p 3 tripsina	28/30	C	63
	Der p 4 amilase	60	P	64
	Der p 5	14	C	65

	Der p 6	quimotripsina	25	P	66
	Der p 7		22/28	C	67
	Der p 8	glutathione transferase	C	67A	
	Der p 9	collagenolytic serine pro.		P	67B
	Der p 10	tropomiosina	36	C	Y14906
	Der p 14	apolipoporina igual prot.		C	Epton p.c.
<i>Euroglyphus maynei</i>					
ácaro	Eur m 2			C	ver lista dos isoalergenos
	Eur m 14	apolipoporina	177	C	AF149827
<i>Glycyphagus domesticus</i>					
Acarino de armazenamento					
	Gly d 2			C	72B, ver lista dos isoalergenos
<i>Lepidoglyphus destructor</i>					
Acarino de armazenamento					
	Lep d 2	Lep d 1	15	C	73, 74, 74A, ver lista dos isoalergenos
	Lep d 5			C	75, AJ250278
	Lep d 7			C	75, AJ271058
	Lep d 10	tropomiosina		C	75A, AJ250096
	Lep d 13			C	75, AJ250279
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>					
Acarino de armazenamento					
	Tyr p 2			C	75B, Y12690
E. Animals					
<i>Bos domesticus</i>					
ácaro de gado doméstico					
	Bos d 2	Ag3, lipocalina	20	C	76, ver lista dos isoalergenos
(veja também os alimentos)					
	Bos d 3	Ligação-Ca S100 hom.	11	C	L39834
	Bos d 4	alfa-lactalbumina	14.2	C	M18780
	Bos d 5	beta-lactoglobulina	18.3	C	X14712
	Bos d 6	albumina de soro	67	C	M73993
	Bos d 7	imunoglobulina	160		77
	Bos d 8	caseinas	20-30		77
<i>Canis familiaris</i>					
(Canis domesticus)					
	Can f 1		25	C	78, 79
cão	Can f 2		27	C	78, 79
	Can f 3	albumina		C	S72946
	Can f 4		18	P	A59491
<i>Equus caballus</i>					
cavalo doméstico					
	Equ c 1	lipocalina	25	C	U70823
	Equ c 2	lipocalina	18.5	P	79A, 79B
	Equ c 3	Ag3 - albumina	67	C	79C, X74045
	Equ c 4		17	P	79D
	Equ c 5	AgX	17	P	Goubran Botros p.c.
<i>Felis domesticus</i>					
gato (saliva)					
	Fel d 1	cat-1	38	C	15
	Fel d 2	albumina		C	79E, X84842

	Fel d 3	cistatina	11	C	79F, AF238996
	Fel d 4	lipocalina	22	C	AY497902
	Fel d 5w	imunoglobulina A	400		Adedoyin p.c.
	Fel d 6w	imunoglobulina M			
800- 1000		Adedoyin p.c.			
	Fel d 7w	imunoglobulina G	150		Adedoyin p.c.
<i>Cavia porcellus</i> porquinho da Índia					
	Cav p 1	homólogo de lipocalina	20	P	SW:P83507, 80
	Cav p 2		17	P	SW:P83508
<i>Mus musculus</i> camundongo (urina)					
	Mus m 1	MUP	19	C	81, 81A
<i>Rattus norvegicus</i> rato (urina)					
	Rat n 1		17	C	82, 83
F. Fungi (moulds)					
1. Ascomycota					
1.1 Dothideales					
<i>Alternaria alternata</i>					
	Alt a 1		28	C	U82633
	Alt a 2		25	C	83A, U62442
	Alt a 3	prot. de choque por calor.	70	C	U87807, U87808
	Alt a 4	prot. dissulfideisomerase	57	C	X84217
	Alt a 6	prot. ribossômica ácida P2	11	C	X78222, U87806
	Alt a 7	proteína YCP4	22	C	X78225
	Alt a 10	aldeído desidrogenase	53	C	X78227, P42041
	Alt a 11	enolase	45	C	U82437
	Alt a 12	prot. de ácido ribossômico P1	11	C	X84216
<i>Cladosporium herbarum</i>					
	Cla h 1		13		83B, 83C
	Cla h 2		23		83B, 83C
	Cla h 3	aldeído desidrogenase	53	C	X78228
	Cla h 4	prot. de ácido ribossômico P2	11	C	X78223
	Cla h 5	Proteína YCP4	22	C	X78224
	Cla h 6	enolase	46	C	X78226
	Cla h 12	prot. de ácido ribossômico P1	11	C	X85180
1.2 Eurotiales					
<i>Aspergillus flavus</i>					
	Asp fl 13	serina protease alcalina	34		84
<i>Aspergillus fumigatus</i>					
	Asp f 1		18	C	M83781, S39330
	Asp f 2		37	C	U56938
	Asp f 3	proteína peroxissômica	19	C	U20722
	Asp f 4		30	C	AJ001732
	Asp f 5	metaloprotease	40	C	Z30424
	Asp f 6	Mn superóxido dismut.	26.5	C	U53561
	Asp f 7		12	C	AJ223315
	Asp f 8	prot. ribosomal P2	11	C	AJ224333
	Asp f 9		34	C	AJ223327

Asp f 10	protease aspártica	34	C	X85092
Asp f 11	peptidil-prolil isomerase	24		84A
Asp f 12	prot. de choque por calor P90	90	C	85
Asp f 13	serina protease alcalina 34			84B
Asp f 15		16	C	AJ002026
Asp f 16		43	C	g3643813
Asp f 17			C	AJ224865
Asp f 18	serina protease vacuolar	34		84C
Asp f 22w	enolase	46	C	AF284645
Asp f 23 L3	proteína ribosomal	44	C	85A, AF464911
<i>Aspergillus niger</i>				
Asp n 14	beta-xilosidase	105	C	AF108944
Asp n 18	serina protease vacuolar	34	C	84B
Asp n 25	3-fitase B	66-100	C	85B, P34754
Asp n ?		85	C	Z84377
<i>Aspergillus oryzae</i>				
Asp o 13	serina protease alcalina	34	C	X17561
Asp o 21	TAKA-amilase A	53	C	D00434, M33218
<i>Penicillium brevicompactum</i>				
Pen b 13	serina protease alcalina	33		86A
<i>Penicillium chrysogenum</i> (formerly <i>P. notatum</i>)				
Pen ch 13	serina protease alcalina	34		87
Pen ch 18	serina protease vacuolar	32		87
Pen ch 20	N-acetil glucosaminidas	68		87A
<i>Penicillium citrinum</i>				
Pen c 3	peroxisomal mem. prot.	18		86B
Pen c 13	serina protease alcalina	33		86A
Pen c 19	prot. de choque por calor P70	70	C	U64207
Pen c 22w	enolase	46	C	AF254643
Pen c 24	alongamento fator beta 1		C	AY363911
<i>Penicillium oxalicum</i>				
Pen o 18	serina protease vacuolar	34		87B
1.3 Hypocreales				
<i>Fusarium culmorum</i>				
Fus c 1	proteína ribosomal P2	11*	C	AY077706
Fus c 2	proteína tipo tioredoxina	13*	C	AY077707
1.4 Onygenales				
<i>Trichophyton rubrum</i>				
Tri r 2			C	88
Tri r 4	serina protease		C	88
<i>Trichophyton tonsurans</i>				
Tri t 1		30	P	88A
Tri t 4	serina protease	83	C	88
1.5 Saccharomycetales				
<i>Candida albicans</i>				
Cand a 1		40	C	89
Cand a 3	proteína peroxissômica	29	C	AY136739
<i>Candida boidinii</i>				
Cand b 2		20	C	J04984, J04985
2. Basidiomycotina				

2.1 Hymenomycetes					
Psilocybe cubensis					
	Psi c 1				
	Psi c 2	ciclofilina	16		89A
Coprinus comatus					
Pileo felpudo					
	Cop c 1	proteína de leucina tipo zíper	11	C	AJ132235
	Cop c 2				AJ242791
	Cop c 3				AJ242792
	Cop c 5				AJ242793
	Cop c 7				AJ242794
2.2 Urediniomycetes					
Rhodotorula mucilaginosa					
	Rho m 1	enolase	47	C	89B
	Rho m 2	serina protease vacuolar	31	C	AY547285
2.3 Ustilaginomycetes					
Malassezia furfur					
	Mala f 2	MF1, membrana de proteína peroxisomal	21	C	AB011804, 90
	Mala f 3	MF2, membrana de proteína peroxisomal	20	C	AB011805, 90
	Mala f 4	malato desidrogenase mitocondrial	35	C	AF084828, 90A
Malassezia sympodialis					
	Mala s 1			C	X96486, 91
	Mala s 5		18*	C	AJ011955
	Mala s 6		17*	C	AJ011956
	Mala s 7			C	AJ011957, 91A
	Mala s 8		19*	C	AJ011958, 91A
	Mala s 9		37*	C	AJ011959, 91A
	Mala s 10	prot. de choque por calor 70	86	C	AJ428052
	Mala s 11	Mn superóxido dismut.	23	C	AJ548421
3. Deuteromycotina					
3.1 Tuberculariales					
Epicoccum purpurascens (formerly E. nigrum)					
	Epi p 1	serina protease	30	P	SW:P83340, 91B
G. Insects					
Aedes aegyptii mosquito					
	Aed a 1	apyrase	68	C	L12389
	Aed a 2		37	C	M33157
Apis mellifera abelha					
	Api m 1	fosfolipase A2	16	C	92
	Api m 2	hialuronidase	44	C	93
	Api m 4	melittina	3	C	94
	Api m 6		7-8	P	Kettner p.c.
	Api m 7	CUB serina protease	39	C	AY127579
Bombus pennsylvanicus abelhão					
	Bom p 1	fosfolipase	16	P	95

Bom p 4 protease		P	95	
Blattella germanica				
barata alemã				
Bla g 1 Bd90k			C	
Bla g 2 protease aspártica	36	C		96
Bla g 4 calycin	21	C		97
Bla g 5 transferase glutationa	22	C		98
Bla g 6 troponin C	27	C		98
Periplaneta americana				
barata americana				
Per a 1 Cr-P11		C		
Per a 3 Cr-P1	72-78	C		98A
Per a 7 tropomiosina	37	C		Y14854
Chironomus kiiensis				
Mosquito-pólvora Chi k 10 tropomiosina	32.5*	C		AJ012184
Chironomus thummi thummi				
Mosquito-pólvora Chi t 1-9 hemoglobina	16	C		99
Chi t 1.01 componente III	16	C		P02229
Chi t 1.02 componente IV	16	C		P02230
Chi t 2.0101 componente I	16	C		P02221
Chi t 2.0102 componente IA	16	C		P02221
Chi t 3 componente II-beta	16	C		P02222
Chi t 4 componente IIIA	16	C		P02231
Chi t 5 componente VI	16	C		P02224
Chi t 6.01 componente VIIA	16	C		P02226
Chi t 6.02 componente IX	16	C		P02223
Chi t 7 componente VIIB	16	C		P02225
Chi t 8 componente VIII	16	C		P02227
Chi t 9 componente X	16	C		P02228
Ctenocephalides felis felis				
pulga do gato				
Cte f 1				
Cte f 2 M1b	27	C		AF231352
Cte f 3	25	C		
Thaumatococcus panyocampa				
mariposa de cortejo de pinheiro				
Tha p 1	15	P		PIR:A59396, 99A
Lepisma saccharina				
camarupim				
Lep s 1 tropomiosina	36	C		AJ309202
Dolichovespula maculata				
vespão da face branca				
Dol m 1 fosfolipase A1	3	5	C	100
Dol m 2 hialuronidase		44	C	101
Dol m 5 antígeno 5		23	C	102, 103
Dolichovespula arenaria				
vespão amarelo				
Dol a 5 antígeno 5		23	C	104
Polistes annularis				
vespa				
Pol a 1 fosfolipase A1	35	P		105
Pol a 2 hialuronidase		44	P	105
Pol a 5 antígeno 5		23	C	104

Polistes dominulus

vespa de papel do mediterrâneo

Pol d 1					Hoffman p.c.
Pol d 4 serina protease		32-34	C		Hoffman p.c.
Pol d 5					P81656

Polistes exclamans

vespa	Pol e 1	fosfolipase A1	34	P	107
	Pol e 5	antígeno 5	23	C	104

Polistes fuscatus

vespa	Pol f 5	antígeno 5	23	C	106
-------	---------	------------	----	---	-----

Polistes gallicus

vespa	Pol g 5	antígeno 5	24	C	P83377
-------	---------	------------	----	---	--------

Polistes metricus

vespa	Pol m 5	antígeno 5	23	C	106
-------	---------	------------	----	---	-----

Vespa crabro

vespão europeu

Vesp c 1 fosfolipase	34	P		107
Vesp c 5 antígeno 5	23	C		106

Vespa mandarina

vespão asiático gigante

Vesp m 1					Hoffman p.c.
Vesp m 5					P81657

Vespula flavopilosa

jaqueta amarela	Ves f 5	antígeno 5	23	C	106
-----------------	---------	------------	----	---	-----

Vespula germanica

jaqueta amarela	Ves g 5	antígeno 5	23	C	106
-----------------	---------	------------	----	---	-----

Vespula maculifrons

jaqueta amarela

Ves m 1 fosfolipase A1	33.5	C		108
Ves m 2 hialuronidase		44	P	109
Ves m 5 antígeno 5	23	C		104

Vespula pennsylvanica

jaqueta amarela

Ves p 5	antígeno 5	23	C	106
---------	------------	----	---	-----

Vespula squamosa

jaqueta amarela

Ves s 5	antígeno 5	23	C	106
---------	------------	----	---	-----

Vespula vidua

vespa	Ves vi 5	antígeno 5	23	C	106
-------	----------	------------	----	---	-----

Vespula vulgaris

jaqueta amarela

Ves v 1 fosfolipase A1	35	C		105A
Ves v 2 hialuronidase	44	P		105A
Ves v 5 antígeno 5	23	C		104

Myrmecia pilosula

formiga saltadora australiana

Myr p 1		C		X70256
Myr p 2		C		S81785

Solenopsis geminata

formiga do fogo tropical

Sol g 2				Hoffman p.c.
Sol g 4				Hoffman p.c.

Solenopsis invicta					
formiga do fogo	Sol i 2		13	C	110, 111
	Sol i 3		24	C	110
	Sol i 4		13	C	110
Solenopsis saevissima					
formiga do fogo brasileira	Sol s 2				Hoffman p.c.
Triatoma protracta					
California kissing bug	ou	bicho kissing da Califórnia			
	Tria p 1	Procalina	20	C	AF179004, 111A.
H. Foods					
Gadus callarias					
bacalhau	Gad c 1	allergen M	12	C	112, 113
Salmo salar					
salmão do atlântico	Sal s 1	parvalbumina	12	C	X97824
Bos domesticus					
gado doméstico	Bos d 4	alfa-lactalbumina	14.2	C	M18780
(leite)	Bos d 5	beta-lactoglobulina	18.3	C	X14712
ver também animais	Bos d 6	albumina de soro	67	C	M73993
	Bos d 7	imunoglobulina	160		77
	Bos d 8	caseínas	20-30		77
Cyprinus carpio					
(carpa comum)	Cyp c 1	parvalbumina	12	C	129
Gallus domesticus					
frango	Gal d 1	ovomucóide	28	C	114, 115
	Gal d 2	ovalbumina	44	C	114, 115
	Gal d 3	Ag22, conalbumina	78	C	114, 115
	Gal d 4	lisozima	14	C	114, 115
	Gal d 5	albumina de soro	69	C	X60688
Metapenaeus ensis					
camarão	Met e 1	tropomiosina		C	U08008
Penaeus aztecus					
camarão	Pen a 1	tropomiosina	36	P	116
Penaeus indicus					
camarão	Pen i 1	tropomiosina	34	C	116A
Penaeus monodon					
camarão tigre negro	Pen m 1	tropomiosina	38	C	
	Pen m 2	quinase arginina	40	C	AF479772, 117
Todarodes pacificus					
lula	Tod p 1	tropomiosina	38	P	117A
Helix aspersa					
lesma marrom de jardim	Hel as 1	tropomiosina	36	C	Y14855, 117B
Haliotis midae					
abalone					

	Hal m 1		49		117C
Rana esculenta					
rã comestível					
	Ran e 1	parvalbumina alfa	11.9*	C	AJ315959
	Ran e 2	parvalbumina beta	11.7*	C	AJ414730
Brassica juncea					
mostarda oriental					
	Bra j 1	2S albumina	14	C	118
Brassica napus					
semente de colza					
	Bra n 1	2S albumina	15	P	118A, P80208
Brassica rapa					
nabo	Bra r 2	hom: prohevein	25		P81729
Hordeum vulgare					
cevada					
	Hor v 15	BMAl-1	15	C	119
	Hor v 16	alfa-amilase			
	Hor v 17	beta-amilase			
	Hor v 21	gama-3 hordeina	34	C	119A,
SW:P80198					
Secale cereale					
centeio	Sec c 20	secalina			see isoall. list
Triticum aestivum					
trigo					
	Tri a 18	aglutinina			
	Tri a 19	omega-5 gliadina	65	P	PIR:A59156
Zea mays					
maise, milho					
	Zea m 14	prot. de transf. De lipídio	9	P	P19656
Oryza sativa					
arroz	Ory s 1			C	119B, U31771
Apium graveolens					
aipo					
	Api g 1	hom: Bet v 1	16*	C	Z48967
	Api g 4	profilina			AF129423
	Api g 5		55/58	P	P81943
Daucus carota					
cenoura					
	Dau c 1	hom: Bet v 1	16	C	117D, ver lista dos isoalergenos
	Dau c 4	profilina		C	AF456482
Corylus avellana					
avelã					
	Cor a 1.04	hom: Bet v 1	17	C	ver lista dos isoalergenos
	Cor a 2	profilina	14	C	AF327622
	Cor a 8	proteína de transf. de lipídeo	9	C	AF329829
Malus domestica					
maçã					
	Mal d 1	hom: Bet v 1		C	ver lista dos isoalergenos
	Mal d 2	hom: thaumatin		C	AJ243427
	Mal d 3	proteína de transf. de lipídeo	9	C	Pastorello p.c.
	Mal d 4	profilina	14.4*	C	ver lista dos isoalergenos
Pyrus communis					
pêra					
	Pyr c 1	hom: Bet v 1	18	C	AF05730
	Pyr c 4	profilina	14	C	AF129424
	Pyr c 5	hom: isoflavona reductase	33.5	C	AF071477
Persea americana					
abacate	Pers a 1	endoquitinase	32	C	Z78202

Prunus armeniaca					
abricó					
	Pru ar 1	hom: Bet v 1		C	U93165
	Pru ar 3	proteína de transf. de lipídeo	9	P	
Prunus avium					
cereja doce					
	Pru av 1	hom: Bet v 1		C	U66076
	Pru av 2	hom: thaumatin		C	U32440
	Pru av 3	proteína de transf. de lipídeo	10	C	AF221501
	Pru av 4	profilina	15	C	AF129425
Prunus domestica					
ameixa européia					
	Pru d 3	proteína de transf. de lipídeo	9	P	119C
Prunus persica					
pêssego					
	Pru p 3	proteína de transf. de lipídeo	10	P	P81402
	Pru p 4	profilina	14	C	ver lista dos isoalergenos
Asparagus officinalis					
aspargo					
	Aspa o 1	proteína de transf. de lipídeo	9	P	119D
Crocus sativus					
açafrão					
	Cro s 1		21		Varasteh A-R p.c.
Lactuca sativa					
alface					
	Lac s 1	proteína de transf. de lipídeo	9		Vieths p.c.
Vitis vinifera					
uva					
	Vit v 1	proteína de transf. de lipídeo	9	P	P80274
Musa x paradisiaca					
banana					
	Mus xp 1	profilina	15	C	AF377948
Ananas comosus					
abacaxi					
	Ana c 1	profilina	15	C	AF377949
	Ana c 2	bromelaina	22.8*	C	119E-G, D14059
Citrus limon					
limão					
	Cit l 3	prot. de transf. de lipídeo	9	P	Torrejon p.c.
Citrus sinensis					
laranja doce					
	Cit s 1	proteína tipo germin	23	P	Torrejon p.c.
	Cit s 2	profilina	14	P	Torrejon p.c.
	Cit s 3	proteína de transf. de lipídeo	9	P	Torrejon p.c.
Litchi chinensis					
lechia					
	Lit c 1	profilina	15	C	AY049013
Sinapis alba					
mostarda amarela					
	Sin a 1	2S albumina	14	C	120
Glycine max					
soja					
	Gly m 1	HPS	7	P	120A
	Gly m 2		8	P	A57106
	Gly m 3	profilina	14	C	ver lista dos isoalergenos
	Gly m 4	(SAM22) PR-10 prot.	17	C	X60043, 120B
Vigna radiata					
feijão mung					
	Vig r 1	proteína PR-10	15	C	AY792956

<i>Arachis hypogaea</i>					
amendoim	Ara h 1	vicilina	63.5	C	L34402
	Ara h 2	conglutina	17	C	L77197
	Ara h 3	glicinina	60	C	AF093541
	Ara h 4	glicinina	37	C	AF086821
	Ara h 5	profilina	15	C	AF059616
	Ara h 6	hom: conglutina	15	C	AF092846
	Ara h 7	hom: conglutina	15	C	AF091737
	Ara h 8	proteína PR-10	17	C	AY328088
<i>Lens culinaris</i>					
lentilha	Len c 1	vicilina	47	C	ver lista dos isoalergenos
	Len c 2	prot biotilada de semente.	66	P	120C
<i>Pisum sativum</i>					
ervilha	Pis s 1	vicilina	44	C	ver lista dos isoalergenos
	Pis s 2	convicilina	63	C	pendente
<i>Actinidia chinensis</i>					
kiwi	Act c 1	cisteína protease	30	P	P00785
	Act c 2	proteína tipo taumatina	24	P	SW:P81370, 121
<i>Capsicum annuum</i>					
pimentão	Cap a 1w	proteína tipo osmotina	23	C	AJ297410
	Cap a 2	profilina	14	C	AJ417552
<i>Lycopersicon esculentum</i>					
tomate	Lyc e 1	profilina	14	C	AJ417553
	Lyc e 2	b-frutofuranosidase	50	C	ver lista dos isoalergenos
	Lyc e 3	prot. de transf. de lipídeo	6	C	U81996
<i>Solanum tuberosum</i>					
batata	Sola t 1	patatina	43	P	P15476
	Sola t 2	inibidor de catepsina D	21	P	P16348
	Sola t 3	inibidor de cisteína protease	21	P	P20347
	Sola t 4	inibidor de protease aspártica	16+4	P	P30941
<i>Bertholletia excelsa</i>					
castanha do Pará	Ber e 1	2S albumina	9	C	P04403, M17146
	Ber e 2	11S proteína de armazenamento de semente de globulina	29	C	AY221641
<i>Juglans nigra</i>					
noz negra	Jug n 1	2S albumina	19*	C	AY102930
	Jug n 2	proteína tipo vicilina	56*	C	AY102931
<i>Juglans regia</i>					
noz inglesa	Jug r 1	2S albumina		C	U66866
	Jug r 2	vicilina	44	C	AF066055
	Jug r 3	proteína de transf. de lipídeo	9	P	Pastorello
<i>Anacardium occidentale</i>					
cajú	Ana o 1	proteína tipo vicilina	50	C	ver lista dos isoalergenos
	Ana o 2	proteína tipo legumina	55	C	AF453947
	Ana o 3	2S albumina	14	C	AY081853
<i>Ricinus communis</i>					
mamona	Ric c 1	2S albumina		C	P01089
<i>Sesamum indicum</i>					

gergelim	Ses i 1 2S albumina	9	C	121A, AF240005
	Ses i 2 2S albumina	7	C	AF091841
	Ses i 3 7S globulina tipo vicilina	45	C	AF240006
	Ses i 4 oleosina	17	C	AAG23840
	Ses i 5 oleosina	15	C	AAD42942
Cucumis melo				
melão almiscarado				
	Cuc m 1 serina protease	66	C	D32206
	Cuc m 2 profilina	14	C	AY271295
	Cuc m 3 patogênese-rel p. PR-1	16*	P	P83834
I. Outros				
Anisakis simplex				
nematódeo				
	Ani s 1	24	P	121B, A59069
	Ani s 2 paramiosina	97	C	AF173004
	Ani s 3 tropomiosina	41	C	121C, Y19221
	Ani s 4	9	P	P83885
Argas reflexus				
pombo carrapato				
	Arg r 1	17	C	AJ697694
Ascaris suum				
verme	Asc s 1	10	P	122
Carica papaya				
mamão	Car p 3w papaina	23,4*	C	122A, M15203
Dendronephthya nipponica				
coral macio				
	Den n 1	53	P	122B
Hevea brasiliensis				
borracha (látex)				
	Hev b 1 fator alongamento	58	P	123, 124
	Hev b 2 1,3-glucanase	34/36	C	125
	Hev b 3	24	P	126, 127
	Hev b 4 componente of	100-	P	128
	microhelix complex	115		
	Hev b 5	16	C	U42640
	Hev b 6.01 hevein precursor	20	C	M36986, p02877
	Hev b 6.02 hevein	5	C	M36986, p02877
	Hev b 6.03 C-terminal fragment	14	C	M36986, p02877
	Hev b 7.01 hom: patatina de B-soro	42	C	U80598
	Hev b 7.02 hom: patatina de C-soro	44	C	AJ223038
	Hev b 8 profilina	14	C	ver lista dos isoalergenos
	Hev b 9 enolase	51	C	AJ132580
	Hev b 10 Mn superóxido dismut.	26	C	ver lista dos isoalergenos
	Hev b 11 quitinase classe 1		C	ver lista dos isoalergenos
	Hev b 12 proteína de transf. de lipídeo	9,3	C	AY057860
	Hev b 13 esterase	42	P	P83269
Homo sapiens				
autoalergenos humanos				
	Hom s 1	73*	C	Y14314
	Hom s 2	10,3*	C	X80909
	Hom s 3	20,1*	C	X89985
	Hom s 4	36*	C	Y17711

Hom s 5	42,6*	C	P02538
Triplochiton scleroxylon obeche	Trip s 1 quitinase classe 1	38,5	P
			Kespohl p.c.

Referências

- 1 Marsh, D.G., and L.R. Freidhoff. 1992. ALBE, an alergen database. IUIS, Baltimore, MD, Edition 1.0.
- 5 2 Marsh, D. G. et al. 1986. Alergen nomenclature. Bull WHO 64:767-770.
- 3 King, T.P. et al. 1964. Biochemistry 3:458-468.
- 4 Lowenstein, H. 1980. Allergy 35:188-191.
- 5 Aukrust, L. 1980. Allergy 35:206-207.
- 10 6 Demerec, M. et al. 1966. Genetics 54:61-75.
- 7 Bodmer, J. G. et al. 1991. Immunogenetics 33:301-309
- 8 Griffith, I.J. et al. 1991. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 96:296-304.
- 9 Roebber, M. et al. 1985. J. Immunol. 134:3062-3069.
- 15 10 Metzler, W. J. et al. 1992. Biochemistry 31:5117-5127.
- 11 Metzler, W. J. et al. 1992. Biochemistry 31:8697-8705.
- 12 Goodfriend, L. et al. 1979. Fed. Proc. 38:1415.
- 13 Ekramoddoullah, A. K. M. et al. 1982. Mol. Immunol. 19:1527-1534.
- 20 14 Ansari, A. A. et al. 1987. J. Allergy Clin. Immunol. 80:229-235.
- 15 Morgenstern, J.P. et al. 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9690-9694.
- 16 Griffith, I.J. et al. 1992. Gene 113:263-268.
- 25 17 Weber, A. et al. 1986. Biochem. Physiol. 83B:321-324.
- 18 Weber, A. et al. 1987. Allergy 42:464-470.
- 19 Stanworth, D. R. et al. 1990. Bulletin WHO 68:109-111.
- 20 Rafnar, T. et al. 1991. J. Biol. Chem. 266: 1229-1236.
- 21 Rogers, B.L. et al. 1991. J. Immunol. 147:2547-2552.

- 22 Klapper, D.G. et al. 1980. *Biochemistry* 19:5729-5734.
- 23 Ghosh, B. et al. 1993. *J. Immunol.* 150:5391-5399.
- 24 Roebber, M. et al. 1983. *J. Immunol.* 131:706-711.
- 25 Lubahn, B., and D.G. Klapper. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:338.
- 26 Roebber, M., and D.G. Marsh. 1991. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:324.
- 27 Goodfriend L. et al. *Mol Immunol* 22: 899-906, 1985.
- 28 Himly M. et al. *FASEB J* 17: 106-108, 2003.
- 10 28A Nilsen, B. M. et al. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:2660-2668.
- 29 Wopfner N. et al. *Biol Chem* 383: 1779-1789, 2002.
- 29A Jimenez A. et al. 1994. *Int Arch Allergy Immunol* 105:297-307
- 29B Barderas R. et al. *Int Arch Allergy Immunol* 127: 47-54, 2002
- 15 29C Carnes J. et al. *Allergy* 56, Supplement 68: 274, 2001.
- 29D Giuliani A. et al. *Allergy* 42: 434-440, 1987.
- 30 Smith,P.M. et al. 1996. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:331-343
- 31 Suphioglu,C. et al. 1997. *FEBS Lett.* 402:167-172.
- 31a Asturias J.A. et al. 1997. *Clin Exp Allergy* 27:1307-1313.
- 20 32 Mecheri, S. et al. 1985. *Allergy Appl. Immunol.* 78:283-289.
- 33 Roberts, A.M. et al. 1993. *Allergy* 48:615-623.
- 33a Guerin-Marchand,C. et al. 1996. *Mol. Immunol.* 33:797-806.
- 34 Klysner, S. et al. 1992. *Olin. Exp. Allergy* 22: 491-497.
- 35 Perez, M. et al. 1990. *J. Biol. Chem.* 265:16210-16215.
- 25 36 Griffith, I. J. et al. 1991. *FEBS Letters* 279:210-215.
- 37 Ansari, A. A. et al. 1989. *J. Biol. Chem.* 264:11181-11185.
- 37a Sidoli,A. et al. 1993. *J. Biol. Chem.* 268:21819-21825.
- 38 Ansari, A. A. et al. 1989. *Biochemistry* 28:8665-8670.
- 39 Singh, M. B. et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:1384-1388.

- 39a van Ree R. et al. 1995. *J Allergy Clin Immunol* 95:970-978.
- 40 Suphioglu, C. and Singh,M.B. 1995. *Clin. Exp. Allergy* 25:853-865
- 41 Dolecek, C. et al. 1993. *FEBS Lett.* 335:299-304.
- 5 41A Fischer S. et al. 1996. *J Allergy Clin Immunol* 98:189-198.
- 42 Matthiesen, F., and H. Lowenstein. 1991. *Clin. Exp. Allergy* 21:297-307.
- 43 Petersen,A. et al. 1995. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108:55-59.
- 10 43A Marknell DeWitt A. et al. *Clin Exp Allergy* 32: 1329-1340, 2002.
- 44 Valenta,R. et al. 1994. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:106-118.
- 46 Esch, R. E., and D. G. Klapper. 1989. *Mol. Immunol.* 26:557-561.
- 15 47 Olsen, E. et al. 1991. *J. Immunol.* 147:205-211.
- 48 Avjioglu, A. et al. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:340.
- 52 Kos T. et al. 1993. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1086-92.
- 20 53 Diaz-Perales A. et al. 2000. *Clin Exp Allergy* 30:1403-1410.
- 54 Ipsen, H., and O.C. Hansen. 1991. *Mot. Immunol.* 28: 1279-1288.
- 55 Taniai, M. et al. 1988. *FEBS Lett.* 239:329-332.
- 56 Griffith, I.J. et al. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:339.
- 25 57 Sakaguchi, M. et al. *Allergy* 45: 309-312, 1990.
- 57A Yokoyama M. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 195-202, 2000.
- 57B Midoro-Horiuti T. et al. *J Immunol* 164: 2188-2192, 2000.
- 57C Tinghino R. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101: 772-777,

- 1998.
- 58 Gross GN et al. Scand J Immunol 8: 437-441, 1978.
- 58A Obispo TM et al. Clin Exp Allergy 23: 311-316, 1993.
- 58B Midoro-Horiuti T. et al. Clin Exp Allergy 31: 771-778, 2001
- 5 59 Lombardero M. et al. Clin. Exp. Allergy 24: 765-770, 1994.
- 60 Villalba, M. et al. Eur. J. Biochem. 216: 863-869, 1993.
- 60A Asturias JA et al. J Allergy Clin Immunol 100: 365-372, 1997.
- 60B Batanero E. et al. Eur J Biochem 241: 772-778, 1996.
- 60C Batanero E. et al. FEBS Lett. 410: 293-296, 1997.
- 10 60D Tejera ML et al. J Allergy Clin Immunol 104: 797-802, 1999.
- 60E Ledesma A. et al. FEBS Lett 466: 192-196, 2000.
- 60F Barral P. et al. J Immunol 172: 3644-3651, 2004.
- 61 Yi FC et al. Clin Exp Allergy 32: 1203-1210, 2002.
- 61A Ramos JD et al. Int Arch Allergy Immunol 126: 286-293,
15 2001.
- 62 Chua, K. Y. et al. J. Exp. Med. 167: 175-182, 1988.
- 62A Chua, K. Y. et al. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91: 118-
123, 1990.
- 62B Smith AM et al. Int Arch Allergy Immunol 124: 61-63, 2001.
- 20 62C Smith AM et al. J Allergy Clin Immunol 107: 977-984, 2001.
- 63 Smith WA, Thomas WR. Int Arch Allergy Immunol 109: 133-
140, 1996
- 64 Lake, F.R. et al. J. Allergy Clin. Immunol. 87: 1035-1042,
1991.
- 25 65 Tovey, E. R. et al. J. Exp. Med. 170: 1457-1462, 1989.
- 66 Yasueda, H., T. Shida, T. Ando, S. Sugiyama, and H.
Yamakawa. 1991. Alergenoic and proteolytic properties of
fourth alergen from Dermatophagoides mites. In: "Dust Mite
Alergenos and Asthma. Report of the 2nd international

- workshop" A. Todt, Ed., UCB Institute of Allergy, Brussels, Belgium, pp. 63-64.
- 67 Shen, H.-D. et al. Clin. Exp. Allergy 23: 934-940, 1993.
- 67A O'Neil GM et al. Biochim Biophys Acta, 1219: 521-528, 1994.
- 5 67B King C. et al. J Allergy Clin Immunol 98: 739-747, 1996.
- 68 Lind P. et al. J. Immunol. 140: 4256-4262, 1988.
- 69 Dilworth, R. J. et al. Clin. Exp. Allergy 21: 25-32, 1991.
- 70 Nishiyama, C. et al. Int. Arch. Allergy Immunol. 101: 159-166, 1993.
- 10 70A Trudinger, M. et al. Clin. Exp. Allergy 21: 33-38, 1991.
- 71 Shen HD et al. Clin Exp Allergy 25: 1000-1006, 1995.
- 71A Tategaki A. et al. ACI International suppl. 1: 74-76, 2000.
- 72 Aki T. et al. J Allergy Clin Immunol 96: 74-83, 1995.
- 72A Tsai L. et al. Clin Exp Allergy 29: 1606-1613, 1999.
- 15 72B Gafvelin G. et al. J Allergy Clin Immunol 107: 511-518, 2001.
- 73 van Hage-Hamsten. et al. J. Allergy Clin. Immunol. 91:353, 1993.
- 74 Varela J. et al. Eur J Biochem 225: 93-98, 1994.
- 74A Schmidt M. et al. FEBS Lett 370: 11-14, 1995.
- 20 75 Eriksson TLJ et al. Eur. J. Biochem. 268: 287-294, 2001.
- 75A Saarne T. et al. Int Arch Allergy Immunol 130: 258-265, 2003.
- 75B Eriksson TL et al. Eur. J. Biochem. 251 (1-2), 443-447, 1998.
- 76 Rautiainen J, Rytönen M, Pelkonen J, Pentikainen J, Perola O, Virtanen T, Zeiler T, Mantyjarvi R. BDA20, a major bovine dander allergen characterised at the sequence level is Bos d 2. Submitted.
- 25 77 Gjesing B, Lowenstein H. Ann Allergy 53:602, 1984.
- 78 de Groot, H. et al. J. Allergy Clin. Immunol. 87:1056-1065, 1991.

- 79 Konieczny, A. Personal communication; Immunologic Pharmaceutical Corp.
- 79A Bulone, V. *Eur J Biochem* 253: 202-211, 1998.
- 79B Swiss-Prot acc. P81216, P81217.
- 5 79C Dandeu J. P. et al. (1993). *J. Chromatogr.* 621:23-31.
- 79D Goubran Botros H. et al. 1998. *J. Chromatogr. B* 710:57-65.
- 79E Hilger C. et al. *Allergy* 52: 179-187; and Hilger C. et al. *Gene* 169:295-296, 1996.
- 79F Ichikawa K. et al. *Clin Exp Allergy*, In Press 2001.
- 10 80 Fahlbusch B. et al. *Allergy* 57: 417-422, 2002.
- 81 McDonald, B. et al. 1988. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:251.
- 81A Clarke, A. J. et al. 1984. *EMBO J* 3:1045-1052.
- 82 Longbottom, J. L. 1983. Characterisation of allergens from the urines of experimental animals. McMillan Press, London, pp. 525-529.
- 15 83 Laperche, Y. et al. 1983. *Cell* 32:453-460.
- 83A Bush RK et al. 1999. *J Allergy Clin Immunol* 104:665-671.
- 83B Aukrust L, Borch SM. 1979. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 60:68-79.
- 20 83C Sward-Nordmo M. et al. 1988. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 85:288-294.
- 84 Shen, et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:S157, 1999.
- 84A Cramer R. Epidemiology and molecular basis of the involvement of *Aspergillus fumigatus* in allergic diseases. *Contrib. Microbiol.* Vol. 2, Karger, Basel (in press).
- 25 84B Shen, et al. (manuscript submitted), 1999
- 84C Shen HD et al. Vacuolar serine proteinase: A major allergen of *Aspergillus fumigatus*. 10th International Congress of Immunology, Abstract, 1998.

- 85 Kumar A. et al. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:1024-1030.
- 85A Saxena S. et al. 2003. *Clin Exp Immunol* 134:86-91.
- 85B Baur X. et al. *Allergy* 57: 943-945, 2002.
- 5 86A Shen HD et al. 1996. *Clin Exp Allergy* 26:444-451.
- 86B Shen, et al. Abstract; The XVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Brussels, Belgium, 3-7 July 1999.
- 87 Shen HD et al. *Clin Exp Allergy* 29: 642-651, 1999.
- 10 87A Shen HD et al. *Clin Exp Allergy* 25: 350-356, 1995.
- 87B Shen HD et al. *J Lab Clin Med* 137: 115-124, 2001.
- 88 Woodfolk JA et al. 1998. *J. Biol Chem* 273: 29489-96.
- 88A Deuell, B. et al. 1991 *J. Immunol.* 147: 96-101
- 89 hen, H. D. et al. 1991 *Clin. Exp. Allergy* 21: 675-681.
- 15 89A Horner WE et al 1995 *Int Arch Allergy Immunol* 107:298-300.
- 89B Chang CY et al *J Biomed Sci* 9: 645-655, 2002.
- 90 Yasueda H. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 240-244, 1998. NB: strain TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) equal to strain CBS1878 (Central Bureau von Schimmelkulturen).
- 20 90A Onishi Y. et al. *Eur J Biochem* 261: 148-154, 1999. NB: strain TIMM2782 (Teikyo University Institute for Medical Mycology) equal to strain CBS1878 (Central Bureau von Schimmelkulturen).
- 25 91 Schmidt M. et al. *Eur J Biochem* 246:181-185, 1997. NB: strain ATCC no. 42132 (American Type Culture Collection).
- 91A Rasool O. et al. *Eur J Biochem* 267: 4355-4361, 2000. NB: strain ATCC no. 42132 (American Type Culture Collection).
- 91B NB: ; strain 4625 (Indian Agricultural Research Institute,

PUSA; New Delhi, India).

- 92 Kuchler, K. et al. 1989. *Eur. J. Biochem.* 184:249-254.
- 93 Gmachl, M., and G. Kreil. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3569-3573.
- 5 93A Hoffman DR. 1977. *J Allergy Clin. Immunol.* 59:364-366.
- 94 Habermann, E. 1972. *Science* 177:314-322.
- 95 Hoffman DR, Jacobson RS. 1996. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97:812-821.
- 10 95A Hoffman DR, El-Choufani AE, Smith MM, de Groot H. 2001. Occupational allergy to bumblebee venom: Alergenos of *Bombus terrestris*. *J Allergy Clin Immunol* In press.
- 95B Helm R. et al. 1996. *J Allergy Clin Immunol* 98:172-180.
- 95C Pomes A. et al. 1998. *J Biol Chem* 273:30801-30807.
- 96 Arruda LK et al. *J Biol Chem* 270:19563-19568, 1995.
- 15 97 Arruda LK et al. *J Biol Chem* 270:31196-31201, 1995.
- 98 Arruda LK et al. *Int Arch Allergy Immunol* 107:295-297, 1995.
- 98A Wu CH et al. 1998. *J Allergy Clin Immunol* 101:832-840.
- 98B Melen E. et al. 1999. *J Allergy Clin Immunol* 103:859-64.
- 20 98C Wu CH et al. *J Biol Chem* 271:17937-17943, 1996.
- 98D Wu CH et al. *Molecular Immunol* 34:1-8, 1997.
- 98E Santos ABR et al. 1999. *J Allergy Clin Immunol* 104:329-337.
- 98F Asturias JA et al. 1999. *J Immunol* 162:4342-4348.
- 25 99 Mazur, G. et al. 1990. *Monog. Allergy* 28:121-137. 99A Moneo I. et al. *Allergy* 58: 34-37, 2003.
- 100 Soldatova, L. et al. 1993. *FEBS Letters* 320:145-149.
- 101 Lu, G. et al. 1994. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93:224.
- 102 Fang, K. S. F. et al. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:895-899.

- 103 King, T. P. et al. 1990. *Prot. Seq. Data Anal.* 3:263-266.
- 104 Lu, G. et al. 1993. *J. Immunol.* 150: 2823-2830.
- 105 King, T. P. and Lu, G. 1997. Unpublished data.
- 105A King TP et al. 1996. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:588-600
- 5 106 Hoffman, D.R. 1993. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:707-716.
- 107 Hoffman DR. 1992. Unpublished data.
- 108 Hoffman DR. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91:187, 1993.
- 109 Jacobson RS et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 89:292, 1992.
- 110 Hoffman DR. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 71-78, 1993.
- 10 111 Schmidt M. et al. *FEES Letters* 319: 138-140, 1993. 111A
- Paddock CD et al. *J Immunol* 167: 2694-2699, 2001.
- 112 Elsayed S, Bennich H. *Scand J Immunol* 3: 683-686, 1974.
- 113 Elsayed S. et al. *Immunochemistry* 9: 647-661, 1972.
- 114 Hoffman, D. R. 1983. *J. Allergy Clin. Immunol.* 71: 481-486
- 15 115 Langeland, T. 1983. *Allergy* 38:493-500.
- 116 Daul CB, Slattery M, Morgan JE, Lehrer SB. 1993. Common crustacea allergens: identification of B cell epitopes with the shrimp specific monoclonal antibodies. In: "Molecular Biology and Immunology of Allergens" (D. Kraft and A. Sehon, eds.). CRC Press, Boca Raton. pp. 291-293.
- 20 116A Shanti KN et al. *J. Immunol.* 151: 5354-5363, 1993.
- 117 Yu CJ et al. *J Immunol* 170: 445-453, 2003.
- 117A Miyazawa M et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98: 948-953, 1996.
- 25 117B Asturias JA et al. *Int Arch Allergy Immunol* 128: 90-96, 2002.
- 117C Lopata AL et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 642-648, 1997.
- 117D Hoffmann-Sommergruber K. et al. *Clin. Exp. Allergy* 29: 840-847, 1999.

- 118 Monsalve RI et al. *Biochem. J.* 293: 625-632 1993.
- 118A. Monsalve RI et al. 1997. *Clin Exp Allergy* 27:833-841.
- 119 Mena, M. et al. *Plant Molec. Biol.* 20: 451-458, 1992.
- 5 119A Palosuo K. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 634-638, 2001.
- 119B Xu H. et al. *Gene* 164: 255-259, 1995.
- 119C Pastorello EA et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94: 699-707, 1994
- 10 119D Diaz-Perales A. et al. *J Allergy Clin Immunol* 110: 790-796, 2002
- 119E Galleguillos F, Rodriguez JC. *Olin Allergy* 8: 21-24, 1978.
- 119F Baur X. *Clin Allergy* 9: 451-457, 1979.
- 119G Gailhofer G. et al. *Clin Allergy* 18: 445-450, 1988.
- 120 Menendez-Arias, L. et al. 1988. *Eur. J. Biochem.* 177:159-166.
- 15 120A onzalez R. et al. *Lancet* 346:48-49, 1995.
- 120B Kleine-Tebbe J. et al. *J Allergy Clin Immunol* 110: 797-804, 2002.
- 120C Sanchez-Monge R. et al. *J. Allergy Olin. Immunol.* 106: 955-961, 2000.
- 20 121 Gavrovic-Jankulovic M. et al. *J Allergy Clin Immun of* 110: 805-810, 2002.
- 121A Pastorello EA et al. *J. Chromatogr. B Blamed. Sci. Appl.* 756: 85-93, 2001.
- 121B Moneo I. et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 177-182, 2000.
- 25 121C Asturias JA et al. 2000. *Allergy* 55:898-890.
- 122 Christie, J. F. et al. 1990. *Immunology* 69:596-602.
- 122A Baur X. et al. *Clin Allergy* 12: 9-17, 1982.
- 122B Onisuka R. et al. *Int Arch Allergy Immunol* 125: 135-143, 2001.

- 123 Czippon AB et al. J Allergy Clin Immunol 92:690-697, 1993.
 124 Attanayaka DPSTG et al. 1991. Plant Mol Biol 16:1079-1081.
 125 Chye ML, Cheung KY. 1995. Plant Mol Biol 26:397-402.
 126 Alenius H. et al. 1993. Int Arch Allergy Immunol 102:61-66.
 5 127 Yeang HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, Hamid S, Hamilton RG, Cardoso MJ. 1996. The 14.6 kD (REF, Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognised by IgE from Spina Bifida patients with Latex allergy. J Allerg Clin Immunol in press.
 10 128 Sunderasan E. et al. 1995. J nat Rubb Res 10:82-99.
 129 Swoboda I. et al. 2002. J Immunol. 168:4576-84.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, a molécula hipoalergênica apresenta capacidade de ligação de IgE reduzida.

15 De acordo com uma outra forma de realização preferida da presente invenção a molécula hipoalergênica apresenta reatividade de célula reduzida.

Entretanto, também, os fragmentos de alergen que compreendem pelo menos um epítipo de célula T podem ser usados na
 20 proteína hipoalergênica de acordo com a presente invenção.

"que apresenta capacidade de ligação de IgE reduzida", como usado neste, significa que as moléculas de acordo com a presente invenção mostra capacidade ou atividade de ligação de IgE significativamente reduzida (pelo menos 50 % menos, preferivelmente pelo menos 70 % menos, mais
 25 preferivelmente pelo menos 80 % menos, ainda mais preferivelmente pelo menos 90 % menos, mais preferivelmente pelo menos 95 % menos, capacidade de ligação em comparação com o alergen do tipo selvagem) ou ainda perda deste em todos.

A atividade/capacidade de ligação de IgE de moléculas

semelhantes a peptídeos e proteínas pode ser determinado por, por exemplo, um ensaio imunoabsorvente ligado por enzima (ELISA) usando-se, por exemplo, soro obtido de um paciente, (isto é, um paciente alérgico) que foi previamente exposto ao alérgeno do tipo selvagem. Resumidamente, um

5 peptídeo a ser testado é revestido nos reservatórios de uma placa microtituladora. Após a lavagem e o bloqueio dos reservatórios, uma solução de anticorpo consistindo do plasma de um paciente alérgico, que foi exposto ao peptídeo sendo testado ou proteína a partir da qual este foi derivado, é incubada nos reservatórios. Um anticorpo secundário rotulado é adicionado

10 aos reservatórios e incubado. a quantidade de ligação de IgE é então quantificada e comparada à quantidade de IgE ligado por um alérgeno do tipo selvagem purificado.

Alternativamente, a atividade de ligação de um peptídeo pode ser determinada pela análise de Western blot. Por exemplo, um peptídeo a ser

15 testado é usado e um gel de poliacrilamida usando-se SDS-PAGE. O peptídeo é então transferido à nitrocelulose e subseqüentemente incubado com soro de um paciente alérgico. Após a incubação com o anticorpo secundário rotulado, a quantidade de IgE ligada é determinada e quantificada.

Um outro ensaio que pode ser suado para determinar a ligação

20 da atividade de IgE de um peptídeo é um ensaio ELISA de competição. Resumidamente, um grupo de anticorpo IgE é gerado pela combinação de plasma de pacientes alérgicos que mostraram, por ELISA direto, ser reativo ao IgE com alérgeno do tipo selvagem. Este grupo é usado em ensaios de competição de ELISA para a comparação da ligação de IgE ao alérgeno do

25 tipo selvagem ao peptídeo testado. A ligação de IgE para o alérgeno do tipo selvagem e o peptídeo sendo testado é determinada e quantificada.

Um "epítipo de célula T" significa uma proteína (por exemplo, alérgeno) ou fragmento desta, para que a célula T tenha um local de ligação específico, o resultado da ligação ao dito local de ligação à célula T. O termo

"apresenta reatividade de célula T reduzida", como usado neste, refere-se à moléculas que apresentam reatividade de célula T que é significativamente reduzida em comparação com o estímulo reduzido em comparação com o estímulo induzido pelo alérgeno do tipo selvagem, a partir do qual a molécula hipoalérgénica é derivadas usando-se quantidades equimolares em ensaios padrão conhecidos na técnica (reatividade de célula T reduzida significa pelo menos 30 %, preferivelmente pelo menos 50 %, mais preferivelmente pelo menos 70 %, mais preferivelmente pelo menos 90 %, menos estímulo de molécula hipoalérgénicas em comparação com o alérgeno do tipo selvagem em quantidades equimolares). Em uma forma de realização preferida particular desta invenção, as moléculas podem "perder" os epítomos de célula T e, desta maneira, a molécula mostra reatividade de célula T reduzida nos indivíduos a serem tratados (isto é, que devem receber uma molécula de plataforma de valência que apresenta epítomo). É provável que, por exemplo, uma molécula derivada de alérgeno possa precisar de epítomos de célula T com respeito a um indivíduo ou a um grupo de indivíduos, enquanto possuem um epítomo de célula T com respeito a outros indivíduos. Os métodos para detectar a presença de um epítomo de célula T são conhecidos na técnica e incluem ensaios que detectam a proliferação de célula T (tal como a incorporação de timidina). Os imunogénios que falham em induzir a incorporação estatisticamente significativa de timidina acima da base (isto é, no geral p menos que 0,05 usando-se métodos estatisticamente padrão) são, no geral considerados precisar dos epítomos de célula T, embora seja estimado que a quantidade quantitativa de incorporação de timidina possa variar dependendo do imunogénio sendo testado (ver, por exemplo, Zhen L. et al. (Infect Immun. (2003) 71:3920-3926)). No geral, um índice de estímulo abaixo de cerca de 2 a 3, mais preferivelmente menos do que cerca de 1, indica perda de reatividade de célula T e epítomos. A presença de epítomos de célula T também pode ser determinada pela medição da secreção de linfocinas

derivadas de célula T de acordo com métodos padrão. O índice de estímulo (SI) pode ser calculado pela divisão da taxa de proliferação (entrada de timidina) de células estimuladas através da taxa de proliferação de células não estimuladas em meio apenas. SI=1 significa nenhum estímulo, SI<1 indica efeitos tóxicos e SI>1 indica estímulo de células. A localização e o teor do epítopo de células T, se presentes, podem ser determinados empiricamente.

A secreção de citocina pode ser determinada além do estímulo de células T. Por exemplo, IFN-gama foi reconhecido como uma citocina nociva. Outros exemplos podem ser TNF-alfa, IL-5, IL-4, IL-8 etc.

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

aminoácidos 1 a 34, 35 a 74, 74 a 115, 125 a 165, 174 a 213, 241. a 280, 294 a 333, 361 a 400 ou 401 a 438 de Alt a 6, aminoácidos 1 a 40, 41 a 80, 81 a 120, 121 a 160 de Alt a 2 ou fragmentos ou variações de sequência destes.

As seqüências de aminoácido específicas das moléculas derivadas de alérgeno identificadas acima são:

Peptídeo	Posição	Seqüência	SEQ ID No.
Pep Alt a 1.1	19-58	APLESRQDTASCPVTTEGDYVWKISEFYGRKPEGTTY NSL	23
Pep Alt a 1.2	59-95	GFNKATNGGTLDFTCSAQADKLEDHKWYSCGENSF M	24
Pep Alt a 1.3	91-120	ENSFMDFSFSDRSGLLLKQKVSDITYVA	25
Pep Alt a 1.4	121-157	TATLPNYCRAGNGPKDFVCQGVADAYITLVTLPKSS	26
Pep Alt a 2.1	1-40	MHSSNNFFKDNIFRSLSKEDPDYSRNIEGQVIRLHWDW AQ	27
Pep Alt a 2.2	41-80	LLMLSAKRMKVAFKLDIEKDQRVWDRCTADDLKGRN GFKR	28
Pep Alt a 2.3	81-120	CLQFTLYRPRDLLSLNEAFFSAFRENRETIINTDLEYA A	29
Pep Alt a 2.4	121-160	KSISMARLEDLWKEYQKIFPSIQVITSAFRSIEPELTVYT	30
Pep Alt a 2.5	161-190	CLKKIEASFELIEENGDPKITSEIQLLKAS	31
Pep Alt a 6.1	1-34	MTITKIHARSVYDSRGNPTVEVDIVTETGLHRAI	32
Pep Alt a 6.2	35-74	VTETGLHRAIVPSGASTGSHEACELRDGDKSKWGGKG VTK	33
Pep Alt a 6.3	74-115	APALIKEKLDVKDQSAVDAFLNKLDTTNKTNLGN AILGVS	34
Pep Alt a 6.4	125-165	EKGVPYLAHISDLAGT KKPVYLPVPF QNVNLGGSHAGGRLA	35
Pep Alt a 6.5	174-213	CEAPTFSEAMRQGAEVYQKLKALAKKTYGQSAGNVG DEGG	36
Pep Alt a 6.6	241-280	IKIAMDVASSEFYKADEKKYDLDFKNPDSKSKWLT EQL	37
Pep Alt a 6.7	294-333	VSIEDPFAEDDWEAWSYFFKTYDGQIVGDDLTVTNPE FIK	38
Pep Alt a 6.8	361-400	AKDAFGAGWGVMSHRSGETEDVTIADIVVGLRSGQI KTG	39
Pep Alt a 6.9	401-438	APARSERLAKLNQILRIEELGDNNAVYAGNNFRTAVN L	40
Pep Amb a 1.1	31-70	EILPVNETRRLTSGAYNIIDGCWRGKADWAENRKAL ADC	41
Pep Amb a 1.2	80-120	GGKDGDIYTVTSELDDDVANPKEGTLRFGAAQNRPL WIIFE	42
Pep Amb a 1.3	125-155	IRLDKEMVVNSDKTIDGRGAKVEIINAGFTL	43
Pep Amb a 1.4	160-200	NVIIHNINMHDVKVNPGLIKSNDGPAAPRAGSDGDAI SIS	44
Pep Amb a 1.5	225-263	GTTRLTVSNSLFTQHQFVLLFGAGDENIEDRGMLATV AF	45
Pep Amb a 1.6	264-300	NTFTDNVDQRMPCRHRGFFQVVNNNYDKWGSYAIGG S	46
Pep Amb a 1.7	305-350	ILSQGNRFCAPDERSKKNVLGRHGEAAAESMKWNWR TNKDVLENGA	47
Pep Amb a 1.8	356-396	GVDPVLTPEQSAGMIPAEPGESALSLTSSAGVLSQPG APC	48
Pep Art v 1.1	27-70	SKLCEKTSKTYSGKCDNKKCDKKCIEWEKAQHGACH KREAGKES	49
Pep Art v 1.2	70-100	SCFCYFDCSKSPPGATPAPPGAAPPPAAGGS	50
Pep Art v 1.3	92-132	APPPAAGGSPSPADGGSPPPADGGSPVDGGSPPPPS TH	51
Can f 1 Pep 1	19-56	QDTPALGKDTVAVSGKWYLKAMTADQEVPEKPDSVT PM	52
Can f 1 Pep 2	51-90	DSVTPMILKAQKGGNLEAKITMLTNGQCQNITVVLHK TSE	53

Peptídeo	Posição	Sequência	SEQ ID No.
Can f 1 Pep 3	78-118	CQNITVVLHKTSEPGKYTAYEGQRVVFIQSPVRDHYI LYC	54
Can f 1 Pep 4	106-145	QSPVRDHYILYCEGELHGRQIRMAKLLGRDPEQSQE ALE	55
Can f 1 Pep 5	135-174	RDPEQSQEALDFREFSRAKGLNQEILELAQSETCSPG GQ	56
Can f 2 Pep 1	19-58	QEGNHEEPQGGLEELSGRWHSVALASNKSDLIKPWGH FRV	57
Can f 2 Pep 2	52-91	PWGHFRVFIHMSAKDGNLHGDILIPQDGQCEKVS LT AFK	58
Can f 2 Pep 3	82-119	CEKVS LTAFKTATSNKFDLEYWGHNDLYLAEVDPKSY L	59
Can f 2 Pep 4	106-144	NDLYLAEVDPKSYLJLYMINQYNDTSLVAHLMVRDL SR	60
Can f 2 Pep 5	139-180	VRDLRSQQDFLPAFESVCEDIGLHKDQIVVLSDDDR CQ GSRD	61
Fel d 2 Pep 1	25-58	EAHQSEIAHRFNDLGEEHFRGLVLVAFSQQYLQQC	62
Fel d 2 Pep 2	99-133	CTVASLRDKY GEMADCCEKKEPERNECFLOHKDDN	63
Fel d 2 Pep 3	154-183	NEQRFLGKYL YEIARRHPYFYAPELLYYAE	64
Fel d 2 Pep 4	277-307	CADDRADLAKYICENQDSISTKLKECCGKPV	65
Fel d 2 Pep 5	334-363	VEDKEVCKNYQEAKDVFLGTFLYEYSRRHP	66
Fel d 2 Pep 6	373-402	LAKEYEATLEKCCATDDPPACYAHVFDEFK	67
Fel d 2 Pep 7	544-573	EKQIKKQSALVELLKHKPKATEEQLKTVMG	68
Fel d 2 Pep 8	579-608	VDKCCAAEDKEACFAEEGPKLVAAAQAALA	69
Fel d 2 Pep 9	58-99	CPFEDHVKL VNEVTEFAKGCVADQSAANCEKSLHELL GDKLC	70
Fel d 2 Pep 10	125-165	CFLQHKDDNPGFGQLVTPEADAMCTAFHENEQRFLG KLYYE	71
Fel d 2 Pep 11	183-224	EEYKGVFTECCEAADKAACLT PKVDALREKVLASSAK ERLKC	72
Fel d 2 Pep 12	224-261	CASLQKFGERAFAKAWSVARLSQKFPAEFAEISKLVT D	73
Fel d 2 Pep 13	252-289	FAEISKLVTDLAKIHKECCHGDLLECADDRADLAKYIC	74
Fel d 2 Pep 14	303-340	CGKPVLEKSHCISEVERDELPADLPPLAVDFVEDKEVC	75
Fel d 2 Pep 15	416-457	CELFEKLGEYGFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRS LGKV	76
Fel d 2 Pep 16	460-500	CTHPEAERLSAEDYLSVVLNRLCVLHEKTPVSESVT KC	77
Fel d 2 Pep 17	501-542	CTESLVNRRPCFSALQVDETYVPKEFSAETFTFHADLC TLPE	78
Pep Ole e 1.1	1-40	EDIPQPPVSQFHIQQGVYCDTCRAGFITELSEFIPGASLR	79
Pep Ole e 1.2	36-66	GASLRLQCKDKENGDVTFTEVGYTRAEGLYS	80
Pep Ole e 1.3	63-99	GLYSMLVERDHNKNEFCEITLISSGRKDCNEIPTEGWA	81
Pep Ole e 1.4	86-120	GRKDCNEIPTEGWAKPSLKFKNLTVNGTTRTVNPL	82
Pep Ole e 1.5	107-145	LNTVNGTTRTVNPLGFFKKEALPKCAQVYNKLGMYPP NM	83
Pep Par j 2.1	31-60	GEEACGKVVQDIMPCLHFVKGEEKEPSKEC	84
Pep Par j 2.2	45-80	CLHFVKGEEKEPSKECCSGTKKLSEEVKTTEQKREA	85
Pep Par j 2.3	60-96	CCSGTKKLSEEVKTTEQKREACKCIVRATKGISGKN	86
Pep Par j 2.4	97-133	ELVAEVPKKCDIKTTLPITADFDCKSIQSTIFRGYY	87
Der p 1 Pep 1	1-30	TNACSINGNAPAEIDLQRMRTVTPIRMQGG	88
Der p 1 Pep 2	52-84	NQSLDLAEQELVDCASQHGCHGDTIPRGIEYIQ	89
Der p 1 Pep 3	85-115	HNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQRFGISN	90
Der p 1 Pep 4	99-135	REQSCRRPNAQRFGISNYCQIYPPNVNKIREALAQTH	91
Der p 1 Pep 5	145-175	KDLDAFRHYDGRTHIQRDNGYQPNYHAVNIV	92
Der p 1 Pep 6	155-187	GRTTHIQRDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVVDYWI	93
Der p 1 Pep 7	175-208	VGYSNAQGVVDYWIVRNSWDTNWGDNGYGYFAANI	94
Der p 1 Pep 8	188-222	VRNSWDTNWGDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVVIL	95
Der p 2 Pep 1	1-33	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGK	96
Der p 2 Pep 2	21-51	CHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNSKTAK	97
Der p 2 Pep 3	42-73	EANQNSKTAKIEIKASIEGLEVDVPGIDPNAC	98
Der p 2 Pep 4	62-103	EVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYDIKYTWIVPKIA PKSEN	99
Der p 2 Pep 5	98-129	APKSENVVVTVKVMGDNGLACAIATHAKIRD	100
Der p 5 Pep 1	1-35	MEDKKHDYQNEFDLLMERIHEQIKKGELALFYLO	101
Der p 5 Pep 2	25-60	KKGELALFYLOEQINHFEKPTKEMKDKIVAEMDTI	102
Der p 5 Pep 3	65-95	DGVRGVLDRMLQQRKDL DIFEQYNLEMAKKSG	103

Peptídeo	Posição	Seqüência	SEQ ID No.
Der p 5 Pep 4	78-114	DLDFEQYNLEMAKKSGDILERDLKKEEARVKKIEV	104
Der p 7 Pep 1	1-30	DPIHYDKITEEINKAVDEAVAAIEKSETFD	105
Der p 7 Pep 2	20-50	VAAIEKSETFDPMKVPDHSDKFERHIGIDL	106
Der p 7 Pep 3	50-80	LKGELDMRNIQVRGLKQMKRVGDANVKSEDG	107
Der p 7 Pep 4	90-125	VHDDVVSMEYDLAYKLGDLHPNTHVISDIQDFVVEL	108
Der p 7 Pep 5	125-155	LSLEVSEEGNMTLTSFEVRQFANVVNHIGGL	109
Der p 7 Pep 6	165-198	LSDVLTAFQDQTVRAEMTKVLAPAFKKELERNNQ	110
Der p 10 Pep 1	1-35	MEAIKKKMQAMKLEKDNAIDRAEIAEQKARDANLR	111
Der p 10 Pep 2	36-70	AEKSEEEVRALQKKIQIENELDQVQEQLSAANTK	112
Der p 10 Pep 3	71-110	LEEKEKALQTAEGDVAALNRRIQLIEEDLERSEERLKI AT	113
Der p 10 Pep 4	111-145	AKLEEASQSADESERMRKMLEHRSITDEERMEGLE	114
Der p 10 Pep 5	140-170	RMEGLENQLKEARMMAEDADRKYDEVARKLA	115
Der p 10 Pep 6	175-205	DLERAEEAETGESKIVELEEELRVVGNNLK	116
Der p 10 Pep 7	210-250	SEEKAQQREEAHEQQIRIMTTKLKEAEARAFAERSVQ KLQ	117
Der p 10 Pep 8	250-284	QKEVDRIEDELVEHEKEYKSISDELQDTFAELTGY	118
Der p 21 Pep 1	1-35	MFIVGDKKEDEWRMAFDRLMMELETKIDQVEKGL	119
Der p 21 Pep 2	35-72	LHLSEYKYELEKTKSKELKEQILRELITIGENFMKGAL	120
Der p 21 Pep 3	70-100	GALKFFEMEAKRTDLNMFERYNYEFALESIK	121
Der p 21 Pep 4	90-122	YNYEFALESIKLLIKLDELAKKVKAVNPDEYY	122
Clone 30 Pep 1	1-32	MANDNDDPTTTVHPTTTEQDDKFCPSRFG	123
Clone 30 Pep 2	15-48	PTTTEQDDKFCPSRFGYFADPKDPHKFYICSN	124
Clone 30 Pep 3	32-70	GYFADPKDPHKFYICSNWEAVHKDCPGNTRWNEDEE TCT	125
Bet v 1 Pep 1	30-59	LFPKVAPQAISSEVENIEGNGGPGTIKKISF	126
Bet v 1 Pep 2	50-79	GPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDEVDTN	127
Bet v 1 Pep 3	75-104	VDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK	128
Fel d 1 chain 1 Pep 1	1-34	EICPAVKRDVDLFLTGTTPDEYVEQVAQYKALPVVC	129
Fel d 1 chain 1 Pep 2	35-70	LENARILKNCVDAKMTEEDKENALSLLDKIYTSPLC	130
Fel d 1 chain 2 Pep 1	1-34	VKMAITCPIFYDVFFAVANGNELLLDLSLTKVNAC	131
Fel d 1 chain 2 Pep 2	35-63	TEPERTAMKKIQDCYVENGLISRVLDGLVC	132
Fel d 1 chain 2 Pep 3	64-92	CMTTISSSKDCMGEAVQNTVEDLKLNTLGR	133
Phl p 5 Pep 1	98-128	CGAASNKAFAEGLSGEPKGAAESSSKAALTSK	134
Phl p 5 Pep 2	26-58	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAPAGKC	135
Phl p 5 Pep 3	132-162	AYKLAYKTAEGATPEAKYDAYVATLSEALRIC	136
Phl p 5 Pep 4	217-246	CEAAFNDAIKASTGGAYESYKFIPALEAAVK	137
Phl p 5 Pep 5	252-283	TVATAPEVKYTVFETALKKAITAMSEAQKAAC	138
Phl p 5 Pep 6	176-212	CAEEVKVIPAGELQVIEKVDAAFKVAATAANAAPAND K	139
Phl p 5 Pep 1a	93-128	CFVATFGAASNKAFAEGLSGEPKGAAESSSKAALTSK	141
Phl p 5 Pep 2b	26-53	ADLGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAC	142

Os termos “fragmentos destes” e “variações de seqüência destes” referem-se a peptídeos que são deduzidos das moléculas derivadas de alérgeno divulgados neste e mostram propriedades bioquímicas (por exemplo, a capacidade de evitar a ligação de IgE ao alérgeno a partir do qual estas moléculas são derivadas) que são comparáveis ou idênticos Às ditas moléculas derivadas de alérgeno. Os fragmentos da presente invenção compreendem, pelo menos 5, preferivelmente pelo menos 7, mais preferivelmente pelo menos 10, sucessivos e/ou um máximo de 95 %, preferivelmente um máximo de 90 %, mais preferivelmente um máximo de 80 % de resíduos de aminoácido da molécula derivada de alérgeno. O termo “variação de seqüência” inclui modificações tais como fragmentação (ver

acima), substituições de aminoácido (por exemplo, com outros aminoácidos naturais ou não naturais ou derivados de aminoácido), anulações ou adições. "Variação de seqüência" também refere-se às ditas moléculas derivadas de alérgeno da tabela acima, em que pelo menos 1, preferivelmente pelo menos 2, mais preferivelmente pelo menos 3, ainda mais preferivelmente pelo menos 4 (5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20) resíduos de aminoácido são adicionados ao terminal C e/ou N.

É observado que o alérgeno clone 30 é um alérgeno derivado do ácaro de pó doméstico *Dermatophagoides pteronyssinus* e consiste da seguinte seqüência: MANDNDDDDPTTTVHPTTTEQPDDKFECPSRFGYFADPKDPHKFYICSNWEAVHKDCPGNTRWNEDEETCT (SEQ ID N° 140; ver também AT A 733/2006).

De acordo com a presente invenção também são abrangidos peptídeos que são pelo menos 80 % idênticos, preferivelmente 90 % idênticos, às seqüências de aminoácido divulgadas neste.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína hipoalergêcia fundida de acordo com a presente invenção.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

O dito vetor é preferivelmente um vetor de expressão.

O vetor que abriga a molécula de ácido nucleico da presente invenção pode ser usado para os propósitos de clonagem ou para a produção de vetores de expressão. O dito vetor pode ser um plasmídeo, cosmídeo, vírus, bacteriófago ou qualquer outro vetor comumente usado na engenharia genética e pode incluir, além da molécula de ácido nucleico da invenção, elementos eucarióticos ou procarióticos para o controle da expressão, tal como seqüências reguladoras para a iniciação e a terminação da transcrição

e/ou tradução, intensificadores, promotores, seqüências sinalizadoras e outros.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, o vetor é um vetor bacteriano, fúngico, inseto, viral ou mamífero.

O vetor da presente invenção pode ser preferivelmente
5 utilizado para os propósitos de clonagem e expressão em vários hospedeiros. Portanto, o dito vetor compreende, além disso, um ácido nucleico que codifica uma molécula hipoalergênica ou proteína de fusão de acordo com a presente invenção, seqüências reguladoras específicas de hospedeiro.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a um
10 hospedeiro que compreende uma molécula de ácido nucleico ou um vetor de acordo com a presente invenção.

A molécula de ácido nucleico e o vetor de acordo com a presente invenção podem ser introduzidos em um hospedeiro adequado. A dita molécula pode ser incorporada no genoma do hospedeiro. O vetor pode
15 existir de maneira extracromossômica no citoplasma ou incorporado no cromossomo do hospedeiro.

Ainda, um outro aspecto da presente invenção diz respeito a um anticorpo direcionado contra a molécula hipoalergênica, proteína de fusão hipoalergênica ou uma proteína de fusão de acordo com a presente invenção.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, o anticorpo é um anticorpo monoclonal ou policlonal.

Os anticorpos de acordo com a presente invenção incluem, mas não limitam-se a, anticorpos policlonais, monoclonais, multiespecíficos, humanizados ou quiméricos, anticorpos de cadeia simples, fragmentos Fab,
25 fragmentos F(ab') e fragmentos de ligação de epítipo de qualquer um dos acima. Além disso, os anticorpos são considerados serem moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina, isto é, moléculas que contém um local de ligação de antígeno que ligam-se imuno especificamente um antígeno. As moléculas de

imunoglobulina da invenção são, preferivelmente dos tipos IgG, IgM, IgD, IgA e IgY, classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse de molécula de imunoglobulina.

Os anticorpos policlonais podem ser preparados pela mistura de um polipeptídeo da invenção, preferivelmente usando-se um adjuvante, a um mamífero não humano e coletando-se o anti-soro resultante. Os tituladores melhorados podem ser obtidos por injeções repetidas por um período de tempo. Não existe limitação particular às espécies de mamíferos que podem ser usadas para evocar os anticorpos; no geral, é preferido usar coelhos ou porquinhos da índia, mas cavalos, gatos, cães, cabras, porcos, ratos, vacas, ovelhas, camelos etc., também podem ser usados. Na produção de anticorpos, uma quantidade definida de imunogênio da invenção é, por exemplo, diluída com solução salina fisiológica a uma concentração adequada e a solução diluída resultante é misturada com, por exemplo, adjuvante de Freund completo para a preparação de uma suspensão ou com géis minerais, tais como hidróxido de alumínio, substâncias ativas de superfície, tal como lisolecitina, polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões oleosas, hemocianinas do lapa buraco de fechadura, dinitrofenol e, potencialmente, adjuvantes úteis humanos, tais como BCG (bacilo Calmette-Guerin) e *corynebacterium parvum*. As suspensões e as misturas são administradas a mamíferos, por exemplo, intraperitonealmente, por exemplo, a um coelho, usando-se de cerca de 50 µg a cerca de 2.500 µg de polipeptídeo da invenção por administração. A suspensão é preferivelmente administrada a cada duas semanas por um período de até cerca de 2 a 3 meses, preferivelmente cerca de 1 mês, para realizar a imunização. O anticorpo é recuperado pela coleta de sangue a partir do animal imunizado após a passagem de 1 a 2 semanas após a última administração, centrifugando-se o sangue e isolando-se o soro do sangue.

Os anticorpos monoclonais podem, por exemplo, ser de

origem humana ou murina. Os anticorpos monoclonais de murino podem ser preparados pelo método de Kohler and Milstein (Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256 (1975) 495), por exemplo, pela fusão de células baço de camundongos hiperimunizados com uma linha celular de mieloma de camundongo apropriada.

Um anticorpo quimérico é uma molécula, em que, porções diferentes do anticorpo são derivadas de espécies animais diferentes, tais como anticorpos tendo uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal de murino e uma região constante de imunoglobulina humana. Os métodos para a produção de anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; US 5.807.715; US 4.816.567 e US 4.816.397.

Os anticorpos humanizados são moléculas de anticorpo de espécie não humana que liga o antígeno desejado tendo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) a partir das espécies não humanas e regiões de estrutura de uma molécula de imunoglobulina humana. Frequentemente, os resíduos de estrutura nas regiões de estrutura humanas serão substituídos pelo resíduo correspondente do anticorpo doador de CDR para alterar, preferivelmente melhorar a ligação de antígeno. Estas substituições de estrutura são identificadas pelos métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, modelando-se as interações do CDR e dos resíduos de estrutura para identificar os resíduos de estruturas importantes para a ligação de antígeno e comparação de seqüência para identificar os resíduos de estrutura não usuais em particular posições (ver, por exemplo, Queen et al., US 5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)). Os anticorpos podem ser humanizados usando-se uma variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo, por exemplo, enxerto de CDR (EP 239.400; WO 91/09967; US 5.225.539; US 5.530.101 e US 5.585.089), polimento ou reformação de

superfície (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-913 (1994)) e mistura de cadeia (US 5,565,332).

5 Os anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser vantajosamente usados para a dessensibilização de um indivíduo que sofre de uma alergia, em particular de alergia de ácaros de pó doméstico. Para a imunização passiva, o anticorpo é preferivelmente um IgG ou um derivado destes (por exemplo, anticorpo quimérico ou humanizado). Além disso, este
10 anticorpo também pode ser usado para a dessensibilização de um indivíduo.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a uma formulação de vacina que compreende uma proteína hipoalergênica ou um anticorpo de acordo com a presente invenção.

A formulação de vacina de acordo com a presente invenção
15 pode ser formulada como conhecido na técnica e necessariamente adaptada ao meio de administração da dita formulação de vacina.

Os meios preferidos de administração de uma formulação de vacina (da presente invenção) incluem todos os regimes de administração descritos e sugeridos para a vacinação em geral e imunoterapia de alergia
20 especificamente (oral, transdérmica, intravenosa, intranasal, por intermédio da mucosa, retalmente, etc). Entretanto, é particularmente preferido administrar as moléculas e proteínas de acordo com a presente invenção subcutânea ou intramuscularmente.

A formulação de vacina de acordo com a presente invenção
25 pode apenas compreender uma proteína de capsídeo viral ou fragmentos destes de um membro do gênero de rinovírus.

A dita formulação preferivelmente ainda compreende pelo menos um adjuvante, excipiente farmacêutico aceitável e/ou conservante.

A fim de aumentar a imunogenicidade das moléculas

hipoalergênicas de acordo com a presente invenção, adjuvantes, por exemplo, podem ser usados em um medicamento de acordo com a presente invenção. Um adjuvante de acordo com a presente invenção é um agente auxiliar que, quando administrado junto ou em paralelo com um antígeno, aumenta a sua imunogenicidade e/ou influencia a qualidade da resposta imune. Em consequência, o adjuvante pode, por exemplo, influenciar consideravelmente a extensão da resposta humoral ou imune celular. os adjuvantes de costume são, por exemplo, compostos de alumínio, compostos contendo lipídeo ou micobactérias inativadas.

No geral, os adjuvantes podem ser de formas diferentes, contanto que estes sejam adequados para a administração a seres humanos. Os exemplos adicionais de tais adjuvantes são emulsões oleosas de origem mineral ou vegetal, compostos minerais, tais como fosfato ou hidróxido de alumínio ou fosfato de cálcio, produtos e derivados bacterianos, tais como P40 (derivado da parede celular de *Corynebacterium granulosum*), monofosforil lipídeo A (MPL, derivado de LPS) e derivados de peptídeo de muramila e conjugados destes (derivados de componentes de micobacterium), alume, adjuvante de Freund incompleto, liposina, saponina, esqualeno, etc. (ver, por exemplo, Gupta R. K. et al. (Vaccine 11:293-306 (1993)) and Johnson A. G. (Clin. Microbiol. Rev. 7:277-289).

De acordo com uma outra forma de realização preferida da presente invenção, dita formulação compreende 10 ng a 1 g, preferivelmente 100 ng a 10 mg, especialmente 0,5 µg a 200 µg da dita molécula hipoalergênica ou anticorpo.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito ao uso de uma proteína hipoalergênica ou um anticorpo de acordo com a presente invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma infecção viral e/ou uma alergia em um ser humano ou animal.

O dito medicamento, preferivelmente ainda compreende pelo menos um adjuvante, excipiente e/ou conservante farmacêuticamente aceitável.

5 O medicamento de acordo com a presente invenção pode ser usado para ativar (administração da proteína hipoalergênica e/ou moléculas da invenção) bem como para inativar a imunização (anticorpos direcionados à proteína hipoalergênica e/ou moléculas da invenção).

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, o dito medicamento compreende de 10 ng a 1 g, preferivelmente de 100 ng a 10 mg, especialmente 0,5 µg a 200 µg da dita molécula hipoalergênica, molécula de ácido nucleico, vetor, hospedeiro ou anticorpo.

O medicamento é preferivelmente administrado a um indivíduo em uma quantidade de 0,01 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, preferivelmente 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal.

O regime de dosagem particular, isto é, dose, regulação de tempo e repetição, dependerá do indivíduo particular e daquele histórico médico do indivíduo. As considerações empíricas, tais como a vida média, no geral, contribuirão para a determinação da dosagem. A frequência de administração pode ser determinada e ajustada no curso da terapia.

O indivíduo cujo medicamento de acordo com a presente invenção é administrado é preferivelmente um indivíduo ou animal que está em risco de ter uma alergia.

Os pacientes tendo ou em risco de ter uma condição alérgica, distúrbio ou doença incluem pacientes com uma condição alérgica existente ou conhecida ou uma predisposição suspeita com relação ao desenvolvimento de um sintoma associado com ou causado por uma condição alérgica. Desta maneira, o paciente pode ter uma condição, distúrbio ou doença alérgica crônica ativa, um episódio alérgico agudo ou uma condição alérgica latente.

Certas condições alérgicas estão associadas com fatores ambientais sazonais ou geográficos. Desta maneira, pacientes em risco incluem aqueles em risco de sofrer de uma condição com base em um histórico pessoal ou familiar anterior e a estação ou localização física, mas que a condição ou um sintoma associado com a condição pode não se manifestar presentemente no paciente por si só.

A administração do medicamento de acordo com a presente invenção, que compreende pelo menos uma molécula hipoalergênica como descrito neste, a um indivíduo pode evitar a sensibilização do dito indivíduo ou pode induzir uma resposta imune apropriada a alergenos. Se o medicamento da presente invenção for usado para evitar a sensibilização, este deve ser administrado ao indivíduo antes do primeiro contato com o dito alergeno. Portanto, é preferido administrar o medicamento de acordo com a presente invenção a recém nascidos e crianças. Também é verificado que a administração do medicamento de acordo com a presente invenção a indivíduos gestantes induzirá a formação de anticorpos direcionados contra alergenos na criança futura. É especialmente benéfico usar moléculas hipoalergênicas de acordo com a presente invenção para tais terapias, porque devido à perda do epítipo de células T, efeitos colaterais que ocorrem no curso da imunoterapia de alergeno podem ser significantemente reduzidos ou ainda completamente evitados.

Ainda, um outro aspecto da presente invenção diz respeito ao uso de uma proteína hipoalergênica ou um anticorpo de acordo com a presente invenção para o diagnóstico de uma alergia e/ou uma infecção viral em um indivíduo.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito ao uso de uma proteína de capsídeo viral de um vírus da família de picornaviridae como um carreador em medicamentos ou vacinas ou para diagnosticar uma infecção viral, em particular resfriado comum.

Como uma alternativa valiosa, à proteína carreadora de KLH amplamente dispersada, proteínas de capsídeo virais de vírus da família de picornaviridae podem ser usados. O carreador pode ser conjugado quimicamente ou fundido com técnicas recombinantes às peptídeos, proteínas e polipeptídeos ou outros antígenos. Além disso, a proteína de capsídeo viral pode ser usada para detectar, por exemplo, anticorpos direcionados à dita proteína de capsídeo no soro de um indivíduo.

Uma das vantagens de um tal carreador é que não apenas o antígeno fundido ou conjugado neste pode ser exposto ao sistema imune, mas também uma resposta imune contra a proteína de capsídeo de um rinovírus ser induzida. Conseqüentemente, uma tal vacinação leva à prevenção e/ou tratamento de doenças causadas por rinovírus. O vírus é preferivelmente da espécie de rinovírus humano, em particular rinovírus humano 89 e 14.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a um molécula hipo-alergênica derivada de Phl p 5 (Genbank Nr. X7435) tendo uma truncação de terminal C e/ou N e que precisa substancialmente da capacidade de ligação de IgE.

O pólen de grama é uma das fontes sazonais externas mais potentes de alergenios carregados pelo ar responsáveis pela febre do feno e asma alérgico.

Mais do que 40 % de indivíduos alérgicos apresentam reatividade de IgE com alergenios de pólen de grama, que são divididos em mais do que 11 grupos. Mais do que 80 % dos pacientes alérgicos ao pólen de grama reagem com alergenios do grupo 5.

Os alergenios do grupo 5 são não glicosilados, proteínas altamente homólogas com uma faixa de massa molecular de 25 a 33 kD. Diversos alergenios do grupo 5 alergenios foram clonados e/ou imunologicamente caracterizados.

O teste para reduzir a atividade alérgica pela introdução de

mutações de ponto, mutações de diversos aminoácidos em linha ou anulações não apresentaram nenhum efeito (Schramm G, et al. J Immunol 1999; 162: 2406-1435). A ligação de regiões IgE de Phl p 5 (Flicker S, et al. J Immunol 2000; 165: 3849-3859) que já foi descrita na estrutura tri-dimensional foi resolvida (Maglio O, et al. 2002. Protein Eng. 15:635-642).

É mostrado que, em particular os peptídeos Phl p 5 de acordo com a presente invenção, que são truncados no terminal C e/ou N e perdem capacidade de ligação de IgE, podem ser utilizados para a vacinação ativa de indivíduos.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, a molécula truncada perde os epítomos de célula T.

Como já resumido acima, os efeitos colaterais tardios de imunoterapia de alérgeno podem ser significativamente reduzidos ou ainda serem evitados se uma molécula hipoalérgénica substancialmente perder os epítomos de célula T.

As moléculas de Phl p 5 que precisam dos epítomos de célula T são compostas de aminoácidos 93 a 128, 98 a 128, 26 a 53, 26 a 58 ou 252 a 283 de Phl p 5 ou fragmentos ou variações de seqüências destes.

Em particular, estas moléculas truncadas substancialmente não mostram epítomos de célula T e são, entretanto, capazes de provocar uma resposta imune apropriada direccionada contra o alérgeno do tipo selvagem.

De acordo com uma outra forma de realização preferida da presente invenção o Phl p 5 truncado hipoalérgénico é composto de aminoácidos de 132 a 162, 217 a 246 ou 176 a 212 de Phl p 5 ou variações de seqüência destes.

Estas moléculas hipoalérgénicas compreendem um ou mais epítomos de célula T mas perdem a capacidade de ligação de IgE.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a uma molécula hipo-alérgénica derivada de Fel d 1 (Genbank N° X62477 e

X62478) tendo uma truncação de terminal C e/ou N e que precisa da capacidade de ligação de ligação de IgE.

As alergias a animais afetam até 40 % de pacientes alérgicos. No ambiente doméstico, as alergias aos animais domésticos mais populares, cães e gatos, são particularmente prevalentes e conectadas com sintomas perenes. Os alergen os animais estão presentes em caspa, epitélio, saliva, soro e urina. A exposição aos alergen os pode ocorrer pelo contato direto com a pele ou por inalação de partículas que carregam os alergen os. Os alergen os de cães e gatos principais mostraram-se estar presentes muito difundidos e ainda podem ser detectados em casas que não possuem animais domésticos e em locais públicos, por exemplo, escolas. Isto pode ser atribuído ao número alto e crescente de casas que mantém animais domésticos em países industrializados (cerca de 50 %) e a estabilidade alta dos alergen os, que são carregados e distribuídos.

O Fel d 1 foi identificado como o alergen o de gato principal, que é reconhecido por mais do que 90 % de pacientes alérgicos a gato. O Fel d 1 representa uma glicoproteína ácida de 38 kDa de função biológica desconhecida. Este consiste de dois heterodímeros não covalentemente ligados idênticos, que, novamente, são compostos de duas cadeias de polipeptídeo antiparalelamente ligados por três ligações de bissulfeto. A cadeia 1 e a cadeia 2 são codificados em genes diferentes, cada um consistindo de 3 exons. O Fel d 1 recombinante (rFel d 1), expressado como uma cadeia 2 – para a proteína de fusão de cadeia 1, foi gerado em *E. coli*. Este Fel d 1 recombinante é capaz de imitar completamente as propriedades imunológicas do alergen o do tipo selvagem.

Os peptídeos derivados do alergen o de gato principal Fel d 1 e a carência da capacidade de ligação de IgE são adequados, por exemplo, para imunoterapia e vacinação contra alergia profilática. Estes peptídeos podem estar compreendidos em um polipeptídeo maior ou estar ligado a uma

proteína carreadora adequada, tal como a hemocianina do lapa buraco de fechadura. Os peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 – como o Phl p 5 e os peptídeos derivados de alérgeno divulgados neste – são capazes de induzir uma resposta de IgG, isto é, a produção dos denominados "anticorpos bloqueadores" ou "anticorpos protetores". Estes anticorpos evitam a ligação de IgE ao alérgeno Fel d 1. Uma redução significativa nos sintomas alérgicos pode ser atingida desta maneira.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, a molécula truncada apresenta reatividade de célula T reduzida.

A fim de evitar ou reduzir significativamente os efeitos colaterais posteriores a molécula hipoalérgica derivadas de Fel d 1 apresentam reatividade de célula T reduzida como definido na presente invenção.

O Fel d 1 truncado é preferivelmente composto de aminoácidos 1 a 34 ou 35 a 70 de cadeia 1 de Fel d 1, aminoácidos 1 a 34, 35 a 63 ou 64 a 92 de cadeia 2 de Fel d 1 ou variações de sequência destes.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a moléculas hipoalérgicas sendo compostas de ou compreendendo aminoácidos 1 a 33, 21 a 51, 42 a 73, 62 a 103 ou 98 a 129 de Der p 2, aminoácidos 1 a 30, 20 a 50, 50 a 80, 90 a 125, 125 a 155 ou 165 a 198 de Der p 7, aminoácidos 1 a 35, 35 a 72, 70 a 100 ou 90 a 122 de Der p 21, aminoácidos 1 a 32, 15 a 48 ou 32 a 70 de Clon 30, aminoácidos 19 a 58, 59 a 95, 91 a 120 ou 121 a 157 de Alt a 1, aminoácidos 31 a 60, 45 a 80, 60 a 96 ou 97 a 133 de Par j 2, aminoácidos 1 a 40, 36 a 66, 63 a 99, 86 a 120 ou 107 a 145 de Ole e 1, aminoácidos 25 a 58, 99 a 133, 154 a 183, 277 a 307, 334 a 363, 373 a 402, 544 a 573, 579 a 608, 58 a 99, 125 a 165, 183 a 224, 224 a 261, 252 a 289, 303 a 340, 416 a 457, 460 a 500 ou 501 a 542 de Fel d 2, aminoácidos 19 a 58, 52 a 91, 82 a 119, 106 a 144 ou 139 a 180 de Can f 2, aminoácidos 19 a 56, 51 a 90, 78 a 118, 106 a 145 ou 135-174 de Can f 1,

aminoácidos 27 a 70, 70 a 100 ou 92 a 132 de Art v 1, aminoácidos 31 a 70, 80 a 120, 125 a 155, 160 a 200, 225 a 263, 264 a 300 305 a 350 ou 356 a 396 de Amb a 1, aminoácidos 1 a 34, 35 a 74, 74 a 115, 125 a 165, 174 a 213, 241 a 280, 294 a 333, 361 a 400 ou 401 a 438 de Alt a 6, aminoácidos 1 a 40, 41 a 80, 81 a 120, 121 a 160 de Alt a 2 ou fragmentos ou variações de seqüência destes.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a uma proteína de fusão hipoalergênica que compreende pelo menos duas moléculas hipoalergênicas de acordo com a presente invenção apresentando capacidade de ligação de IgE reduzida e apresentando reatividade de célula T opcionalmente reduzida.

As moléculas hipoalergênicas da presente invenção que são derivadas de um alérgeno e precisam da capacidade de ligação de IgE podem ser fundidas de maneira recombinante ou conjugadas quimicamente uma à outra. Como componentes simples (fragmentos de alérgeno) da proteína de fusão/polipeptídeo também a dita proteína de fusão/polipeptídeo precisa da capacidade de ligação de IgE.

A proteína de fusão de acordo com a presente invenção pode compreender, pelo menos dois, preferivelmente pelo menos três, mais preferivelmente pelo menos quatro, ainda mais preferivelmente pelo menos cinco, moléculas hipoalergênicas de acordo com a presente invenção. É claro, também é possível fundir as moléculas hipoalergênicas a outros peptídeos, polipeptídeos e proteínas não derivadas de alérgenos. Estes peptídeos, polipeptídeos e proteínas podem, quando administrados a um indivíduo também induz uma reação imunológica ou pode atuar como um carreador ou apresentar atividades enzimáticas. As moléculas hipoalergênicas na proteína de fusão de acordo com a presente invenção podem estar ligadas diretamente uma a outra ou por intermédio de um ligador que é preferivelmente composto de resíduos de aminoácido.

Os métodos para a produção de proteínas de fusão são bem conhecidos na técnica e podem ser encontrados em referências de biologia molecular padrão tal como Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, 2º ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) and Ausubel *et al.* (Short Protocols in Molecular Biology, 3º ed; Wiley and Sons, 1995). No geral, uma proteína de fusão é produzida construindo-se primeiro um gene de fusão que é inserido em um vetor de expressão adequado, que é, por sua vez, usado para a transfecção de uma célula host adequada. No geral, as construções de fusão recombinantes são produzidas por uma série de digestões de enzima de restrição e reações de ligação que resultam nas seqüências desejadas sendo incorporadas em um plasmídeo. Se locais de restrição adequados não estiverem disponíveis, os adaptadores de oligonucleotídeo sintéticos ou ligadores podem ser usados como é conhecido por aqueles habilitados na técnica e descrito nas referências citadas acima. As seqüências de polinucleotídeo que codificam alergenos e proteínas naturais podem ser montadas antes da inserção em um vetor adequado ou a seqüência que codifica o alergeno podem ser inseridas adjacentes a uma seqüência que codifica uma seqüência natural já presente em um vetor. A inserção da seqüência dentro do vetor deve estar na estrutura de modo que a seqüência possa ser transcrita em uma proteína. Estará evidente para aqueles habilitados na técnica que as enzimas de restrição precisas, ligadores e/ou adaptadores requeridos bem como as condições de reação precisas variarão com as seqüências e vetores de clonagem usados. A montagem de construções de DNA, entretanto, é rotina na técnica e pode ser facilmente realizada por uma pessoa habilitada na técnica.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção as moléculas são fundidas umas às outras uma ordem diferente da ordem dos fragmentos no alergeno do tipo selvagem se as pelo menos duas moléculas forem derivadas do mesmo alergeno.

A proteína de fusão de acordo com a presente invenção pode compreender, pelo menos duas moléculas hipoalergênicas que são derivadas do mesmo alérgeno do tipo selvagem. Em um tal caso, as moléculas simples (fragmentos de alérgeno) são fundidos um ao outro a fim de diferir da ordem no alérgeno do tipo selvagem. Um tal método evita a re-formação de locais de ligação de IgE/epítomos potenciais na proteína de fusão hipoalergênica.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a uma molécula de ácido nucleico que codifica quanto a uma molécula hipoalergênica e uma proteína de fusão de acordo com a presente invenção.

A molécula de ácido nucleico da presente invenção pode ser utilizada, por exemplo, para a produção das ditas moléculas de maneira recombinante.

A dita molécula de ácido nucleico pode - de acordo com um outro aspecto da presente invenção - estar compreendida em um vetor.

Este vetor é, preferivelmente, um vetor de expressão.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a uma formulação de vacina que compreende a molécula hipoalergênica, uma proteína de fusão ou um anticorpo de acordo com a presente invenção.

A formulação ainda compreende, preferivelmente, pelo menos um adjuvante, excipiente e/ou conservante farmacêuticamente aceitável.

O uso de substâncias carreadoras particulares, tais como KLH (hemocianina do lapa buraco de fechadura) também está entre os últimos métodos correntes para aumentar as respostas imunes. As moléculas hipoalergênicas da presente invenção também podem ser fundidas ou conjugadas a proteínas de capsídeo virais que também podem atuar como um carreador (ver acima).

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, a dita formulação compreende de 10 ng a 1 g, preferivelmente de 100 ng a 10 mg, especialmente de 0,5 µg a 200 µg da dita molécula

hipoalergênica ou anticorpo.

A formulação de vacina pode estar substancialmente composta como o medicamento da presente invenção (ver acima).

5 Um outro aspecto da presente invenção diz respeito ao uso de uma molécula hipoalergênica, uma proteína de fusão ou um anticorpo de acordo com a presente invenção para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de um alergia em um indivíduo.

10 A molécula hipoalergênica, proteína de fusão e anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser fundidos para a vacinação de um indivíduo. Esta vacinação pode reduzir ou evitar a resposta alérgica causada por um alergen do tipo selvagem.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, o dito medicamento ainda compreende pelo menos um adjuvante, excipiente e/ou conservante farmacêuticamente aceitáveis.

15 O medicamento de acordo com a presente invenção compreende, preferivelmente, 10 ng a 1 g, preferivelmente 100 ng a 10 mg, especialmente 0,5 µg a 200 µg da dita molécula imunogênica, molécula de ácido nucleico, vetor, hospedeiro ou anticorpo.

20 De acordo com uma outra forma de realização preferida da presente invenção o medicamento é administrado a um indivíduo na quantidade de 0,01 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, preferivelmente de 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal.

De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção o dito indivíduo está em risco de pegar uma alergia.

25 Um outro aspecto da presente invenção diz respeito ao uso de uma molécula hipoalergênica, uma proteína de fusão ou um anticorpo de acordo com a presente invenção para diagnosticar uma alergia ou monitorar o progresso de uma terapia contra alergia em um indivíduo.

A molécula hipoalergênica, proteína de fusão ou anticorpo de

acordo com a presente invenção pode não usado apenas em medicamentos, mas também podem ser adequadamente utilizados para vários propósitos de diagnóstico. Por exemplo, estas moléculas e proteínas de fusão podem ser usadas para diagnosticar uma alergia pela exposição, por exemplo, de uma amostra de um indivíduo que compreende células que liberam histamina ao dito polipeptídeo (ver, por exemplo, Purohit et al., Clin.Exp.Allergy 35 (2005): 186-192). Além disso, estas moléculas, proteínas de fusão e anticorpos podem ser imobilizados em uma superfície a fim de formar um polipeptídeo série/chip. Tais séries podem ser usadas, por exemplo, em avaliação de resposta alta a fim de diagnosticar uma alergia em várias amostras retiradas de diversos indivíduos.

A presente invenção ainda é ilustrada pelas seguintes figuras e exemplos, pelas seguintes figuras e exemplos, entretanto, sem estar restrito a esta.

A Fig. 1A mostra uma visão geral esquemática do vetor p89VP1.

A Fig. 1B mostra a sequência de DNA do local de clonagem múltiplo do vetor pET-17b e o gene codificador 89VP1.

A Fig. 1C mostra a representação esquemática de três possibilidades para criar fusões de ácido nucleico.

A Fig. 2 mostra um gel de SDS-PAGE a 12 % tingido com Coomassie blue contendo proteína rotulada por his de 89VP1 purificada (linha 1: 5 µg de marcador molecular; linha 2 a 5: 10 µl de amostras de eluição de 89VP1).

A Fig. 3 mostra o reconhecimento de IgG de 14VP1: Imunottingimento de 14VP1 e controles. Os pontos são visualizados por autoradiografia (linha 1 a 6: incubação com 1:500 a 1:16000 de anti-soro de anti-14VP1 de coelho; linha 7 a 12: incubação com 1:500 a 1:16000 de soro pré-imune diluído).

A Fig. 4 mostra resposta de IgG1 específica de 89VP1 em camundongos. Os grupos de camundongos foram imunizados com antígenos diferentes como indicado no topo de cada caixa. Os tituladores de IgG1 específicos de 89VP1 foram medidos por ELISA e são expressados como valores OD no eixo y. os resultados são mostrados como plotagens de caixa, onde 50 % dos valores estão dentro das caixas e não fora entre as barras. A linha dentro das caixas indica os valores medianos.

A Fig. 5 mostra resposta de IgG1 específica de Ph1 p 1 em camundongos. Os grupos de camundongos foram imunizados com antígenos diferentes como indicado no topo de cada caixa. Os tituladores de IgG1 específicos de rPhl p 1 foram medidos por ELISA e são expressados como o valor ótico (OD 405 nm) no eixo y. O valor ótico corresponde ao nível de anticorpo de IgG1 no soro de camundongo. Os resultados são mostrados como plotagens de caixa foram 50 % dos valores estão dentro das caixas e não fora entre as barras. A linha dentro das caixas indica os valores médios.

A Fig. 6 mostra resposta de IgG1 específica de extrato de pólen de capim-rabo-de-rato em camundongos imunizados. Os grupos de camundongos foram imunizados antígenos diferentes como indicado no topo de cada caixa. Os tituladores de IgG1 de extrato de pólen de capim-rabo-de-rato foram medidos por ELISA e são expressados como o valor ótico (OD 405 nm) no eixo y. O valor ótico corresponde ao nível de anticorpo de IgG1 no soro de camundongo. Os resultados são mostrados como plotagens de caixa, onde 50 % dos valores estão dentro das caixas e não fora entre as barras. A linha entre as caixas indica os valores médios.

A Fig. 7 mostra a média de % de inibição da ligação de pacientes de IgE a rPhl p 1 pela pré-incubação com anti-soro contra rPhl p 1, r89P5 e KLHP5 de todos os 19 pacientes. A % de inibição é mostrada no eixo y. Os resultados são mostrados como barras.

A Fig. 8 mostra a proliferação de células de baço de

camundongos imunizados. As células T de camundongos imunizados com antígenos diferentes como indicado no topo de cada caixa foram estimulados com peptídeo 5, 89VP1(89) e KLH. O meio foi usado como uma referência. No eixo y, o índice de estímulo é mostrado. Os resultados são apresentados em barras.

A Fig. 9 mostra resposta de IgG1, IgG2, IgG4 e IgA a 14VP1, 89VP1 e rPhl p 1 detectados no soro humano por medição ELISA. Os soros de 10 pacientes foram testados quanto a quatro anticorpos específicos para 89VP1, 14VP1 e rPhl p 1 como indicado no topo de cada caixa. Os soros retirados no outono e no inverno são mostrados do lado esquerdo e do lado direito de cada "par de barras", respectivamente. Os tituladores foram medidos por ELISA e são expressados como o valor ótico (OD 405nm) no eixo y. O valor ótico corresponde ao nível de anticorpo no soro humano. Os resultados são mostrados como plotagens de caixa, onde 50 % dos valores estão dentro das caixas e não fora entre as barras. A linha entre as caixas indica os valores médios.

A Fig. 10 mostra a detecção de anticorpos anti-89VP1 e anti-rPhl p 1 no soro de pacientes alérgicos. Soros de pacientes alérgicos a 5 Phl p 1 foram testados quanto a 7 anticorpos específicos para 89VP1 (barra esquerda de cada par de base) e rPhl p 1 (barra direita de cada par de base). Os tituladores foram medidos por ELISA e são expressados como o valor ótico (OD 405 nm) no eixo y. O valor ótico corresponde ao nível de anticorpo no soro humano. Os resultados são mostrados como plotagens de caixa, onde 50 % dos valores estão dentro das caixas e não fora entre as barras. a linha entre as caixas indica os valores médios.

A Fig. 11 mostra a ligação de IgG anti-14VP1 ao extrato de proteína de HRV14 e 14VP1 purificado (linha 1 e 4: 5 µg de Marcador; linha 2 e 4: Extrato de vírus; linha 2 e 5: 5 µg de 14VP1). A mancha de A e B foi incubado com soro imune anti-14VP1 e soro pré-imune, respectivamente. O

IgG ligado foi detectado por Western blotting e visualizado por autoradiografia.

A Fig. 12 mostra a neutralização de HRV14 (linha A (controle celular): As células após a pré-incubação de HRV14 com uma diluição de soro imune anti-14VP1 1:10²-1:10⁸ (série A1-A6); linha B: as células após a pré-incubação de HRV14 com uma diluição de soro pré-imune 1:10²-1:10⁸ (série B1-B6); Linha C: as células após incubação com HR-V14 10 TCD50-10⁶ TCD50 (série C1-C6); D5: as células após a incubação com soro pré-imune; D6: células após a incubação com soro imune). As células foram colocadas em todos os reservatórios e coloridas com cristal violeta após três dias.

A Fig. 13 mostra a reatividade de IgG de anti-soro anti-peptídeo com o alérgeno Phl p 5 completo. As reatividades de IgG (valores OD) ao Phl p 5 são mostrados para as 3 amostras de soro (sangramento 1: soro pré-imune; sangramentos 2 e 3: amostras de soro coletadas em intervalos mensais) obtidos de 6 coelhos, cada um dos quais foi imunizado com um dos peptídeos conjugados KLH.

A Fig. 14 mostra a atividade alérgênica de rPhl p 5 e a mistura de peptídeo foi detectada pela expressão de CD203c. As amostras de sangue heparinizadas de três pacientes alérgicos a Phl p 5 foram incubadas com diluições seriais de 10⁻⁴ a 10 µg/ml de alérgeno recombinante, uma mistura equimolar de peptídeos derivados de Phl p 5, anti-IgE ou tampão de controle (co, eixo x). As células foram então tingidas com CD203c mAb e analisadas quanto à expressão de CD203c em um FACScan. O índice de estímulo (SI) é apresentado no eixo y.

A Fig. 15 mostra a identificação de peptídeos derivados de Phl p 5 que induz respostas linfoproliferativas baixas. Os PBMCs de pacientes alérgicos a pólen de capim-rabo-de-rato foram estimulados com concentrações diferentes de peptídeo e para os propósitos de controle com in-

terleucin-2 (eixo x). o índices de estímulo (SI) são indicados no eixo y.

A Fig. 16 mostra peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 que induzem as respostas imunes de IgG específicas de Fel d 1 em coelhos. Seis coelhos foram imunizados com os peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 conjugados com KLH ou rFel d 1 não conjugado e 3 a 4 sangramentos foram retirados em intervalos mensais. As reatividades de IgG do soro pré-imune e dos anti-soros a rFel d 1 ligado a placa de ELISA são mostrados como densidades óticas (valores O.D., eixo y).

A Fig. 17 mostra a atividade alergênica baixa de peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 como determinado pela expressão de CD63 e CD203c em basófilos de pacientes alérgicos. Os PBMCs de 5 pacientes alérgicos a gatos foram incubados com diluições seriadas de Fel d 1 (caixas fechadas) ou uma mistura de peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 (caixas abertas) (eixo x). Os RR PBMCs de pacientes também foram sondados com diluições seriadas de peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 como componentes simples. A indução de expressão de marcadores de superfície CD203c e CD63 foi medida como intensidades de fluorescência média e os índices de estímulo calculados são mostrados no eixo y.

A Fig. 18 mostra que um tratamento com os peptídeos derivados de Bet v 1 ligados a KLH reduz as respostas linfoproliferativas ao rBet v 1 em camundongos sensibilizados. A proliferação de célula T foi medida em culturas celulares de baço após o estímulo in vitro com o alergeno de pólen de bétula recombinante de bétula Bet v 1 (barras brancas), KLH (barras negras) ou a mistura de peptídeo (barras cinza). As barras representam os índices de estímulo médios ($SI \pm SD$) para os grupos diferentes de camundongos.

A Fig. 19 mostra a vacinação profilática de camundongos simples com peptídeos derivados de Bet v 1 ligados por KLH que reduzem as respostas linfoproliferativas ao rBet v 1 após a sensibilização.

A Fig. 20 mostra que a vacinação profilática de camundongos simples com peptídeos derivados de Bet v 1 ligados por KLH induz a uma resposta de IgG específica de Bet v 1 e prepara para a indução de respostas de IgG específicas de alérgeno pelo alérgeno completo. As respostas de IgG (valores de OD: eixo y) para Bet v 1 foram medidas em quatro grupos de tratamento em pontos diferentes de tempo (eixo x).

A Fig. 21 mostra uma comparação de reatividade de IgE: a capacidade de ligação de IgE de peptídeos derivados de Phl p 5 (1, 2) e variantes (1a, 2b) foi determinada na aplicação de ensaios de mancha por pontos aplicando-se 0,20 g/ponto usando-se soros de 7 pacientes alérgicos ao pólen de grama (p1 a p7) e o soro de um indivíduo não atópico (NHS). rPhl p 5 foi usado como o controle positivo e HSA como o controle negativo. O IgE ligado foi detectado com IgE anti-humano rotulado por ^{125}I .

A Fig. 22 mostra uma resposta linfoproliferativa de peptídeos derivados de Phl p 5 (1, 2) e variantes (1a, 2b). Os PBMCs de pacientes alérgicos ao pólen de grama foram estimulados com concentrações diferentes de peptídeos e, para os propósitos de controle, com concentrações equimolares de rPhl p 5. Os índices de estimulação (SI) são indicados no eixo y.

A Fig. 23 mostra a proteção cruzada de anticorpos anti VP1.

EXEMPLOS:

Exemplo 1: Construção do vetor p89VP1

As amostras de estoque de vírus foram preparados por RT-PCR pela adição de 1 μl do inibidor RNase (Boehringer GmbH, Germany) a uma concentração final de 0,01 U/pl após a extração de RNA de sobrenadantes de cultura celular pelo kit QIAamp viral (Qiagen, Germany).

O plasmídeo p89VP1 (Fig. 1A) foi construído pela substituição do fragmento NdeI/EcoRI do local de clonagem múltipla de pET-17b com a sequência de cDNA codificadora pela proteína VP1 da cepa

rinovírus humano 89 (89VP1). Os locais de restrição NdeI e EcoRI (em pET-17b) foram usados para inserção de Asel/EcoRI ligado ao 89VP1 com ATG na extremidade 5', seis histidina seguidas pelo pela códon de interrupção TGA na extremidade 3' (Fig.1B).

5 A inserção de 89VP1 em pET-17b foi confirmado pelo sequenciamento de nucleotídeo.

Após a fusão de NdeI/Asel em vez do local NdeI CATAAT foi criado e não pode ser cortado com qualquer enzima disponível. Portanto, o local foi mutado por CTTAAG, o local de restrição de Afl II. Para inserir um
10 fragmento alergeno adicional, a seqüência ACCGTT na extremidade 3' foi mutado por ACCGGT, o local de restrição de AgeI. As seqüências de aminoácidos são exibidos abaixo nas seqüências de nucleotídeo de 89VP1. Os locais de restrição são mostrados sublinhados na Fig. 1B.

Os ditos locais de restrição Afl II e AgeI foram criados com o
15 Kit de mutagênese de local de mudança de Quick (Stratagene).

Os cDNAs para os fragmentos do gene deste modo podem ser inseridos pela fácil purificação nos locais de restrição remanescentes na extremidade 5' (usando Afl II) ou na extremidade 3' (usando AgeI) de 89VP1 ou em ambos os locais como indicado na Figura 1C. Os fragmentos alérgenos
20 recombinantes seriam deste modo expressados no terminal N e/ou no terminal C de 89VP1.

Tabela I: Iniciadores de clonagem e mutagênese (5' a 3')

89VP1 de clonagem		SEQ ID N°.
89VP1 avançado	CGGAATTCATTAATATGAACCCAGTTGAAAATTATATAGATAGTGTATTA	1
89VP1 reverso	CGATTAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGACGTTTGTAAACGGTAA	2
89VP1 de clonagem		SEQ ID N°.
Mutagênese		
Afl II avançado	CTTAAGAAGGAGATATACTTAAGATGAACCCAGTTG	3
Afl II reverso	CAACTGGGTTTCATCTTAAGTATATCTCCTTCTTAAAG	4
AgeI avançado	CCTGATGTTTTTACCGGTACAAACGTCCACCAC	5
AgeI reverso	GTGGTGGACGTTTGTACCGGTAAAAACATCAGG	6

Exemplo 2: Clonagem de uma construção que expressa uma

proteína de fusão do fragmento alergeno 89VP1

O método descrito acima foi exemplificado por um fragmento alergeno Phl p 1 do terminal C, isto é peptídeo 5 (CVRYTTEGGTK-TEAEDVIPEGWKADTAYESK; M. Focke et al. FASEB J (2001) 15:2042-4). A seqüência de DNA de peptídeo 5 foi amplificado por PCR usando o cDNA Phl p 1 (GenBank: X78813) como um padrão (Iniciadores: Phl p 1 avançado 5'-CGCGCTTAAGATGGTCCGCTACACCACCGAGGGC-3' (SEQ ID N°. 7); Phi p 1 reverso 5'-CGCGCTTAAGCTTGGACTCGTAG GCGGTGTCGGC-3' (SEQ ID N°. 8)). O produto PCR foi inserido no local de restrição Afl II do vetor p89VP1 e a construção resultante é referida como vector p89P5 e produto do gene r89P5.

Exemplo 3: Expressão e purificação da proteína de fusão do peptídeo 5 89VP1 e 89VP1

A fim de atingir a expressão do 89VP1 ou r89P5 (proteína de fusão de peptídeo 5 de 89VP1 recombinante), os plasmídeos foram transformados em E. coli BL21 (DE3). As células de E. coli transformadas foram desenvolvidas em 250 ml do meio LB contendo 100 mg/l de ampicilina a 37° C por uma densidade óptica (600 nm) de 0,4, e a expressão da proteína foi induzida pela adição de isopropil-beta-D-tiogalactosidase (IPTG) a uma concentração final de 1 mM. As células de E. coli foram coletadas após 4 horas pela centrifugação a 3500 rpm a 4° C por 10 minutos. A purificação foi realizada com o protocolo Qiagen usando Qiagen Ni-NTA e colunas. O grânulo celular foi recolocado em suspensão sob condições de desnaturação em 5 ml de 6 M de cloridreto de guanidínio por 1 hora. Após a centrifugação (20 minutos, 10000 x g) o sobrenadante foi incubado com 1 ml de Ni-NTA por uma hora adicional. A suspensão foi então carregada em uma coluna, lavada duas vezes com 5 ml de tampão de lavagem (8 M de uréia de pH 6,3) e então eluído com 4 ml de tampão de eluição (8 M de uréia de pH 3,5). A renaturação foi atingida após a diálise com molaridade decrescente de uréia.

A pureza e tamanho da proteína purificada foram analisados por SDS-PAGE como mostrado na Figura 2. As fitas de proteína correlacionada com o tamanho de proteína calculado de 33,6 kD. A integridade das proteínas também foram confirmados pela análise de Western blot, usando anticorpo tag anti-histidina.

Exemplo 4: Detecção de anticorpos de coelho específico 14VP1 pelo imunottingimento

5 μ g 14VP1 (proteína VP1 da cepa de rinovírus humano 14) e controles (Bet v 1, Phl p 5, BSA) foram marcados em faixas de membrana nitrocelulose. Estas faixas foram expostas por uma diluição de anti-soro de coelho anti-14VP1 (linha 1 a 6) e soro pré-imune (linha 8 a 12). Anticorpos IgG de coelho ligado foram detectados com IgG anti-coelho de burro rotulado 125I 1:1000 e visualizado por autografia (Fig.3).

A análise de mancha de ponto do soro anti-14 VP1 de coelho mostrou que 14VP1 é fortemente imunogênico. Os anticorpos IgG ainda foram detectados com um 1:16000 de diluição do anti-soro em contraste ao soro pré-imune e os controles Bet v 1, Phl p 5 e BSA.

Exemplo 5: Resposta de anticorpo específico 89VP1 em camundongos determinados por ELISA

20 A fim de determinar a imunogenicidade de 89VP1 e esta capacidade de atuar como um carreador pelo peptídeo 5, grupos de camundongos de balb/c fêmeas de seis semanas de idade (Charles River) foram imunizados com os antígenos seguintes: peptídeo 5 ligado ao maleimida KLH, KLH (KLHP5) e peptídeo 5 ligado a KLH EDC (KLHP5edc). A ligação química foi feita com a maleimida Imject ativado 25 mCKLH e Kit EDC imunogênio Imject (Pierce). O grupo maleimida reage com grupos SH e o EDC reage com carboxila e grupos amino para formar ligações estáveis. Os grupos de 4 camundongos foram imunizados com camundongos 89VP1, r89P5 e 89P5edc e 2 foram imunizados com apenas

peptídeo 5 (cada 5 µg e mistura 1:2 com hidróxido de alumínio). Os camundongos foram imunizados subcutaneamente em aproximadamente intervalos de três semanas e sangrados a partir das veias da calda. O nível de anticorpo IgG1 específico 89 VP1 foi determinado por ELISA.

5 As placas de ELISA (Nunc) foram cobertas com 5 µg/ml de 89VP1. Os camundongos anti-89VP1, anti- r89P5 e soro de peptídeo 5 foram diluídos a 1:500. O IgG1 ligado foi ligado com IgG1 de anti-camundongo de rato (BD Pharmingen) 1:1000 e então com IgG de cabra anti-rato ligado por POX (Amersham Bioscience) 1:2000. O valor óptico (OD 405nm) é exibido
10 no eixo y e correspondem ao nível do anticorpo IgG1 no soro de camundongo (Fig.4).

O KLHP5, KLHP5edc, KLH e peptídeo 5 foram usados como controles. Os anticorpos IgG1 foram detectados com um título aumentado durante a imunização em camundongos injetados com 89VP1 (89VP1,
15 89P5edc e r89P5). Coelhos imunizados com 89VP1, r89P5 e KLHP5 mostrou o mesmo resultado.

Exemplo 6: Resposta de anticorpo específico rPhl p 1 em camundongos determinados por ELISA

Para avaliar se a imunização com r89P5 será induzido com os
20 anticorpos IgG que reage com o Phl p 1 completo, o mesmo método e os mesmos soros de camundongos foram usados como descrito no exemplo 5. As placas de ELISA foram cobertas com 5 µg/ml de rPhl p 1 e o título de anticorpo IgG1 foi determinado (Fig.5).

Todos os peptídeos derivados de Phl p 1 ligados ao KLH ou
25 89VP1 induzido pelos anticorpos IgG1 específico com respostas crescentes durante a imunização. Coelhos imunizados com r89P5 e KLHP5 mostrou o mesmo resultado.

Exemplo 7: Detecção de ELISA de anticorpos de IgG1 específicos de extrato de pólen de capim-rabo-de-rato

A imunização de camundongos e análise de ELISA foi realizado como descrito na seção 5. Enquanto o extrato de pólen de capim-rabo-de-rato foi revestido (100 µg/ml) nas placas de ELISA e o título de anticorpo IgG1 foi determinado (Fig.6).

5 Após anticorpos específico de extrato de três imunizações IgG1 pode ser detectado em camundongos imunizado com peptídeo 5.

Exemplo 8: Ligação de IgE de pacientes com bloqueio de anticorpos anti-r89P5 de coelho por rPhl p 1

10 Para determinar a capacidade de coelho Ig induzido por peptídeo para induzir a ligação dos anticorpos IgE de pacientes alérgicos por rPhl p 1, as placas de ELISA foram cobertas com 1 µg/ml de rPhl p 1, lavado e bloqueado. As placas foram pré-incubadas com 1:100 diluído pelo peptídeo anti-coelho (89P5, KLHP5), um rPhl p 1 anti-coelho e, para os propósitos de controle, com o soro pré-imune correspondente. Após a lavagem, as placas
15 foram incubadas com soro humano de pacientes Phl p 1 alérgicos (1:3 diluído) e IgE ligado foi ligado com IgE anti-humano de camundongo (Pharmingen 1:1000) e então como IgG anti-camundongo de ovelha ligado por POX (Amersham Bioscience) 1:2000.

20 A porcentagem da inibição de ligação IgE atingido pela pré-incubação com o anti-soro de anti-peptídeo foi calculado como seguintes:
 $100 - OD_i / OD_p \times 100$.

25 O OD_i e OD_p representa as extinções após a pré-incubação como o coelho imune e soro pré-imune, respectivamente. A Tabela 2 mostra a capacidade de anticorpos de peptídeo anti-Phl p 1 para induzir a ligação de 19 pacientes alérgicos IgE para completar rPhl p 1. A Figura 7 exhibe o meio de inibição (em %) e todos os soros imunes anti-rPhl p 1, anti-r89P5 e anti-KLHP5. O soro de anti-peptídeo bloqueado com a ligação de IgE melhor do que rPhl p 1. A capacidade para a inibição é com 89P5 e KLHP5 quase parecido. A Tabela 2 mostra uma inibição (em %) de todos os 19 pacientes.

Tabela 2: % de inibição de ligação IgE de 19 pacientes por rPhl p 1 após a incubação com anti-rPhl p 1 de coelho, r89P5 e anti-soro anti-KLHP5

Paciente	% de inibição		
	rPhl p 1	r89P5	KLHP5
1	32,343	68,291	68,213
2	29,373	64,915	61,509
3	10,367	59,469	66,270
4	28,087	73,906	71,330
5	13,808	49,358	45,372
6	22,597	66,259	67,331
7	5,375	26,667	18,902
8	22,478	42,612	47,979
9	5,019	39,822	56,837
10	13,756	53,878	63,047
11	26,444	58,430	57,944
12	25,795	67,243	62,458
13	41,330	75,694	79,517
14	35,543	85,714	87,012
15	45,796	84,255	75,185
16	32,641	76,508	77,412
17	26,483	63,171	47,735
18	19,229	85,750	86,642
19	31,142	62,428	71,086

Exemplo 9: Proliferação de célula T de células do baço do camundongo após a estimulação do antígeno.

- 5 Os grupos de três camundongos foram imunizados com KLH, KLHP5 e KLHP5edc. Os grupos de 4 camundongos foram imunizados quatro vezes com 89VP1, r89P5 e 89P5edc, e 2 camundongos foram imunizados com apenas peptídeo 5 (5 µg cada). As células do baço foram retiradas 10 dias após a última imunização e culturas celulares simples foram estimuladas
- 10 e triplicadas em placas de 96 reservatórios com peptídeo 5 (P5), 89VP1, KLH, Con A e um meio como um controle positivo e negativo, respectivamente. Após quatro dias a [³H]timidina radioativa 0,5 de µCi foi adicionado em cada reservatório. As células foram então coletadas como uma placa de unifiltro em Coletor de Célula Packard após 15 horas. A
- 15 radioatividade associada celular foi medida com um beta-contador. Os índices de estimulação onde calculados e são mostrados no eixo y. O antígeno que foi usado para estimulação é mostrado no eixo x. Cada caixa representa o dado

do antígeno que foi usado para a imunização dos camundongos (Fig. 8). Todos os valores acima dois contam como positivo. Os camundongos KLH e KLHP5 imunizados são apenas positivos quando estimulados com KLH e os camundongos de peptídeo 5 são completamente negativos. O grupo KLHP5edc também é negativo que corresponde aos resultados de ELISA. As células de camundongos r89P5, 89P5edc e 89VP1 imunizados proliferaram apenas após a estimulação com 89VP1. O camundongo de controle simples mostra não proliferação em todos os casos. Estes resultados mostram que os epítomos das células T são fornecidos pelo carreador 89VP1 e não pelo peptídeo 5.

Exemplo 10: Detecção de anticorpos 14VP1-, 89VP1- e rPhl p 1 específicos no soro humano obtido no Outono e Inverno por ELISA.

O 5 soro humano de pessoas escolhidas aleatoriamente foram retirados no Outono e cinco no Inverno. O nível de anticorpo IgG1, IgG2, IgG4 e IgA contra 14VP1, 89VP1 e rPhl p 1 foi determinado por ELISA como descrito no exemplo 5. O IgG1, IgG2, IgG4 e IgA humanos foram detectados (BD Pharmingen) 1:1000 com IgG anti-camundongo de ovelha ligado por POX (Amersham Bioscience) 1:2000. Um alto título de anti-14VP1 e 89VP1 IgG1 do soro retirado no Outono e Inverno pode ser detectado (Fig. 9). O título do anticorpo anti-rPhl p 1 IgG1 foi mais inferior. Os anticorpos IgG2, IgG4 e IgA podem ser detectados em todos os casos no nível mais baixo. As proteínas VP1 de cepas HRV diferentes são estritamente relacionadas e a reatividade cruzada tem sido mostrado em outros estudos.

Exemplo 11: Anticorpos Anti- 89VP1 e anti-rPhl p 1 de pacientes alérgenos Phl p 1

O soro de cinco pacientes alérgenos Phl p 1 foram retirados e um experimento de ELISA foi realizado como descrito no exemplo 5. As placas de ELISA foram cobertas com rPhl p 1 e 89VP1 e o título do anticorpo IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgE específico foram determinados (Fig.

10). Mais anticorpos anti-89VP1 IgG1 do que anticorpos anti-rPhl p 1 IgG1 podem ser detectados.

Exemplo 12: Detecção de ligação de anticorpo anti-14VP1 pela análise Western blot do vírus total

5 A ligação do anticorpo IgG do soro do 14VP1 de coelho injetado pelo vírus total foi confirmado pelo uso do vírus HRV14 total (linha 2 e 5) e 5 µg purificado por 14VP1 (linha 3 e 6) como controle. O extrato do vírus foi separado por 12 % de SDS-Page e tingido na membrana de nitrocelulose. O anti-soro de coelho anti-14VP1 (linha 1 a 3) 1:500 e soro pré-imune (linha 4 a 6) 1:500 foram testados pela ligação por HRV14 e 14VP1. O IgG ligado foi ligado com anticorpo anti-coelho de burro rotulado 125I e visualizado por autografia (Fig.11).

A ligação do anti-soro 14VP1 pode ser detectado no mesmo grupo (33,6 kD) como 14VP1.

15 Exemplo 13: A neutralização de anticorpos do rinovírus 14 humanos intactos

A dose de cultura de tecido 50 (TCD50) de HRV14 foi determinado. Portanto, uma diluição do vírus de $1:10^2$ a $1:10^8$ em MEM de Eagle 1 % de FCS e 40 mM de $MgCl_2$ foi realizado e incubado em placas de 20 24 reservatórios a 34° C em uma atmosfera umidificada de 5 % de CO_2 junto com HeLa de células Ohio por três dias. Como controle sem o vírus também foi expandido.

O efeito citotóxico do vírus foi visualizado com violeta genciana após três dias e o TCD50 (a diluição onde 50 % das células estão 25 mortas) foi calculado.

As diluições do soro e vírus (100TCD50) na fila A e B foram incubados a 34 ° C. Após 2 horas as células foram expandidas em todos os reservatórios. D5 e D6 são controles de soro. O esquema experimental é mostrado na Fig. 12. O efeito de neutralização dos anticorpos foi detectado

após três dias com violeta genciana (Fig. 12).

Exemplo 14: Características dos peptídeos sintéticos derivado de Phl p 5

Os peptídeos foram sintetizados usando a estratégia Fmoc com
 5 ativação HBTU (0,1 mmol dos ciclos de escala menores) no modelo de
 sintetizador de peptídeo de Biosystems Applied 433A como descrito. (Focke
 et al. Faseb J (2001) 15:2042). Após a análise da profundidade de seis
 alergen Phl p 5 de peptídeos derivados de Phl p 5 que variam de 31 (P1:
 3026 Dalton) a 38 (P6: 3853 Dalton) aminoácidos em comprimento que são
 10 ricos em aminoácidos expostos à solventes foram preparados (Tabela 3).

Estes peptídeos tem pontos isoelétricos entre 4,32 e 8,98 e três
 destes (peptídeo 3, 4 e 6) podem conter epítomos das células T humanas.

Tabela 3. Características dos peptídeos sintéticos não alergênicos derivados
 de Phl p 5. Posição (em relação à molécula Phl p 5), seqüência, comprimento,
 15 peso molecular (MW), ponto isoelétrico (pI) e a presença de epítomos das
 células T dos peptídeos derivados de Phl p 5 são exibidos. O resíduo de
 cisteína adicionado para facilitar a ligação é marcado em evidente e
 sublinhado.

	Posição aa	Seqüência	Comprimen to	MW	P ⁱ	Epítomo de célula T
Pept, 1 (SEQ ID Nº, 9)	98- 128	CGAASNKAFAEGLSGEP- KGAAESSKAALTSK	32	3026	8,16	-
Pept, 2 (SEQ ID Nº, 10)	26-58	ADLGYPATPAAPAAGYT PATPAAPAEAPAGKC	34	3068	4,37	-
Pept, 3 (SEQ ID Nº, 11)	132- 162	AYKLAYKTAEGATPEAKY- DAYVATLSEALRIC	32	3482	6,29	+
Pept, 4 (SEQ ID Nº, 12)	217- 246	CEAAFNDIAKASTG- GAYESYKFIPALEAAVK	31	3236	4,87	+
Pept, 5 (SEQ ID Nº, 13)	252- 283	TVATA- PEVKYTVFETALKKAITAM SEAQKAAC	33	3501	8,98	-
Pept, 6 (SEQ ID Nº, 14)	176- 212	CAEEVKVIPAGELQVIEK- VDAAFKVAATAANAAPAND K	38	3853	4,66	+

Exemplo 15: Falta dos peptídeos derivados de Phi p 5 da
 20 reatividade IqE e atividade alergênica

15.1. Falta da reatividade IgE

Para analisar a reatividade IgE de seis peptídeos derivados de Phl p 5, o isolado bem como peptídeos ligados por KLH derivados de Phl p 5 foram comparados com rPhl p 5 completo que diz respeito a capacidade de
5 ligação de IgE por ELISA usando soro de 29 pacientes alérgicos à pólen de capim (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização sorológica de 29 pacientes alérgicos à pólen de capim e um controle não alergênico. Sexo, idade, níveis IgE de soro total (kU/L), IgE específico do extrato de capim-rabo-de-rato (kUA/L), anticorpos
10 IgE específicos por rPhl p 5 e os 6 peptídeos isolados (P1 a P6) e ligados a KLH (KLH-PI-KLH-P6) foram medidos por ELISA e ODs (densidades ópticas) são mostrados. Traços indicam a falta da reatividade IgE ao isolado bem como aos peptídeos ligados por KLH.

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

As placas de ELISA (Nunc Maxisorp, Denmark) foram cobertas com peptídeos derivados de Phl p 5 (5 µg/ml) ou rPhl p 5 como controle (5 µg/ml), lavado e bloqueado. Subseqüentemente, as placas foram incubadas com 1:3 de soro de 29 pacientes alérgicos à pólen de capim diluídos e de um indivíduo não atópico durante a noite a 4° C. O sofrimento dos pacientes alérgicos a pólen de capim a partir de rinoconjuntivite alérgica e/ou asma foram selecionados de acordo com a história do caso indicado pela polinose de capim sazonal e caracterizado pelo teste da picada da pele com extrato de pólen de capim-rabo-de-rato e teste CAP-FEIA sorológico (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden). Os níveis IgE totais no soro foram determinados pela medição de CAP (Pharmacia). Anticorpos IgE específicos por rPhl p 5 foram determinados por ELISA. O soro a partir de 29 pacientes alérgicos à pólen de capim e um indivíduo não atópico foram usados para estudos de competição IgE. Os pacientes alérgicos ao grupo de pólen de capim consiste de 13 machos e 16 fêmeas com uma faixa de idade de 35 anos (que variam de 25 a 51 anos) (Tabela 4).

Anticorpos IgE ligados foram detectados com um anticorpo IgE anti-humano monoclonal de camundongo ligado por alcalina-fosfatase 1:1000 diluído (Pharmlingen, CA).

Os níveis IgE totais e IgE específico de extrato de pólen varia de 24,9 a 2000 kU/L (significa: 262,7) e 2,2 a 100 kUA/L (significa: 41,5), respectivamente. Todos os pacientes contendo anticorpos IgE específicos de rPhl p 5 variarão entre 0,157 a 2,530 OD unidades (significa: 1,082 OD unidades), mas nenhuma dos 29 pacientes mostraram reatividade IgE por qualquer dos peptídeos (P1 a P6) ou por uma mistura equimolar dos peptídeos (OD ≤ 0,08). Estes resultados demonstram que nenhum soro contendo anticorpos IgE detectáveis com especificidade por qualquer dos seis peptídeos derivados de Phl p 5.

15.2. Atividade alergênica reduzida dos peptídeos como

detectado pela expressão CD 203 c em basófilos: Ativação de Basófilo e citometria de fluxo:

A super-regulação de CD 203 c tem sido descrito como um marcador substituto pela ativação de Basófilo induzido por alérgeno e desgranulação (Hauswirth et al., J Allergy Clin Immunol 2002; 110:102). Portanto, a atividade alérgênica do alérgeno rPhl p 5 completo e uma mistura equimolar de peptídeos pela medição de CD 203 c e sub-regulação em basófilo dos pacientes alérgicos à pólen de capim foram comparados.

As células sanguíneas periféricas foram obtidas de 3 doadores alérgicos após informado tem sido dado permissão. Aliquotas de sangue heparinizadas 1,11) foram incubadas com diluições em série de alérgenos recombinantes (10 a 4 por 10 µg/ml), anticorpo anti-IgE (1 µg/ml) ou tampão de controle (solução salina tamponada de fosfato = PBS) por 15 minutos a 37° C. Após a incubação, as células foram lavadas em PBS contendo 20 mM de EDTA. As células foram então incubadas com 10 µl de CD203c conjugado por PE mAb 97A6 por 15 minutos em temperatura ambiente (RT). Depois disso, os eritrócitos foram lisados com 2 ml de solução de FACS™ Lysing. As células foram então lavadas, recolocadas em suspensão em PBS, e analisadas pela citometria de fluxo de duas cores em um FACScan (Becton Dickinson), usando um software Paint-a-Gate. A Sub-regulação induzida por alérgeno de CD203c foi calculado dos meios de intensidade de fluorescência (MFIs) obtido com células estimuladas (MFIstim) e não estimuladas (MFIcontrol), e expressadas como índice de estimulação (MFIstim : MFIcontrol). Um SI de $\geq 2,0$ ($\geq$ sub-regulação de 2 bocas) foi considerado indicativo de uma resposta específica.

Como mostrado na Figura 14 foi observado que o rPhl p 5 completo mostra um aumento dependendo da dose (10 a 4 por 10 µg/ml) na expressão de CD203c no basófilo de sangue periférico em um indivíduo sensibilizado, considerando uma mistura equimolar dos peptídeos mostram

nenhum efeito.

A determinação da expressão CD 203c em basófilo a partir dos pacientes alérgicos de pólen de capim indicam que nenhuma atividade alergênica pode ser observado com os peptídeos derivados de Phl p 5.

5 Exemplo 16: Imunização com os peptídeos derivados de Phl p 5 que induz anticorpos IgG reativo com rPhl p 5 e alergenios naturais a partir de espécies de capim diferentes.

16.1. Alergenios recombinantes e extratos alergenios

10 O recombinante purificado Phl p 5 foi expressado em *E. coli* como descrito (Vrtala et al. J of Immunol (1993) 151:4773-4781).

O pólen de capim de *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Anthoxanthum odoratum* foram obtidos de Allergon Pharmacia (Sweden), e um extrato de pólen aquoso foi preparado como
15 descrito (Vrtala et al., Int Arch Allergy Immunol (1993) 102:160-9.).

16.2. A imunização de coelhos

Os peptídeos purificados por HPLC foram ligados ao KLH (hemocianina do lapa buraco de fechadura, MW 4,5 x 10³ a 1, 3 x 10⁷, Pierce, USA) de acordo com conselho dos fabricantes e purificados usando
20 um kit de conjugação (Sigma, USA).

Os coelhos foram imunizados com cada um dos peptídeos conjugados por KLH (200 µg/injeção) e, para os propósitos de controle, com rPhl p 5 completo usando Adjuvantes completos e incompletos de Freund's (Charles River). As amostras do soro foram obtidas no intervalo de quatro
25 semanas.

16.3. Reatividade de anticorpos de coelho com rPhl p 5 completo e alergenios naturais a partir de espécies de capim diferentes

A fim de investigar se os anticorpos induzidos após a imunização com peptídeos ligados por KLH reconhece o rPhl p 5, alergenios

de pólen de capim relacionado ao Phi p 5 e Phl p 5 natural a partir de outras espécies de pólen de capim, experimentos de ELISA foram realizados. Para detecção de ELISA, as placas (Nunc Maxisorp, Denmark) foram cobertas com extratos de alérgenos de pólen (100 µg/ml: *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Anthoxanthum odoratum*) ou o alérgeno purificado recombinante (5 µg/ml: rPhl p 5). As placas de ELISA foram lavadas e bloqueadas e subsequentemente incubadas com anti-soro de peptídeo anti-coelho e soro pré-imune correspondente diluído a 1:2500. O IgG de ligação de coelho foi ligado com um anti-soro Ig de anti-coelho de cabra ligado por HRP (Jackson Immunresearch, Pennsylvania). Os meios dos resultados representam a determinação duplicada com um erro de < 5 % (Figura 13, Tabela 5).

Tabela 5: Reatividade cruzada de anti-soro de peptídeo anti-Phi p 5 com grupo rPhl p 5 e 5 alérgenos naturais de *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Anthoxanthum odoratum*. As reatividades IgG (valor OD) de anti-soro de peptídeo (anti-P1 ao anti -P6) por Phl p 5 e extratos de pólen a partir do pólen de capim são exibidos por 6 coelhos que foram imunizados com peptídeos derivados de Phl p 5 conjugados por KLH (P1-P6).

Reatividade cruzada de anti-soro de anti-peptídeo com rPhl p 5 e os extratos de pólen de capim.

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

16.4. Imunização com peptídeos Phl p 5 que induz a reatividade cruzada dos anticorpos IgG

A imunização com cada um dos peptídeos induz uma resposta IgG específica de Phl p 5 forte que tornar-se detectável quatro semanas após a primeira imunização e aumentada após a segunda imunização (Figura 13). A imunização com peptídeo 2 induz o Phl p 5 mais alto de resposta IgG específica seguido pelos peptídeos 6, 4, 5 e 1 que induz a resposta inferior. Com a exceção de anticorpos de anti-peptídeo 1 que reativada que falta com 5 grupos alergenicos em *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale* e *Hordeum vulgare*, o outro anti-soro de peptídeo reagido cruzado com cada um dos extratos de pólen de capim testados (Tabela 5).

Exemplo 17: Imunização com os peptídeos derivados de Phl p 5 que induz anticorpos IgG que inibem a ligação dos pacientes alérgicos ao pólen de capim IgE por Phl p 5

17.1. Inibição de ligação IgE de pacientes alérgicos por rPhl p 5a pelo IgG específico de peptídeo

A informação que diz respeito à capacidade dos peptídeos induz anticorpos bloqueadores é importante visto que os anticorpos bloqueadores foram mostrados para fazer um papel maior na imunoterapia.

A fim de examinar a capacidade do coelho Ig induzido por peptídeo para induzir a ligação de IgE de pacientes alérgicos para completar rPhl p 5 por ELISA, os experimentos de competição foram realizados usando soro de 29 pacientes alérgicos à pólen.

As placas de ELISA foram cobertas com rPhl p 5 (1 µg/ml) e pré-incubado com uma diluição de 1:250 de cada um do anti-soro de anti-peptídeo (anti-P1-anti-P6), uma mistura do anti-soro de anti-peptídeo, um anti-soro de anti-rPhl p 5 ou para os propósitos de controle, com o soro pré-imune correspondente ou uma mistura do soro pré-imune. Após a lavagem, as placas foram incubadas com 1:3 diluídas no soro de 29 pacientes alérgicos à pólen

de capim e IgE ligado a anticorpos foram detectados com o anticorpo IgE anti-humano monoclonal de camundongo ligado à alcalina fosfatase (Pharmingen). Uma inibição da porcentagem de ligação IgE atingido pela pré-incubação com o anti-soro de anti-peptídeo foi calculado como seguintes: % de inibição da ligação IgE = $100 - OD_i / OD_p \times 100$. O OD_i e OD_p representa as extinções após a pré-incubação com os coelhos imunes e soro pré-imune, respectivamente. A pré-incubação de Phl p 5 com coelho Ig induzido pelo IgE da reatividade dos pacientes alérgicos inibidos por peptídeo G por um grau de variação. O grau médio da inibição da inibição de IgE varia de 19,3 % pelo IgG anti-peptídeo 6 a 28,5 % com IgG anti-peptídeo 1. Anticorpos de coelho crescente mais uma vez completam Phl p 5 induzido um meio de inibição da ligação IgE de 43,6 %.

Tabela 6: Anti-soro de peptídeo anti-Phl p 5 de coelho que inibe o a ligação do soro IgE de pacientes alérgicos ao pólen de capim-de-rabo-de-rato por Phl p 5. Uma inibição da porcentagem de ligação IgE por Phl p 5 é exibido para cada paciente após a pré-incubação de Phl p 5 com anti-soro de anti-peptídeo (anti-P1 a anti-P6), com uma mistura de seis anti-soro de anti-peptídeo (anti-P1-P6) ou com um anti-soro de anti-rPhl p 5. A porcentagem significa a inibição que é exibida na linha da parte inferior. N.d.: Nenhum Realizado.

% da inibição da ligação IgE por Phi p 5 com anti-soro específico por								
Paciente	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1-P6	Phl p 5
1	0	5	4	0	0	0	0	nd
2	1	10	4	0	0	0	0	nd
3	28	35	28	39	37	38	46	50
4	33	40	33	42	35	45	54	20
5	0	0	3	8	8	0	9	nd
6	46	34	39	47	47	34	21	56
7	41	48	46	49	50	45	49	60
8	41	8	34	18	39	0	0	8
9	6	0	0	0	0	0	0	nd
10	34	46	30	35	39	42	48	38
11	28	0	32	0	28	9	0	nd
12	33	0	27	4	33	0	0	nd
13	30	31	29	0	29	11	15	0
14	46	14	49	17	47	2	8	15

15	48	44	55	22	46	25	23	72
16	41	0	44	24	41	19	8	28
17	52	71	50	57	49	59	73	82
18	43	17	42	0	32	0	10	0
19	5	17	19	16	7	0	4	nd
20	42	54	43	38	38	41	48	65
21	39	51	46	43	43	43	40	39
22	44	49	44	46	44	40	50	70
23	38	54	40	42	48	40	50	66
24	23	0	15	0	0	0	0	nd
25	0	35	0	8	4	28	43	nd
26	51	26	31	21	24	0	19	nd
27	14	15	3	0	9	11	25	nd
28	9	0	17	0	9	0	0	nd
29	10	44	11	31	21	28	24	73
significa	28,5	25,8	28,2	20,9	27,8	19,3	23,0	43,6

Exemplo 18: Peptídeos derivados de Phl p 5 induz as respostas de linfoproliferativa específica baixa.

18.1. Ensaio de linfoproliferação

A fim de identificar os peptídeos com a reatividade da célula T possível mais baixa para minimizar os efeitos colaterais relacionados à terapia, a reatividade celular T foi examinada pelos ensaios de linfoproliferação. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas de 2 pacientes alérgicos à pólen de capim pela centrifugação gradiente de densidade Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech, UK). O PBMC (2 x 10⁵) foi cultivado e triplicado em placas de 96 reservatórios (Nunc; Nalge Nunc International, Denmark) em 200 µl de meio de cultura de soro livre Ultra (BioWhittaker, Rockland, ME) suplementado com 2 mM de glutamina L (SIGMA, USA), 50 µM de beta-mercaptoetanol (SIGMA) e 0,1 mg de gentamicina por ml (SIGMA) a 37° C e 5 % de CO₂ em uma atmosfera umidificada. As células foram estimuladas com concentrações diferentes de peptídeos sintéticos (1,25, 0,6 e 0,3 µg por reservatório) e, por comparação, com 4 U de Interleucina 2 por reservatório (Boehringer Mannheim, Germany) e com meio sozinho. Após 6 dias de cultura 0,5 µCi por reservatório [³H]timidina (Amersham Pharmacia Biotech) foi adicionado e 16 horas depois disso incorporado a radioatividade ser medida pela contagem de

cintilação líquida usando um contador de cintilação de microbeta (Wallac ADL, Germany). O meio cpm foi calculado a partir do triplicados, e o índice de estimulação (SI) foi calculado como o quociente do cpm obtido por antígeno ou estimulação de Interleucina 2 e os controles não estimulados.

5 Os PBMCs a partir dos pacientes alérgicos a pólen de capim-rabo-de-rato foram estimulados com concentrações diferentes de peptídeos sintéticos. Os índices de estimulação com peptídeos foram significativamente inferiores do que com IL2. Os peptídeos derivados de Phl p 5 induz as respostas linfoproliferativa específica baixa. A resposta inferior foi vista com
10 peptídeo 5 seguido pelo peptídeo 4.

Exemplo 19: Características dos peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1

A fim de obter os peptídeos adequados para vacinação de alergia de gato, cinco peptídeos que são 30 a 36 aminoácidos longos e cobre a
15 molécula total que são designadas de acordo com a seqüência de aminoácido conhecido de Fel d 1.

Os peptídeos foram sintetizados usando uma estratégia Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonil) com ativação de HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il) 1,1,3,3 hexafluorofosfato de tetrametilurônio) (0,1 mmol dos ciclos de escala
20 menores) no modelo de sintetizador de peptídeo de Biosystems Applied 433A (USA). As resinas PEG-PS pré-carregadas (polietilenoglicol poli-estireno) (carregando 0,15 a 0,2 mmol/g) (PerSeptive Biosystems, UK) foram usados como fase sólida para construir os peptídeos. As químicas foram adquiridas de Applied Biosystems. A ligação de aminoácidos foi confirmado pelo
25 monitoramento da condutividade em um sistema de controle de resposta. Um resíduo de cisteína foi adicionado aos polipeptídeos 1, 3, 4, e 5 para facilitar a ligação aos carreadores (Tabela 7). Os peptídeos foram clivados a partir de resinas com uma mistura de 250 µl de água destilada, 250 µl de triisopropilsilano (Fluka, Switzerland), 9,5 ml de TFA por 2 horas e

precipitado em terc-butilmetiletilico (Fluka, Switzerland) (Focke 2001). A identidade dos peptídeos foi checada pela espectrometria de massa e peptídeos foram purificados a > 90 % de pureza pelo HPLC preparativo (PiChem, Austria).

- 5 Tabela 7: Características moleculares dos peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1. A posição dentro da molécula do Fel d 1 natural, seqüência de aminoácido, diversos aminoácidos, calculados por peso molecular (MW) e ponto isoelétrico teórico (pI) dos peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 são mostrados. Todos os peptídeos são solúveis em água.

	Posição	Seqüência de aminoácido	Comprimento aa	MW	P ⁱ
Pept, 1 SEQ ID No, 15	cadeia 1, aa 1-34	EICPAVKRDVDLFLTGTPDEY VEQVAQYKALPVVC	35	3911	4,30
Pept, 2 SEQ ID Nº, 16	cadeia 1, aa 35-70	LENARILKNCVDAKMTEEDK ENALSLLDKIYTSPLC	36	4083	4,72
Pept, 3 SEQ ID Nº, 17	cadeia 2, aa 1-34	VKMAITCPIFYDVFFAVANGN ELLDLSLTKVNAC	35	3835	4,56
Pept, 4 SEQ ID Nº, 18	cadeia 2, aa 35-63	TEPERTAMKKIQDCYVENGLI SRVLDGLVC	30	3382	4,93
Pept, 5 SEQ ID Nº, 19	cadeia 2, aa 64-92	CMTTISSSKDCMGEAVQNTV EDLKLNTLGR	30	3246	4,78

- 10 Os cinco peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 tem pesos moleculares na faixa de 3246 a 4083 Dalton e tem calculado ponto isoelétrico a partir de 4,30 a 4,93. Todos os cinco peptídeos são solúveis em água e os peptídeos 1, 2 e 3 podem conter epítomos das células T humanas (Tabela 7).

Tabela 8. IgE de reatividade reduzida dos peptídeos sintéticos derivados de

- 15 Fel d 1 comparado aos rFel d 1

Paciente	sexo	idade	IgE total (kU/1)	Cólera de gato específico IgE (kUA/1)	rFel d 1 (O.D.)	Peptídeo 1 (O.D.)	Peptídeo 2 (O.D.)	Peptídeo 3 (O.D.)	Peptídeo 4 (O.D.)	Peptídeo 5 (O.D.)
1	f	36	>2000	48,2	2,314	0,112	-	-	-	0,056
2	m	27	798	62,2	2,255	0,069	0,123	-	-	0,140
3	m	33	153	9,48	1,394	-	-	-	-	-
4	m	25	122	13,2	1,194	1,998	0,113	0,186	-	0,073
5	f	42	267	42,1	1,793	0,074	-	-	-	0,677
6	f	35	494	37,0	2,007	-	-	-	-	0,204
7	m	27	129	31,3	2,259	-	-	-	-	0,149
8	m	36	1150	13,5	1,384	-	-	-	-	0,130
9	f	32	580	17,3	0,569	-	-	-	-	-
10	f	22	189	4,65	0,553	0,051	-	-	-	0,057
11	f	53	>2000	>100	2,838	0,504	-	-	-	0,644

12	f	75	4567	47,3	2,519	-	0,060	-	-	0,161
13	m	34	>2000	40,0	1,244	-	-	-	-	-
14	m	n.d.	n.d.	1,99	0,178	-	-	-	-	-
NHS	f	27	<2	<0,35	-	-	-	-	-	-

Exemplo 20: Peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 tem IgE de reatividade reduzida comparado aos rFel d 1 e peptídeos sintéticos derivados da atividade alergênica da falta de Fel d 1.

5 O IgE de reatividade de soro aos peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 a fim de identificar os peptídeos hipoalergênicos adequado para a vacinação foi investigado.

A diagnose da alergia de gato mediado por IgE foi baseado na anamnésia, teste da picada da pele (Allergopharma, Reinbek, Germany) e medido do IgE de soro total bem como do IgE do soro específico de cólera de gato (CAP-FEIA, Pharmacia Diagnósticos, Sweden). As pessoas não alérgicas foram incluídas para os propósitos de controle.

20.1. Capacidade de ligação de IgE medido nos ensaios por ELISA.

15 A capacidade da ligação IgE dos cinco peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 foram comparados com que o alergeno rFel d 1 completo usando o soro de 14 pacientes alérgicos a gato. As placas de ELISA (Nunc Maxisorb, Denmark) foram cobertas com peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 ou rFel d 1 como controle (0,5 µg/reservatório), lavado e bloqueado. As placas foram então incubados durante a noite a 4° C com 1:5
20 diluído de soro de pacientes alérgicos a gato e de um indivíduo não atópico. Os anticorpos IgE ligados foram detectados com um peroxidase de rábano silvestre 1:2500 diluído com anticorpo de IgE anti-humano rotulado (KPL, USA).

25 O soro a partir de 7 fêmeas e 7 machos de pacientes alérgicos a gato na idade de 22 a 75 anos foram submetidos à determinações CAP-FEIA. Medido os níveis IgE totais varia de 122 a > 4000 kU/l e níveis IgE específico de cólera de gato de 1,99 a > 100 kUA/l (Tabela 7). No ensaio ELISA a

reatividade IgE de todos os soros 14 testados ao alérgeno maior do gato Fel d 1 foi confirmado. Os resultados foram obtidos como densidades ópticas (OD) e varia de 0,178 a 2,838 OD unidades. A reatividade IgE do soro 14 a peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 foi medido no mesmo ensaio por ELISA. Foi observado que a ligação IgE foi retida por peptídeos 1, 2, 3, e 5. A ligação IgE foi observada pelo soro 6/14 ao Peptídeo 1, pelo soro 3/14 ao peptídeo 2, pelo soro 1/14 ao peptídeo 3 e pelo soro 10/14 ao peptídeo 5. As unidades OD medidas foram entre 0,051 e 1,998 pelo peptídeo 1, entre 0,060 e 0,123 para o peptídeo 2, 0,186 para peptídeo 3 e entre 0,056 e 0,677 para peptídeo 5. Em resumo, todas as unidades OD medidas foram consideravelmente inferiores do que os valores respectivos medidos para o alérgeno Fel d 1 total.

Este demonstra que os peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 tem uma IgE de reatividade reduzida comparado aos alérgenos Fel d 1 totais. Os peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 podem ser portanto considerados hipoalergênicos, fornecendo uma vantagem dos efeitos colaterais mediados por IgE reduzido, quando usado em SIT.

20.2. Indução específica da expressão dos marcadores de superfície CD203c e CD63 em basófilos humanos (Fig. 17)

Visto que a ligação IgE é um pré-requisito mas não amplo para indução do tipo 1 de reações alérgicas que também são requeridas reticuladas de IgE específico de ligação celular de efeito, a atividade alérgica atual dos peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 foi investigado em ativação de ensaios de Basófilo. Estes ensaios detectam uma sub-regulação específica alérgica de marcadores de superfície CD203c e CD63, ambos reconhecidos como marcadores pela ativação basófilo (Hauswirth et al. J Allergy Clin Immunol. (2002) 110:102-109).

As amostras de sangue heparinizadas foram retiradas de 5 pacientes alérgicos a gatos após informado ser dado permissão. As alíquotas

de sangue (100 µl) foram incubadas com diluições em série de rFel d 1, peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 como componentes simples ou como mistura equimolar, anticorpo anti-IgE ou tampão (PBS) por 15 minutos a 37° C. Após a incubação, as células foram lavadas em PBS contendo 20 mM de EDTA. As células foram então incubadas com 10 µl de CD203c conjugado por PE mAb 97A6 e 20 µl de CD63 mAb CLB-granl2 conjugado por FITC por 15 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, as amostras foram submetidas à lise eritrócito com 2 ml de solução FACS™ Lysing. As células foram então lavadas, recolocadas em suspensão em PBS, e analisadas pela citometria de fluxo de duas cores em um FACScan (Becton Dickinson, USA), usando software Paint-a-Gate. A sub-regulação induzida por alérgeno de CD203c e CD63 foi calculado dos meios de intensidade de fluorescência (MFIs) obtido com células estimulada (MFIstim) e não estimulada (MFIcontrol), e expressadas como índice de estimulação (MFIstim : MFIcontrol). Um SI de mais do que 2,0 (isto é mais do que a sub-regulação de 2 bocas) foi considerado indicativo de uma resposta (diagnóstico) específico.

Em basófilo de todos os cinco estudos da estimulação de pacientes alérgicos a gatos (RR, EB, KC, MG e SM) com rFel d 1 induzido uma sub-regulação específica de alérgeno de marcadores de superfície CD203c e CD63. A super-regulação de CD203c e CD63 foi observado a ser dependente da dose por pacientes 4/5 (RR, KC, MG e SM). Para estes pacientes CD203c os índices de estimulação varia de 1,1 (SM) a 3,2 (RR) para a concentração inferior testada de 0,001 µg rFel d 1/ml e de 3,6 (KC) a 6,2 (RR) para a concentração maior testada de 10 µg rFel d 1/ml. CD63 os índices de estimulação determinados no mesmo ensaio varia de 1,1 (RR) a 2,0 (MG) para a concentração inferior rFel d testada de 0,001 µg/ml e de 3,9 (RR) a 7,3 (MG) para a concentração maior rFel d 1 testada de 10 µg/ml. Para o paciente EB 0,001 µg/ml Fel d 1 já foram suficiente induzir uma sub-regulação de alto nível de marcadores de superfície CD203c e CD63

prevenindo uma observação da dependência da dose da sub-regulação do marcador de superfície.

Basófilo de todos os cinco pacientes alérgicos a gatos foram sondados com cinco concentrações aumentadas (0,005, 0,05, 0,5, 5 e 50 µg/ml) de uma mistura equimolar de cinco peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1. Basófilo de paciente RR foram adicionalmente sondados com cinco concentrações aumentadas de cinco peptídeos sintéticos simples derivados de Fel d 1 (0,001, 0,01, 0,1, 1 e 10 µg/ml). Os peptídeos foram observados a ser deficientes na sub-regulação dos marcadores de superfície basófilo CD203c e CD63. Os peptídeos foram incapazes de induzir qualquer expressão aumentada de CD203c e CD63 nas células de pacientes RR, KC e SM. Uma sub-regulação insignificante de CD203c (SI=2,3) e de CD63 (SI=2,5) pode ser detectado pelo paciente MG mas apenas para a concentração maior testada de 50 µg da mistura de peptídeo/ml, enquanto as concentrações inferiores aplicadas também não tem efeito na estimulação. A sub-regulação mais pronunciada de CD203c (SI=4,2) e CD63 (SI=4,3) foi observado pelo paciente EB mas, novamente, apenas para a concentração da mistura de peptídeo maior testada. Em ambos casos, o paciente MG e EB, a taxa de sub-regulação após a estimulação com peptídeos foi de consideravelmente inferior do que os valores correspondentes para estimulação com o alérgeno Fel d 1 total.

Este demonstra que os peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 fornece as vantagens de propriedade a uma atividade alergênica inferior do que o alérgeno Fel d 1 total. Este é relevante para um risco de diminuição dos efeitos colaterais mediados por IgE quando os peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 são usados em SIT.

Exemplo 21: Imunização com peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 que induz anticorpos IgG reativo com o alérgeno rFel d 1 total.

Os peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 foram mostrados

serem deficientes na ligação IgE. As moléculas candidatas para a vacinação, que ajudam na indução dos anticorpos IgG específicos de alérgeno, os peptídeos que mais retêm estruturas alérgenos específicos e ainda podem ser capazes de induzir uma resposta específica imune IgG para o alérgeno total. A
5 fim de observar se os peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 executam estes requerimentos, os experimentos da imunização em coelhos foram realizados.

Os coelhos foram imunizados com rFel d 1 não ligados e peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 ligados por KLH. Os peptídeos purificados por HPLC foram ligados ao KLH por intermédio de seus resíduos
10 de cisteína, usando um kit de conjugação de Inject Maleimide Activated Immunogen (Pierce, USA Rabbits (New Zealand White Rabbits) foram imunizados com os imunogênicos (200 µg/injeção) usando CFA (primeira imunização) e IFA (primeiro a incentivar a injeção após 4 semanas; um segundo incentivo para a injeção com adjuvante incompleto foi dado após 7
15 semanas) (Charles River Breeding Laboratories, Germany). Os coelhos foram sangrados 8 semanas após a primeira imunização e em intervalos de quatro semanas depois disso.

A indução de peptídeo e anticorpos específicos rFel d 1 foi monitorado por ensaios ELISA. As placas de ELISA (Nunc Maxisorb,
20 Denmark) foram cobertas com rFel d 1 (0,5 µg/reservatório), lavado e bloqueado. O rFel d 1 ligando a placa foi então sondado para duplicar com 1:1000 de anti-soro de coelho diluído e o soro pré-imune de coelho correspondente, e o IgG ligado foi ligado com um anti-soro de anti-coelho de cabra de peroxidase de rábano silvestre 1:2000 diluído (Jackson
25 ImmunoResearch Inc., USA). Os meios de duplicar foram calculados e mostraram erros de menos do que 5 %.

A imunização com peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 que induz Fel d 1 dos anticorpos IgG reativos. Oito semanas após a primeira imunização com cada um dos cinco peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1,

os anticorpos IgG reativo pelo alérgeno Fel d 1 total pode ser detectado em cada um dos cinco anti-soro de coelho. Os níveis do anticorpo IgG permaneceram em níveis comparáveis no sangramento subsequente (Fig. 16).

O soro de coelho do anti-peptídeo 1, anti-peptídeo 2, anti-peptídeo 4 e anti-peptídeo 5 mostraram reatividades IgG por Fel d 1 em cerca da mesma magnitude do que o anti-soro de coelho anti-Fel d 1. Também o anti-soro de coelho anti-peptídeo 3 mostra uma distinta mais uma reatividade IgG um pouco menor por Fel d 1.

Este indica que todos os cinco 5 peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 são moléculas candidatas para induzir uma resposta de anticorpo Fel d 1 IgG específico.

Exemplo 22: Peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 induz respostas linfoproliferativa enfraquecida por Fel d 1.

As moléculas candidatas desejadas para SIT melhorado não apenas oferecem as vantagens dos efeitos colaterais mediados por IgE reduzido mas também de efeitos colaterais mediados por células T reduzidas. A fim de investigar as propriedades de ativação de célula T dos peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1, os ensaios linfoproliferativos foram realizados.

Os PBMCs foram isolados de 7 pacientes alérgicos a gatos pela centrifugação gradiente de densidades Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech, UK). O PBMC (2×10^5) foi cultivado e triplicado em placas de 96 reservatórios (Nunclone, Nalgene Nunc International, Denmark) em 200 µl de meio de cultura de soro livre Ultra (Cambrex, Belgium) suplementado com 2 mM de glutamina L (Sigma, USA), 50 µM (3-mercaptopetanol (Sigma) e 0,1 mg de gentamicina por ml (Sigma) a 37° C usando 5 % de CO₂ em uma atmosfera umidificada. As células foram estimuladas com concentrações diferentes (5, 2,5, 1,25 e 0,6 µg/reservatório) de peptídeos sintéticos derivados de rFel d 1 e Fe d 1 como componentes simples ou como mistura equimolar e,

para os propósitos de controle, com 4U de Interleucina 2 ou com meio sozinho. Após 6 dias de cultura, 0,5 μ Ci por reservatório ^{3} H-timidina (Amersham Pharmacia Biotech) foi adicionado e 16 horas depois disso, incorporado a radioatividade foi medida pela contagem de cintilação líquida usando um contador de cintilação microbeta (Wallac ADL, Germany), e o meio cpm foi calculado para triplicar. O índice de estimulação (SI) foi calculado como o quociente do cpm obtido por antígeno ou estimulação de Interleucina 2 e a não estimulada do meio de controle.

A proliferação IL-2 estimulada de PBMC de todos os 7 pacientes alérgicos a gatos testados, resultando nos índices de estimulação de 9,8 por RR, 5,2 por EB, 3,2 por KC, 6,7 por MG, 6,3 por SM, 15,7 por RA e de 13,9 por AR.

Os peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 induzido menores índices de estimulação (Tabela 9).

Tabela 9: Peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 que em uma base equimolar induz um pouco as respostas linfoproliferativas do que Fel d 1 podem ser identificados. Os PBMCs de 7 pacientes alérgicos a gatos foram estimulados com diluições em série de rFel d 1 ou peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 como componentes simples. As respostas linfoproliferativas específicas são mostrados como nos índices de estimulação.

		5 μ g/w	2.5 μ g/w	1.25 μ g/w	0.6 μ g/w
Paciente RR	rFel d 1	2,6	1,8	1,5	1,9
	Peptídeo 1	1,9	0,6	1,3	1,5
	Peptídeo 2	2,1	1,3	2,0	1,6
	Peptídeo 3	3,5	2,8	2,0	3,0
	Peptídeo 4	2,5	2,4	1,5	0,8
	Peptídeo 5	1,7	0,9	2,3	0,7
Paciente EB	rFel d 1	8,2	2,9	1,6	1,5
	Peptídeo 1	1,3	0,9	1,0	1,2
	Peptídeo 2	2,4	1,7	1,8	1,6
	Peptídeo 3	1,1	1,2	1,4	1,7
	Peptídeo 4	3,6	3,6	3,2	2,3
	Peptídeo 5	2,2	2,1	1,4	2,1
Paciente KC	rFel d 1	0,8	1,2	1,3	5,2
	Peptídeo 1	0,7	1,0	1,1	1,1

Paciente MG	Peptídeo 2	1,2	1,5	1,0	1,1
	Peptídeo 3	0,6	0,5	0,5	0,6
	Peptídeo 4	1,6	1,4	1,3	1,1
	Peptídeo 5	1,3	1,4	0,9	1,4
	rFel d 1	2,9	2,3	2,3	2,2
Paciente SM	Peptídeo 1	1,8	1,4	1,4	1,1
	Peptídeo 2	1,2	1,3	1,4	0,9
	Peptídeo 3	1,1	0,5	0,6	0,7
	Peptídeo 4	1,1	1,5	1,8	1,0
	Peptídeo 5	1,5	1,2	1,6	0,8
Paciente RA	rFel d 1	2,3	1,6	1,8	1,1
	Peptídeo 1	1,1	1,0	0,8	1,0
	Peptídeo 2	1,8	1,1	1,3	1,2
	Peptídeo 3	2,6	2,1	2,1	1,5
	Peptídeo 4	1,9	1,6	1,7	1,1
Paciente AR	Peptídeo 5	2,3	1,3	1,4	1,0
	rFel d 1	3,2	1,2	2,4	1,2
	Peptídeo 1	0,8	0,7	1,3	1,1
	Peptídeo 2	1,2	0,5	1,7	1,6
	Peptídeo 3	2,0	2,3	1,6	0,9
Paciente AR	Peptídeo 4	3,0	1,3	1,1	0,6
	Peptídeo 5	0,4	0,6	0,9	0,9
	rFel d 1	1,4	0,6	0,9	1,0
	Peptídeo 1	1,0	0,5	1,7	0,7
	Peptídeo 2	0,7	0,6	0,9	0,6
Paciente AR	Peptídeo 3	1,6	1,6	2,1	1,0
	Peptídeo 4	1,0	0,7	0,7	0,6
	Peptídeo 5	0,8	0,5	0,3	0,5

Exemplo 23: Anticorpos IgG induzidos pela imunização com peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 inibem a ligação de pacientes alérgicos a gatos IgE ao alérgeno Fel d 1 total.

A capacidade do coelho Ig induzido por peptídeo para induzir a ligação dos anticorpos IgE de pacientes alérgicos para completar rFel d 1 foi examinado no ensaio de competição ELISA. As placas de ELISA (Nunc Maxisorb, Denmark) foram cobertas com rFel d 1 (0,05 µg/reservatório), lavado e bloqueado. O rFel d 1 ligado por placa foi então pré-incubado com 1:100 diluído de anti-soro de peptídeo anti-coelho (anti-soro de anti-peptídeo simples bem como uma mistura de anti-soro de anti-peptídeo que foi usado), o anti-soro anti-rFel d 1 de coelho, e para os propósitos de controle também com o soro de coelho pré-imune respectivo. Após as placas serem lavadas, estas foram incubadas com 1:5 diluído de soro humano de pacientes alérgicos

a gatos. Os anticorpos IgE ligados foram detectados com a 1:2500 diluído de anticorpo IgE anti-humano rotulado de peroxidase de rábano silvestre (KPL, USA). A inibição da porcentagem da ligação IgE atingida pela pré-incubação com o anti-soro de anti-peptídeo foi calculado como seguintes: % de inibição de ligação IgE = $100 - \text{O.D.}_i / \text{O.D.}_p \times 100$, com O.D.z tendo a densidade óptica medida após a pré-incubação com o soro imune de coelho e O.D.p com soro pré-imune de coelho.

A pré-incubação da placa de ELISA ligada a Fel d 1 com o anti-soro anti-peptídeo 5 de coelho resultando nas origens da inibição que varia entre 14 soro de pacientes alérgicos a gatos testados diferentes. O anti-soro anti-peptídeo 1 de coelho de ligação IgE de pacientes bloqueados por Fel d 1 pelo soro de pacientes 13/14 testados, anti-soro anti-peptídeo 2 de coelho por 8/14, anti-soro anti-peptídeo 3 por 13/14, anti-soro anti-peptídeo 4 de coelho por 9/14 e anti-soro anti-peptídeo 5 de coelho por 5/14.

Também a faixa da inibição mostrou variações entre os anti-soros diferentes. Entre o anti-soro anti-peptídeo de coelho simples testado, o anti-soro anti-peptídeo 1 de coelho mostrou mais taxas de inibição com inibições de 0 a 55 % (média de 29 %). Com as taxas de inibição de anti-soro anti-peptídeo 2 de coelho de 0 a 18 % (média de 5 %) será atingido, com anti-soro anti-peptídeo 3 de coelho de 0 a 29 % (média de 11 %), com anti-soro anti-peptídeo 4 de coelho de 0 a 24 % (média de 8 %) e com anti-soro anti-peptídeo 5 de coelho de 0 a 18 % (média de 4 %).

Uma mistura de toda a ligação IgE de pacientes que inibiram o anti-soro anti-peptídeo 5 de coelho por Fel d 1 mais eficientemente com inibições atingidas por soro de todos os pacientes e taxas de inibição de 25 a 84 % (média de 59 %). Estas inibições ainda foram mais pronunciadas do que atingidas pela pré-incubação com o anti-soro anti-Fel d 1 de coelho (Tabela 10).

Tabela 10: Anti-soro de coelho elevado contra peptídeos sintéticos derivados

de Fel d 1 inibindo a ligação de IgE humano por Fel d 1. Uma inibição da porcentagem de ligação IgE por Fel d 1 atingido pela pré-incubação de Fel d 1 com anti-soro de coelho são mostrados por 14 pacientes e como significam. As pré-incubações foram realizadas com anti-soro 5 de coelho elevado contra os 5 peptídeos sintéticos derivados de Fel d 1 (anti-peptídeo 1 a 5), uma mistura de 5 anti-soro de anti-peptídeo (Mistura) em um anti-soro elevado contra Fel d 1 (anti-rFel d 1).

Paciente	Anti-peptídeo 1	Anti-peptídeo 2	Anti-peptídeo 3	Anti-peptídeo 4	Anti-peptídeo 5	Mistura de Anti-soro de anti-peptídeo 5	anti-rFel d 1
1	48	18	29	20	18	78	64
2	24	0	8	0	0	67	43
3	55	11	5	17	8	84	74
4	38	7	11	24	8	66	49
5	10	5	5	12	0	54	48
6	33	0	12	5	0	68	46
7	6	1	10	5	0	58	45
8	44	3	17	10	0	60	53
9	26	17	12	15	16	53	43
10	0	0	10	0	0	31	26
11	38	0	0	0	0	52	56
12	47	0	22	0	7	75	51
13	27	2	8	0	0	56	41
14	16	0	6	5	0	25	25
Significa	29	5	11	8	4	59	47

Quando o anti-soro anti-peptídeo 1 de coelho foi combinado com cada um dos outros anti-soros de anti-peptídeos, a inibição da ligação de pacientes alérgicos IgE foi substancialmente aumentada atingindo entre os valores (por exemplo anti-peptídeo 1 + 4:41 %, anti-peptídeo 1 + 5:42 %) obtido com anticorpos anti-rFel d 1 (67 %) (Tabela 11).

Tabela 11:

Paciente	anti-peptídeo 1 + anti-peptídeo 2	anti-peptídeo 1 + anti-peptídeo 3	anti-peptídeo 1 + anti-peptídeo 4	anti-peptídeo 1 + anti-peptídeo 5	anti-rFel d 1
1	61	49	61	63	75
2	24	17	28	28	74
3	60	52	62	57	86
4	43	33	43	40	68
5	17	9	27	30	67
6	37	24	42	46	73
7	26	21	36	34	74
8	51	46	53	55	72
9	40	28	46	43	61

10	16	11	30	34	40
11	45	35	47	45	78
12	52	40	56	59	76
13	29	17	29	32	62
14	7	10	14	16	28
significa	36	28	41	42	67

Exemplo 24: Peptídeos derivados de Bet v 1 que induz respostas IgG específicas de Bet v 1 recebendo ajuda de célula T a partir dos epítopos das células T derivado de carreadores e reduz a proliferação de célula T específica por Bet v 1.

5 O derivado de Bet v 1, os peptídeos celulares B expostos a superfície já tem sido mostrados por induzir uma resposta Bet v 1 protetora e IgG específico em um modelo de camundongo de vacinação terapêutica e profilática (Focke M et al. Clin Exp Allergy (2004) 34:1525-1533). Em Focke M et al. (2004), 6 peptídeos derivados de Bet v 1 foram ligados à molécula de

10 carreador KLH antes de uma imunização de camundongos. No presente exemplo é mostrado que a resposta Bet v 1 IgG específica induzida com estes peptídeos (Tabela 1) é conduzida pela ajuda dos epítopos das células T derivados do carreador mas não de alérgeno Bet v 1. Foi surpreendentemente observado que nenhum dos peptídeos derivados de Bet v 1 tem as seqüências

15 LFPKVAPQAISVENIEGNGGPGTIKKISF (SEQ ID N°. 20), GPGTIKKISFPEGFPFKYVKDRVDEV DHTN (SEQ ID N°. 21) e VDHTNFKYNYSVIEGGPIGDTLEKISNEIK (SEQ ID N°. 22) induzindo as respostas de células T relevantes, e pode ser demonstrado que a maioria das respostas das células T foi direta contra a molécula do carreador, KLH

20 (Figuras. 18 e 19). Esta descoberta é mais importante para a redução dos efeitos colaterais durante a vacinação terapêutica e para a redução do risco de uma sensibilização potencial durante a vacinação profilática. Tem sido demonstrado no passado que os peptídeos derivados de alérgenos necessitam de qualquer reatividade IgE mas contendo epítopos das células T derivados de

25 alérgenos induzindo efeitos colaterais devido a ativação da célula T. Os peptídeos derivados de alérgeno necessitam de IgE e reatividade da célula T

como exemplificado pelo peptídeos Bet v 1, não induz IgE ou efeitos colaterais mediados por células T durante a vacinação terapêutica. Quando usado para a vacinação profilática, os peptídeos induzirão uma resposta IgG protetora específica de Bet v 1 sem imprimação das células T específicas por Bet v 1. Este deve minimizar o risco de pré-imprimação na resposta imune alérgica através da vacina que deve abrir caminho para uma sensibilização alérgica subsequente.

Neste exemplo os alergenos e as respostas de células T específicas por carreadores em um modelo de camundongo de vacinação de alergeno terapêutica e profilática foram dessecadas. Os peptídeos derivados de Bet v 1 2,3, e 6 (Focke M et al. (2004)) foram escolhidos e testados em se quer este que contém qualquer dos epítomos das células T específicos de Bet v 1 conhecidos em camundongos BALB/c. Os camundongos foram imunizados como seguintes (Tabela 10 mostra um protocolo de sensibilização e tratamento): Os grupos de camundongos BALB/c (n=5) foram imunizados com 10 µg de Bet v 1 recombinante (Biomay, Austria) e/ou uma mistura de peptídeos sintéticos derivados de Bet v 1 2, 3, e 6 (10 µg de cada). Os peptídeos foram ligados ao KLH como previamente descrito (Focke M et al. (2004)). Para a imunização, Bet v 1 e a mistura dos peptídeos foram absorvidas por hidróxido de alumínio (Alu-Gel-S, Serva, Germany) em um volume total de 150 µl/camundongo.

Tabela 12: Protocolo de sensibilização e tratamento.

Grupos (n=5)	Sensibilização (rBet v 1)	Terapia (peptídeos KLH)
Nenhuma sensibilização / nenhuma terapia (S-/T-)	_____	_____
Sensibilização / Nenhuma Terapia (S+/T-)	Dias 0, 20, 40	_____
Nenhuma sensibilização / Terapia (S-/T+)	_____	Dias 60, 80, 100
Sensibilização / Terapia (S+/T+)	Dias 0, 20, 40	Dias 60, 80, 100
	Profilaxia (peptídeos KLH)	Sensibilização (rBet v 1)
Nenhuma profilaxia / sensibilização (P-/S+)	_____	Dias 60, 80, 100
Profilaxia / Nenhuma sensibilização (P+/S-)	Dias 0, 20, 40	_____
Profilaxia / sensibilização (P+/S+)	Dias 0, 20, 40	Dias 60, 80, 100

O alergeno, peptídeo, e linfoproliferação específica do carreador foi analisado em um ensaio de proliferação de célula T. Os baços foram removidos sob condições estéreis e homogeneizadas. Após a lise de eritrócitos, as células foram lavadas e recolocadas em suspensão em meio completo (RPMI, 10% de soro de bezerro fetal, 0,1 mg/ml de gentamicina, 2 mM de glutamina). As suspensões celulares simples foram recolocadas em placas fundas redondo de 96 reservatórios em uma concentração de 2×10^5 células/reservatório e estimulada com concavalina A (0,5 µg/reservatório) como um controle positivo, rBet v 1 (2 µg/reservatório), KLH (2 µg/reservatório), a mistura de peptídeo (0,34 µg de cada peptídeo/reservatório) ou o meio sozinho por 4 dias. As culturas foram pulsadas com 0,5 µCi/reservatório timidina tritiada por 16 horas e coletada. As resposta da proliferação foram medidos pela contagem de cintilação. A razão do meio de proliferação após a estimulação de antígeno e valores de meio de controle, isto é o índice de estimulação (SI), foi calculado.

Interessantemente, será mostrado que a vacinação terapêutica com peptídeos derivados de Bet v 1 devem reduzir a proliferação específica de Bet v 1 em camundongos sensibilizados por Bet v 1 (grupo S+/T+) comparado aos sensibilizados mas grupos não tratados S+/T-. No grupo tratado e sensibilizado nenhuma proliferação específica de peptídeo será medido, mais de acordo com o efeito do carreador, uma proliferação específica KLH foi observada. A vacina de peptídeo sozinho (grupo S-/T+) induzido principalmente por células T específicas por KLH, mas não perto da resposta da célula T específica por Bet v 1 (Figura 18).

A vacinação profilática com os peptídeos induzidos quase nenhuma proliferação específica por Bet v 1 (grupo P+/S-) comparado aos grupos Bet v 1 sensibilizados P-/S+ mas proliferação específica por KLH. Em camundongos profilaticamente vacinados e subsequentemente sensibilizados (grupo P+/S+) a proliferação específica Bet v 1 foi notavelmente reduzida,

além disso, nenhuma resposta específica por peptídeo será observada em qualquer grupo de camundongo (Figura 19).

Deste modo, será mostrado em um modelo de camundongo alérgico que a vacinação profilática com peptídeos de célula B alérgico ligado por carreador não inicia as células T específicas por peptídeo, quase nenhum alérgico específico mas células T específicas de carreadores. A vacinação profilática precede a sensibilização alérgica mas também a vacinação terapêutica de camundongos sensibilizados que reduz a proliferação de célula T específica por alérgico.

O tratamento profilático com peptídeos derivados de Bet v 1 induzido pela resposta Bet v 1 IgG específicas sem a ajuda das células T específicas de Bet v 1. Além disso, o tratamento profilático aumenta a resposta Bet v 1 IgG específica induzida pelo alérgico Bet v 1 já 20 e 40 dias após a primeira sensibilização (Figura 20).

Estes resultados demonstram que a vacina de peptídeo que induz uma resposta Bet v 1 IgG específica pode ser auxiliada pela exposição do alérgico.

Exemplo 25: Peptídeos derivados de Der p 2 mostram a redução a capacidade de ligação de IgE.

A capacidade de ligação de IgE de peptídeos derivados de Der p 2 foi determinado como descrito no exemplos 15.1 e 20.1 utilizando os peptídeos de acordo com a Tabela 13 e usando o soro de indivíduos que sofre de alergia ao ácaro do pó doméstico.

Tabela 13: Peptídeos derivados por Der p 2

Peptídeo	Posição	Seqüência	SEQ ID N°
Pep. 1 Der p 2	1 a 33	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEP CIIHRGK	96
Pep. 2 Der p 2	21 a 51	CHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNSK TAK	97
Pep. 3 Der p 2	42 a 73	EANQNSKTAKIEIKASIEGLEVDVPGID PNAC	98

Pep. 4 Der p 2	62 a 103	EVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYD IKYTWIVP- KIAPKSEN	99
Pep. 5 Der p 2	98 a 129	APKSENVVVTVKVMGDNGVLACAIAT HAKIRD	100

Os resultados claramente mostram que os peptídeos derivados de Der p 2 da presente invenção exibem significativamente redução da capacidade de ligação IgE.

Tabela 14: Resultados

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

Exemplo 26: Variações no comprimento de peptídeos não tendo efeito na capacidade de ligação de peptídeos IgE, a reatividade da célula T e imunogenicidade.

26.1. Projeto dos peptídeos

Para estudar os efeitos da variação no comprimento do peptídeo, na capacidade de ligação de IgE, na reatividade da célula T e variantes de imunogenicidade dos peptídeos derivados de Phl p 5 foram projetados pelo aumento do comprimento do peptídeo 1 (P1) e diminuição do comprimento do peptídeo 2 (P2) por um pouco de aminoácido (Tabela 15).

Tabela 15: Posição, seqüência, comprimento de diversos aminoácidos e peso molecular dos peptídeos sintéticos derivados de Phl p 5 (1, 2) e variantes destes (1a, 2b).

Tabela 15: Variantes de peptídeos sintéticos derivados de PHL p 5.

	Posição aa	Seqüência	Número de aa	Peso Molecular (MW)
Peptídeo 1	98 a 128	CGAASNKAFAEGLSGEPKGAAESSKAAL TSK	32	3026
1a	93 a 128	CFVATFGAASNKAFAEGLSGEPKGAAESS KAALTSK	37	3592
Peptídeo 2	26 a 58	ADLGYGPATPAAPAAGYfPATPAAPAEAAP AGKC	34	3068
2b	26 a 53	AD LGYGPATPAAPAAGYTPATPAAPAEAC	29	2644

26.2. Falta da reatividade IgE

Para analisar a reatividade IgE de peptídeos derivados de Phl p

5 1, 2 e suas variantes 1a, 2b ensaios *dot-blot* foram realizados aplicando 0,2 µg de peptídeo/e não usando soro de 7 pacientes alérgicos a pólen de capim (p1 a p7) e o soro de um indivíduo não atópico (NHS). A ligação IgE foi ligada com IgE anti-humano rotulado por ¹²⁵I (Phadia, Uppsala, Sweden). O rPhl p 5 foi usado como controle positivo e HSA como controle negativo. Os pacientes reagem com rPhl p 5 mas não com os peptídeos e variantes de peptídeos (Fig. 21).

26.3. Respostas linfoproliferativas

Os PBMCs de 2 pacientes alérgicos à pólen de capim foram estimulados com concentrações diferentes de peptídeos derivados de Phl p 5 1, 2, e suas variantes 1a, 2b e para os propósitos de controle com rPhl p 5. Os índices de estimulação obtido com os peptídeos foram significativamente inferiores do que aqueles obtidos com rPhl p 5 (Fig. 22).

26.4. Imunogenicidade de variantes de peptídeos

Os coelhos foram imunizados com peptídeos ligados por KLH derivados de Phl p 5 e variantes. Os experimentos por ELISA foram usados para medir a reatividade IgG do anti-soro de coelho obtido aos polipeptídeos e suas variantes (Tabela 16). A imunização com peptídeos e suas variantes induz os anticorpos reativos cruzados IgG que reconhecem o peptídeo e a variante correspondente.

Tabela 16: A reatividade cruzada do anti-soro de peptídeo anti-Phl p 5 elevado nos coelhos pela imunização com peptídeos conjugados por KLH. As reatividades IgG de anti-soro de peptídeo aos polipeptídeos (1, 2) e variantes (1a, 2b) são exibidos. Nenhuma reatividade foi observada com soro pré-imune (pré P1, pré P1a, pré P2, pré P2b)

a. O anti-soro anti peptídeo 1 (anti P1) reage cruzado com a variante de peptídeo 1 (1a) e anti-soro anti-peptídeo 1a (anti P1a) reage cruzado com peptídeo 1.

b. O anti-soro anti-peptídeo 2 (anti P2) reage cruzado com a

variante de peptídeo 2 (2b) e o anti-soro anti-peptídeo 2b (anti P2b) reage cruzado com peptídeo 2.

Tabela 16: A reatividade cruzada de anti-soro de coelho

a)

	pré P1	anti P1	pré P1a	anti P1a
P1	0,041	0,880	0,052	0,947
P1 a	0,038	0,705	0,048	0,859

b)

	pré P2	anti P2	pré P2b	anti P2b
P2	0,089	1,168	0,042	1,175
P2 a	0,075	0,954	0,053	1,122

26.5. A ligação IgE de pacientes alérgicos à pólen de capim inibem o anti-soro de coelho induzido por peptídeo por rPhl p 5

A capacidade do anti-peptídeo 2 de coelho e 2b IgGs para inibir a ligação IgE humana por rPhl p 5 foi estudada por competição por ELISAs. A placa de ELISA liga ao rPhl p 5 e foi pré-incubada com anti P2, anti P2b e, para os propósitos de controle, com o anti-soro anti Phl p 5. As placas foram então expostas ao soro de 12 pacientes alérgicos à pólen de capim. A porcentagem da inibição de ligação IgE por rPhl p 5 é exibido na Tabela 17. O anti-soro anti-peptídeo 2 e anti-peptídeo 2b inibe a ligação IgE em pacientes por rPhl p 5 à mesma extensão.

As competições por ELISAs também foram realizadas com anti-peptídeo 1 de coelho e anti-soro 1a. No exemplo 17 (Imunização com os peptídeos derivados de Phl p 5 que induz os anticorpos IgG que inibem a ligação do pacientes alérgicos à pólen de capim IgE por Phl p 5) os anticorpos de anti- peptídeo 1 (P1) de pacientes que inibem a ligação IgE por Phl p 5 como uma taxa de meio de inibição de 28,5 %. Os resultados similares foram obtidos com anti-soro anti-peptídeo 1a que dão uma taxa de inibição de 23,7 %.

Tabela 17: Inibição da ligação de pacientes IgE por rPhl p 5 pelo anti-soro anti-peptídeo. O anti-soro anti-peptídeo 2 e anti-peptídeo 2b inibe a ligação IgE dos pacientes por rPhl p 5 à mesma extensão. A placa de ELISA liga-se ao rPhl p 5 e será pré-incubada com anti P2, anti P2b e, para os propósitos de controle, com anti-soro anti-Phl p 5. As placas foram então expostas ao soro de 12 pacientes alérgicos à pólen de capim. A porcentagem da inibição de ligação IgE por rPhl p 5 é exibida.

Tabela 17: % da inibição da ligação IgE

paciente	anti P2	anti P2b	anti Phi p 5
1	33,38	24,40	84,77
2	52,20	57,40	87,00
3	52,70	54,85	90,81
4	51,44	59,76	78,26
5	43,19	49,15	77,93
6	47,04	52,02	83,68
7	62,67	58,00	76,62
8	52,36	50,27	74,44
9	57,63	50,91	88,13
10	35,10	37,99	75,03
11	44,44	41,24	68,39
12	47,56	45,41	77,34

Exemplo 27: Proteção cruzada de anticorpos anti-VP1

O rinovírus humano compreende em cem cepas diferentes. Neste teste de neutralização é mostrado que a infecção de rinovírus de uma cepa pode também ser exibida pelos anticorpos específicos VP1 de uma outra cepa. As células HeLa foram semeadas nos reservatórios em densidade igual. O 100TCD₅₀ HRV14 foi pré-incubado com diluições de anticorpos anti-14VP1 e anti-89VP1 (não diluídos; 1:2 a 1:32 reservatórios 1 a 6) e adicionados aos reservatórios na linha A e D, respectivamente. Nas linhas B e C 100TCD₅₀ HRV 89 pré-incubadas com diluições de anticorpos anti-14VP1 e anti-89VP1, respectivamente, foram adicionados à células. Após 3 dias vivas as células foram tingidas com violeta. Os anticorpos anti-89VP1 e anti-14VP1 bloqueiam a infecção de HRV14 em uma maneira comparável. Os anticorpos elevados contra 14VP1 e 89VP1 também inibem a infecção de HRV89 até a mesma concentração.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110>	Biomay AG	
<120>	Carreador de vacina	
<130>	R 49994	
<150>	AT A 994/2006	
<151>	2006-06-09	
<160>	142	
<170>	PatentIn version 3.4	
<210>	1	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Iniciador	
<400>	1	
	cggaattcat taatatgaac ccagttgaaa attatataga tagtgtatta	50
<210>	2	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Iniciador	
<400>	2	
	cgattaattc agtggtggtg gtggtggtg acgtttgtaa cggtaa	46
<210>	3	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Iniciador	
<400>	3	
	ctttaagaag gagatatact taagatgaac ccagttg	37
<210>	4	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Iniciador	
<400>	4	
	caactgggtt catcttaagt atatctcctt cttaaag	37

<210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 5
 cctgatgttt ttaccggtac aaacgtccac cac 33

<210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 6
 gtggtggacg tttgtaccgg taaaaacatc agg 33

<210> 7
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 7
 cgcgcttaag atggtccgct acaccaccga gggc 34

<210> 8
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador

<400> 8
 cgcgcttaag cttggactcg taggcggtgt cggc 34

<210> 9
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Lys Cys

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Phl p 5
 <400> 11

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Phl p 5
 <400> 12

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

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

<210> 13

<211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 13

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

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

Cys

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

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

<400> 14

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

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

Ala Pro Ala Asn Asp Lys
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 1
 <400> 15

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

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

Val Val Cys
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 1

<400> 16

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

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

Ser Pro Leu Cys
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 1

<400> 17

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

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

Asn Ala Cys
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 1

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Bet v 1
 <400> 22

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

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

<210> 23

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Alt a 1

<400> 23

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

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

Glu Gly Thr Tyr Tyr Asn Ser Leu
 35 40

<210> 24

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Alt a 1

<400> 24

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

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

Glu Asn Ser Phe Met
 35

<210> 25

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Alt a 1

<400> 25

8

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Alt a 1

<400> 26

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

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

Leu Pro Lys Ser Ser
 35

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

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

<400> 27

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

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

Arg Leu His Trp Asp Trp Ala Gln
 35 40

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

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

<400> 28

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

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

Lys Gly Arg Asn Gly Phe Lys Arg
 35 40

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

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

<400> 29

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

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

Asn Thr Asp Leu Glu Tyr Ala Ala
 35 40

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

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

<400> 30

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

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

Glu Pro Glu Leu Thr Val Tyr Thr
 35 40

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

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

<400> 31

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

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

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

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

<400> 32

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

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

Ala Ile

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

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

<400> 33

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

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

Trp Gly Gly Lys Gly Val Thr Lys
 35 40

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

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

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser His Ala Gly Gly Arg Leu Ala
 35 40

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

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

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

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

Gly Asn Val Gly Asp Glu Gly Gly
 35 40

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

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

<400> 37

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

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

Lys Trp Leu Thr Tyr Glu Gln Leu
35 40

<210> 38

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Alt a 6

<400> 38

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

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

Val Thr Asn Pro Glu Phe Ile Lys
35 40

<210> 39

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Alt a 6

<400> 39

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

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

Arg Ser Gly Gln Ile Lys Thr Gly
35 40

<210> 40

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgica derivada de Alt a 6

<400> 40

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

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

Arg Thr Ala Val Asn Leu
35

<210> 41

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Molécula hiperalérgica derivada de Amb a 1

<400> 41

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

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

Asn Arg Lys Ala Leu Ala Asp Cys
35 40

<210> 42

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Molécula hiperalergênica derivada de Amb a 1

<400> 42

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

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

Asn Arg Pro Leu Trp Ile Ile Phe Glu
35 40

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

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

<400> 43

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Gly Asp Ala Ile Ser Ile Ser
 35 40

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

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

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

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

Met Leu Ala Thr Val Ala Phe
 35

<210> 46
 <211> 37
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Amb a 1

<400> 46

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

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

Ala	Ile	Gly	Gly	Ser
				35

<210> 47

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Amb a 1

<400> 47

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

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

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

<210> 48

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Amb a 1

<400> 48

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

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

Leu	Ser	Cys	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro	Cys
			35				40	

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Art v 1

<400> 49

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

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Art v 1

<400> 50

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Art v 1

<400> 51

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

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

Gly Ser Pro Pro Pro Pro Ser Thr His
 35 40

<210> 52

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Can f 1

<400> 52

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

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

Asp Ser Val Thr Pro Met
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Can f 1

<400> 53

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

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

Val Val Leu His Lys Thr Ser Glu
 35 40

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Can f 1

<400> 54

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

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

Val Arg Asp His Tyr Ile Leu Tyr Cys
 35 40

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Can f 1

<400> 55

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

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

Glu Gln Ser Gln Glu Ala Leu Glu
 35 40

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Can f 1

<400> 56

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

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

Glu Thr Cys Ser Pro Gly Gly Gln
 35 40

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

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

<400> 57

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

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

Lys Pro Trp Gly His Phe Arg Val
35 40

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

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

<400> 58

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

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

Lys Val Ser Leu Thr Ala Phe Lys
35 40

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

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

<400> 59

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

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

Asp Pro Lys Ser Tyr Leu
35

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

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

<400> 60

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

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

Met Val Arg Asp Leu Ser Arg
 35

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

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

<400> 61

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

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

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

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

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

<400> 62

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

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

Gln Cys

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

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

<400> 63

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

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

Asp Asp Asn
 35

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 2
 <400> 65

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 2
 <400> 66

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 2
 <400> 67

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 2
 <400> 68

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

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

<210> 69
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 2
 <400> 69

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

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

<210> 70
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

<400> 70

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

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

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

<210> 71

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Fel d 2

<400> 71

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

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

Arg Phe Leu Gly Lys Tyr Leu Tyr Glu
35 40

<210> 72

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Fel d 2

<400> 72

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

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

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

<210> 73

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 2

<400> 73

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

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

Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp
					35

<210> 74

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 2

<400> 74

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

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

Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys
					35

<210> 75

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgénica derivada de Fel d 2

<400> 75

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

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

Glu	Asp	Lys	Glu	Val	Cys
					35

<210> 76

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

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

<400> 76

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

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

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

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

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

<400> 77

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

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

Ser Glu Arg Val Thr Lys Cys
 35

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

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

<400> 78

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

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

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

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

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

<400> 79

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

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

Phe Ile Pro Gly Ala Ser Leu Arg
 35 40

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

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

<400> 80

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

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

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

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

<400> 81

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

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

Thr Glu Gly Trp Ala
 35

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

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

<400> 82

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

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

Asn Pro Leu
 35

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

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

<400> 83

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

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

Gly Met Tyr Pro Pro Asn Met
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Par j 2

<400> 84

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Par j 2

<400> 85

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

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

Lys Arg Glu Ala
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Par j 2

<400> 86

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

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

Ser Gly Ile Lys Asn
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Par j 2

<400> 87

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

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

Phe Arg Gly Tyr Tyr
35

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

<220>
<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 1

<400> 88

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

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

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

<220>
<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 1

<400> 89

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

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

Gln

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

<220>
<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 1

<400> 90

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 1

<400> 91

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

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

Leu	Ala	Gln	Thr	His
				35

<210> 92
 <211> 31
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 1

<400> 92

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 1

<400> 93

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

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

Ile

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Der p 1

<400> 94

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

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

Asn Ile

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Der p 1

<400> 95

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

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

Val Ile Leu
 35

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

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

<400> 96

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

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

Lys

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

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

<400> 97

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

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

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

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

<400> 98

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

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

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

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

<400> 99

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

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

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

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

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

<400> 100

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

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

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

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

<400> 101

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

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

Tyr Leu Gln
 35

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

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

<400> 102

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

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

Met Asp Thr Ile
 35

<210> 103

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ile Glu Val
 35

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 7

<400> 106

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

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

<210> 107

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 7

<400> 107

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

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

<210> 108

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 7

<400> 108

Val His Asp Asp Val Val Ser Met Glu Tyr Asp Leu Ala Tyr Lys Leu
1 5 10 15

Gly Asp Leu His Pro Asn Thr His Val Ile Ser Asp Ile Gln Asp Phe
20 25 30

Val Val Glu Leu
35

<210> 109

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 7

<400> 109

Leu Ser Leu Glu Val Ser Glu Glu Gly Asn Met Thr Leu Thr Ser Phe
1 5 10 15

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

 $\langle 210 \rangle$ 110

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Molécula hiperalergênica derivada de Der p 7

 $\langle 400 \rangle$ 110

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

Met Thr Lys Val Leu Ala Pro Ala Phe Lys Lys Glu Leu Glu Arg Asn
20 25 30

Asn Gln

<210> 111

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 10

 $\langle 400 \rangle$ 111

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

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

Asn Leu Arg
35

<210> 112

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 10

<400> 112

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

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

Asn Thr Lys
 35

<210> 113
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Der p 10

<400> 113

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

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

Glu Glu Arg Leu Lys Ile Ala Thr
 35 40

<210> 114
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Der p 10

<400> 114

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

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

Gly Leu Glu
 35

<210> 115
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalérgénica derivada de Der p 10

<400> 115

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

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

<210> 116

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 10

<400> 116

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

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

<210> 117

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 10

<400> 117

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

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

Ala Glu Arg Ser Val Gln Lys Leu Gln
 35 40

<210> 118

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 10

<400> 118

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

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

Thr Gly Tyr
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 21

<400> 119

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

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

Lys Gly Leu
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 21

<400> 120

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

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

Met Lys Gly Ala Leu
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 21

<400> 121

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

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

<210> 122

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Der p 21

<400> 122

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

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

Tyr

<210> 123

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Clone 30

<400> 123

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

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

<210> 124

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Clone 30

<400> 124

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

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

Ser Asn

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Clone 30

<400> 125

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

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

Glu Asp Glu Glu Thr Cys Thr
 35

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Bet v 1

<400> 126

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Bet v 1

<400> 127

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Fel d 1 de cadeia 1
 <400> 129

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

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

Val Val Cys
 35

<210> 130
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Fel d 1 de cadeia 1
 <400> 130

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

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

Ser Pro Leu Cys
 35

<210> 131
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Fel d 1 de cadeia 2
 <400> 131

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

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

Asn Ala Cys
 35

<210> 132
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Fel d 1 de cadeia 2
 <400> 132

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

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

<210> 133
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Molécula hiperalérgênica derivada de Fel d 1 de cadeia 2
 <400> 133

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

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

<210> 134
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Phl p 5

<400> 134

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

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

<210> 135

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Phl p 5

<400> 135

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

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

Lys Cys

<210> 136

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Phl p 5

<400> 136

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

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

<210> 137

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Phl p 5

<400> 137

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

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

<210> 138

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Phl p 5

<400> 138

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

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

Cys

<210> 139

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Molécula hiperalérgênica derivada de Phl p 5

<400> 139

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

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

Ala Pro Ala Asn Asp Lys
 35

<210> 140

<211> 70

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Alérgeno de Dermatophagoides pteronyssinus de clone 30

<400> 140

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

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

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

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

Asp Glu Glu Thr Cys Thr
65 70

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

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

<400> 141

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

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

Ala Leu Thr Ser Lys
35

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

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

<400> 142

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

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

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína hipoalergênica, caracterizada pelo fato de que consiste de pelo menos uma molécula hipoalergênica derivada de um alérgeno, que é fundido ou conjugado a pelo menos uma segunda proteína não alérgica ou fragmento desta.

2. Proteína hipoalergênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos uma molécula hipoalergênica é fundida ao terminal N e/ou terminal C da dita pelo menos uma segunda proteína ou fragmento desta.

3. Proteína hipoalergênica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que pelo menos uma segunda proteína é uma proteína viral, em particular RNA ou DNA viral, bacteriana, fúngica ou de protozoário.

4. Proteína hipoalergênica de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a proteína viral é uma proteína de capsídeo.

5. Proteína hipoalergênica de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizada pelo fato de que pelo menos uma proteína viral é derivada de um vírus patogênico humano, preferivelmente um vírus da família de picornaviridae.

6. Proteína hipoalergênica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o vírus da família de picornaviridae é do gênero de rinovírus, preferivelmente das espécies de rinovírus humanos, em particular rinovírus humano de 89 ou 14.

7. Proteína hipoalergênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizada pelo fato de que o alérgeno é selecionado do grupo selecionado do grupo que consiste de alérgenos de pólen de bétula principal, em particular Bet v 1 e Bet v 4, alérgenos de pólen de capim-rabo-de-rato principal, em particular Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6 e Phl p 7, alérgenos de ácaro do pó doméstico, em particular Der p 1 e Der p

2, alérgeno de gato principal Fel d 1 e Fel d 2, alérgenos de abelha principais, alérgenos de vespa principais, profilinas, especialmente Phl p 12, alérgenos de oliva, especialmente Ole e 1, alérgenos de Parietaria judaica, especialmente Par j 2, alérgenos de erva-de-santiago, especialmente Amb a 1, alérgenos de pólen de absinto, especialmente Art v 1 e alérgenos de ácaro de armazenagem, especialmente Lep d 2.

8. Proteína hipoalérgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a molécula hipoalérgênica apresenta capacidade de ligação de IgE reduzida.

9. Proteína hipoalérgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizada pelo fato de que molécula hipoalérgênica apresenta reatividade de célula T reduzida.

10. Proteína hipoalérgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o fragmento de alérgeno é composto de aminoácidos 151 a 177, 87 a 117, 1 a 30, 43 a 70 ou 212 a 241 de Phl p 1, aminoácidos 93 a 128, 98 a 128, 26 a 53, 26 a 58, 132 a 162, 217 a 246, 252 a 283 ou 176 a 212 de Phl p 5, aminoácidos 1 a 34 ou 35 a 70 de cadeia 1 de Fel d 1, aminoácidos 1 a 34, 35 a 63 ou 64 a 92 de cadeia 2 de Fel d 1, aminoácidos 30 a 59, 50 a 79 ou 75 a 104 de Bet v 1, aminoácidos 1 a 33, 21 a 51, 42 a 73, 62 a 103 ou 98 a 129 de Der p 2, aminoácidos 1 a 30, 20 a 50, 50 a 80, 90 a 125, 125 a 155 ou 165 a 198 de Der p 7, aminoácidos 1 a 35, 35 a 72, 70 a 100 ou 90 a 122 de Der p 21, aminoácidos 1 a 32, 15 a 48 ou 32 a 70 de Clon 30, aminoácidos 19 a 58, 59 a 95, 91 a 120 ou 121 a 157 de Alt a 1, aminoácidos 31 a 60, 45 a 80, 60 a 96 ou 97 a 133 de Par j 2, aminoácidos 1 a 40, 36 a 66, 63 a 99, 86 a 120 ou 107 a 145 de Ole e 1, aminoácidos 25 a 58, 99 a 133, 154 a 183, 277 a 307, 334 a 363, 373 a 402, 544 a 573, 579 a 608, 58 a 99, 125 a 165, 183 a 224, 224 a 261, 252 a 289, 303 a 340, 416 a 457, 460 a 500 ou 501 a 542 de Fel d 2, aminoácidos 19 a 58, 52 a 91, 82 a 119, 106 a 144 ou 139 a 180 de Can f 2,

aminoácidos 19 a 56, 51 a 90, 78 a 118, 106 a 145 ou 135-174 de Can f 1, aminoácidos 27 a 70, 70 a 100 ou 92 a 132 de Art v 1, aminoácidos 31 a 70, 80 a 120, 125 a 155, 160 a 200, 225 a 263, 264 a 300 305 a 350 ou 356 a 396 de Amb a 1, aminoácidos 1 a 34, 35 a 74, 74 a 115, 125 a 165, 174 a 213, 241 a 280, 294 a 333, 361 a 400 ou 401 a 438 de Alt a 6, aminoácidos 1 a 40, 41 a 80, 81 a 120, 121 a 160 de Alt a 2 ou fragmentos ou variações de seqüência destes.

11. Molécula de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que codifica uma proteína hipoalergênica fundida como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10.

12. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico como definida em reivindicação 11.

13. Vetor de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito vetor é um vetor de expressão.

14. Vetor de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que o dito vetor é um vetor bacteriano, fúngico, de inseto, viral ou mamífero.

15. Hospedeiro, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 11 ou um vetor como definido em qualquer um de acordo com as reivindicações de 12 a 14.

16. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que é direcionado contra uma proteína hipoalergênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10.

17. Anticorpo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é um anticorpo monoclonal ou policlonal.

18. Formulação de vacina, caracterizada pelo fato de que compreende um complexo hipoalergênico como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10 ou um anticorpo como definido na reivindicação

16 ou 17.

19. Formulação de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a dita formulação ainda compreende pelo menos um adjuvante, excipiente e/ou conservante farmaceuticamente
5 aceitáveis.

20. Formulação de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que dita a formulação compreende 10 ng a 1 g, preferivelmente 100 ng a 10 mg, especialmente 0,5 µg a 200 µg da dita proteína hipoalergênica ou anticorpo.

10 21. Uso de uma proteína hipoalergênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10 ou um anticorpo como definido na reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de ser para fabricar um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma infecção viral e/ou uma alergia em um ser humano ou animal.

15 22. Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dito medicamento ainda compreende pelo menos um adjuvante, excipiente e/ou conservante farmaceuticamente aceitáveis.

23. Uso de acordo com a reivindicação 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que o medicamento é usado para a imunização ativa ou passiva.

20 24. Uso de acordo com as reivindicações 21 a 23, caracterizado pelo fato de que o dito medicamento compreende 10 ng a 1 g, preferivelmente 100 ng a 10 mg, especialmente 0,5 µg a 200 µg da dita proteína hipoalergênica ou anticorpo.

25 25. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 24, caracterizado pelo fato de que o medicamento é administrado a um indivíduo na quantidade de 0,01 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, preferivelmente 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal.

26. Uso de um complexo hipoalergênico como definido em

qualquer uma das reivindicações de 1 a 10 ou um anticorpo como definido na reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de ser para o diagnóstico de uma alergia e/ou uma infecção viral em um individual.

5 27. Uso de uma proteína de capsídeo viral de um vírus da família de picornaviridae, caracterizado pelo fato de ser como um carreador em medicamentos ou vacinas ou para o diagnóstico de uma infecção viral, em particular, resfriado comum.

10 28. Uso de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o vírus é da espécie de rinovírus humano, em rinovírus humano particular de 89 ou 14.

29. Molécula hipoalergênica derivada de Phl p 5, caracterizada pelo fato de que tem uma truncação de terminal C e/ou N e apresentando capacidade de ligação de IgE reduzida em comparação com o Phl p 5 do tipo selvagem.

15 30. Molécula de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a molécula truncada apresenta reatividade de célula T reduzida.

20 31. Molécula de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que o dito Phl p 5 truncado é composto de aminoácidos 93 a 128, 98 a 128, 26 a 53, 26 a 58, 252 a 283 de Phl p 5 ou variações de seqüência destes.

32. Molécula de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que o dito Phl p 5 truncado é composto de aminoácidos 132 a 162, 217 a 246, 176 a 212 de Phl p 5 ou variações de seqüência destes.

25 33. Molécula hipoalergênica derivada de Fel d 1, caracterizada pelo fato de ter uma truncação de terminal C e/ou N e que apresenta capacidade de ligação de IgE reduzida.

34. Molécula de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que a molécula truncada apresenta reatividade de célula T

reduzida.

35. Molécula de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizada pelo fato de que o dito Fel d 1 truncado é composto de aminoácidos 1 a 34 ou 35 a 70 de cadeia 1 de Fel d 1, aminoácidos 1 a 34, 35 a 63 ou 64 a 92 de cadeia 2 de Fel d 1 ou sua variação de sequência.

36. Molécula hipoalergênica derivada de Der p 2, caracterizada pelo fato de que tem uma truncação de terminal C e/ou terminal N e que apresenta capacidade de ligação de IgE reduzida.

37. Molécula de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de que a molécula truncada apresenta reatividade de célula T reduzida.

38. Molécula de acordo com a reivindicação 36 ou 37, caracterizado pelo fato de que o dito Der p 2 truncado é composto de aminoácidos 1 a 33, 21 a 51, 42 a 73, 62 a 103, 98 a 129 de Der p 2 ou variações de sequência destes.

39. Molécula hipoalergênica derivada de Der p 7, Der p 21, Clone 30, Alt a 1, Par j 1, Ole e 1, Fel d 2, Can f 1, Can f 1, Art v 1, Amb a 1, Alt a 2 ou Alt a 6, caracterizada pelo fato de ter uma truncação de terminal C e/ou terminal N e que apresenta capacidade de ligação de IgE reduzida e opcionalmente apresenta reatividade de célula T reduzida, sendo preferivelmente composta de aminoácidos 1 a 30, 20 to 50, 50 a 80, 90 a 125, 125 a 155 ou 165 a 198 de Der p 7, aminoácidos 1-35, 36-70, 71-110, 111-145, 140-170, 175-205, 210-250 ou 250-284 de Der p 10, aminoácidos 1 a 35, 35 a 72, 70 a 100 ou 90 a 122 de Der p 21, aminoácidos 1 a 32, 15 to 48 ou 32 a 70 de Clone 30, aminoácidos 19 a 58, 59 a 95, 91 a 120 ou 121 a 157 de Alt a 1, aminoácidos 31 a 60, 45 to 80, 60 a 96 ou 97 a 133 de Par j 2, aminoácidos 1 a 40, 36 a 66, 63 a 99, 86 a 120 ou 107 a 145 de Ole e 1, aminoácidos 25 a 58, 99 a 133, 154 a 183, 277 a 307, 334 a 363, 373 a 402, 544 a 573, 579 a 608, 58 a 99, 125 a 165, 183 a 224, 224 a 261, 252 a 289,

303 a 340, 416 a 457, 460 a 500 ou 501 a 542 de Fel d 2, aminoácidos 19 a 58, 52 a 91, 82 a 119, 106 a 144 ou 139 a 180 de Can f 2, aminoácidos 19 a 56, 51 a 90, 78 a 118, 106 a 145 ou 135-174 de Can f 1, aminoácidos 27 a 70, 70 a 100 ou 92 a 132 de Art v 1, aminoácidos 31 a 70, 80 a 120, 125 a 155, 160 a 200, 225 a 263, 264 a 300 305 a 350 ou 356 a 396 de Amb a 1, aminoácidos 1 a 34, 35 a 74, 74 a 115, 125 a 165, 174 a 213, 241 a 280, 294 a 333, 361 a 400 ou 401 a 438 de Alt a 6, aminoácidos 1 a 40, 41 a 80, 81 a 120, 121 a 160 de Alt a 2 ou fragmentos ou variações de seqüência destes.

40. Proteína hipoalergênica de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos duas moléculas como definidas em qualquer uma das reivindicações de 29 a 39 que apresenta capacidade de ligação de IgE reduzida e opcionalmente apresenta reatividade de célula T reduzida.

41. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que as moléculas são fundidas umas às outras em uma ordem que difere da ordem dos fragmentos no alérgeno do tipo selvagem se as pelo menos duas moléculas forem derivadas do mesmo alérgeno.

42. Molécula de ácido nucleico, caracterizada pelo fato de que codifica quanto a uma molécula hipoalergênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 29 a 39 ou uma proteína como definida na reivindicação 40 ou 41.

43. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 42.

44. Vetor de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o dito vetor é um vetor de expressão.

45. Vetor de acordo com a reivindicação 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o dito vetor é um vetor bacteriano, fúngico, de inseto, viral ou de mamífero.

46. Hospedeiro, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 18 ou um

vetor como definida em qualquer uma das reivindicações de 43 a 45.

47. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que é direcionado contra uma molécula hipoalergênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 29 a 39 ou uma proteína de fusão como definida na reivindicação 40 ou 41.

48. Anticorpo de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo é um anticorpo monoclonal ou policlonal.

49. Formulação de vacina, caracterizada pelo fato de que compreende uma molécula hipoalergênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 29 a 39, uma proteína de fusão como definida na reivindicação 40 ou 41 ou um anticorpo como definido na reivindicação 46 ou 47.

50. Formulação de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de que dita formulação ainda compreende pelo menos um adjuvante, excipiente e/ou conservante farmacêuticamente aceitáveis.

51. Formulação de acordo com a reivindicação 49 ou 50, caracterizado pelo fato de que dita formulação compreende 10 ng a 1 g, preferivelmente 100 ng a 10 mg, especialmente 0,5 µg a 200 µg da dita molécula hipoalergênica ou anticorpo.

52. Uso de uma molécula hipoalergênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 29 a 39, uma proteína de fusão como definida na reivindicação 40 ou 41, uma molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 42, um vetor como definido em qualquer uma das reivindicações de 43 a 45 ou um anticorpo como definido na reivindicação 47 ou 48, caracterizado pelo fato de ser para fabricar um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma alergia em um indivíduo.

53. Uso de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que o dito medicamento ainda compreende pelo menos um adjuvante, excipiente e/ou conservante farmacêuticamente aceitáveis.

54. Uso de acordo com a reivindicação 52 ou 53, caracterizado pelo fato de que o dito medicamento compreende 10 ng a 1 g, preferivelmente 100 ng a 10 mg, especialmente 0,5 µg a 200 µg da dita molécula imunogênica, molécula de ácido nucleico, vetor, hospedeiro ou anticorpo.

5 55. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 52 a 54, caracterizado pelo fato de que o medicamento é administrado a um indivíduo em uma quantidade de 0,01 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, preferivelmente 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal.

10 56. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 52 a 55, caracterizado pelo fato de que o dito indivíduo está em risco de pegar uma alergia.

15 57. Uso de uma molécula hipoalergênica como definida em qualquer uma das reivindicações de 29 a 39, uma proteína de fusão como definida na reivindicação 40 ou um anticorpo como definido na reivindicação 47 ou 48, caracterizado pelo fato de ser para diagnosticar uma alergia ou monitorar o progresso de uma terapia contra alergia em um indivíduo.

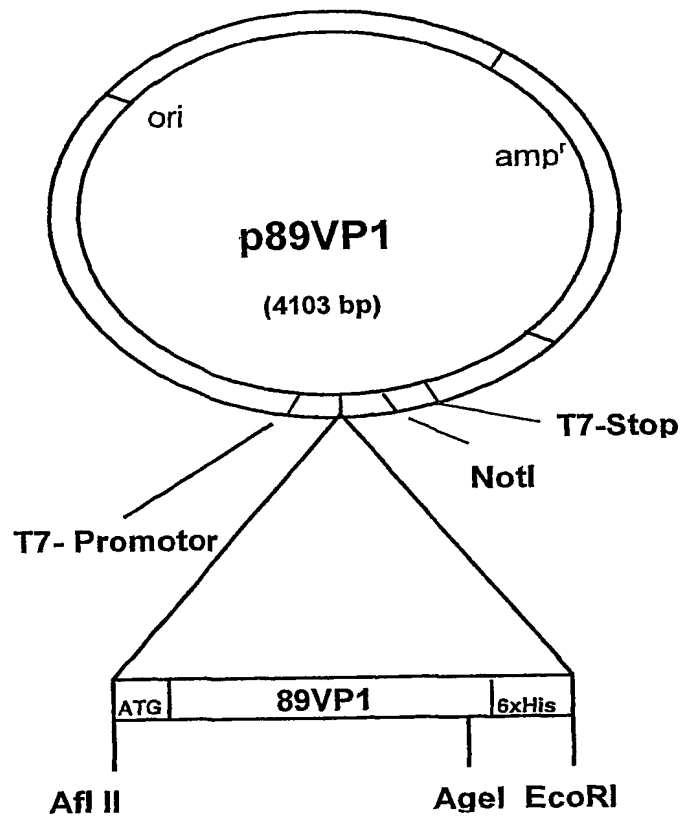


Fig. 1A

SD

Afl 11

5'..TAAGAAGGAGATATACTTAAGATG AAC CCA GTT GAA AAT TAT ATA GAT

start N P V E N Y I D

AGT GTA TTA AAT GAA GTT CTT GTG GTG CCA AAT ATC CAA CCT AGC ACA

S V L N E V L V V P N I Q P S T

TCT GTG TCA AGT CGT GCA GCG CCT GCA TTG GAT GCT GCG GAA ACC

S V S S H A A P A L D A A E T

GGA CAC ACC AGC TCT GTT CAA CCT GAA GGT ATG ATT GAA ACT AGA

G H T S S V Q P E D M I E T R

TAT GTT ATA ACT GAT CAA ACA AGG GAT GAA ACA AGT ATT GAG AGT TTC

Y V I T D Q T R D E T S I E S F

TTA GGT AGG TCA GGG TGT ATC GCT ATG ATA GAA TTT AAT ACA AGT AGT

L G R S G C I A M I E F N T S S

GAT AAA ACT GAA CAT GAT AAA ATT GGT AAA GGA TTC AAA ACA TGG AAG

D K T E H D K I G K G F K T W K

GTT AGT CTT CAA GAA ATG GCA CAA ATC AGA AGA AAA TAT GAA TTA TTC

I S L Q E M A Q I R R K Y E L F

ACA TAT ACA AGA TTT GAT TCA GAG ATA ACA ATA GTC ACT GCA GCC GCA

T Y T R F D S E I T I V T A A A

GCT CAA GGA AAT GAT AGT GGA CAT ATA GTA TTG CAA TTT ATG TAT GTA

A Q G D D S G H I V L Q F M Y V

CCC CCA GGA GCA CCT GTC CCC GAA AAA CGT GAT GAT TAC ACA TGG

P P G A P V P E K R D D Y T W

CAA TCA GGA ACA AAT GCA TCT GTG TTC TGG CAA GAA GGA CAA CCA

Q S G T N A S V F W Q E G Q P

Fig. 1B cont.

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

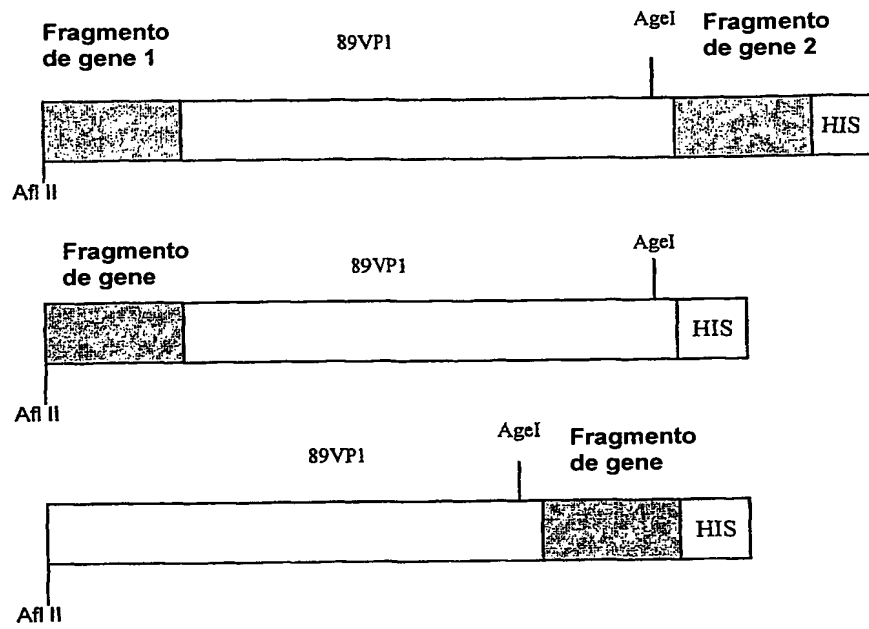


Fig. 1C

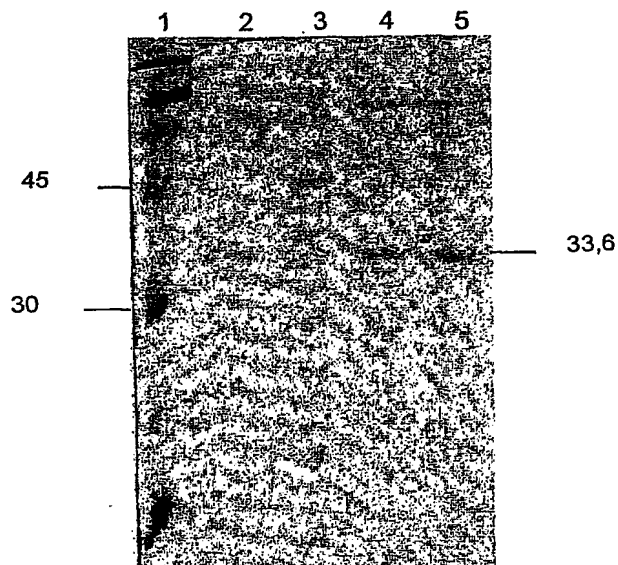


Fig. 2

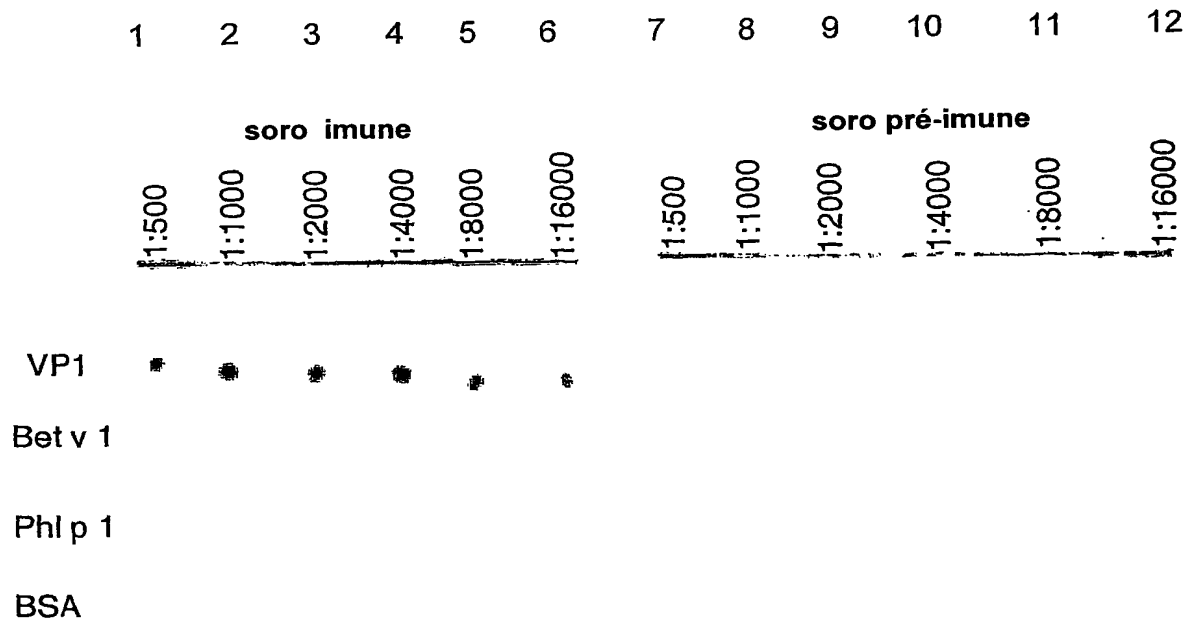


Fig. 3

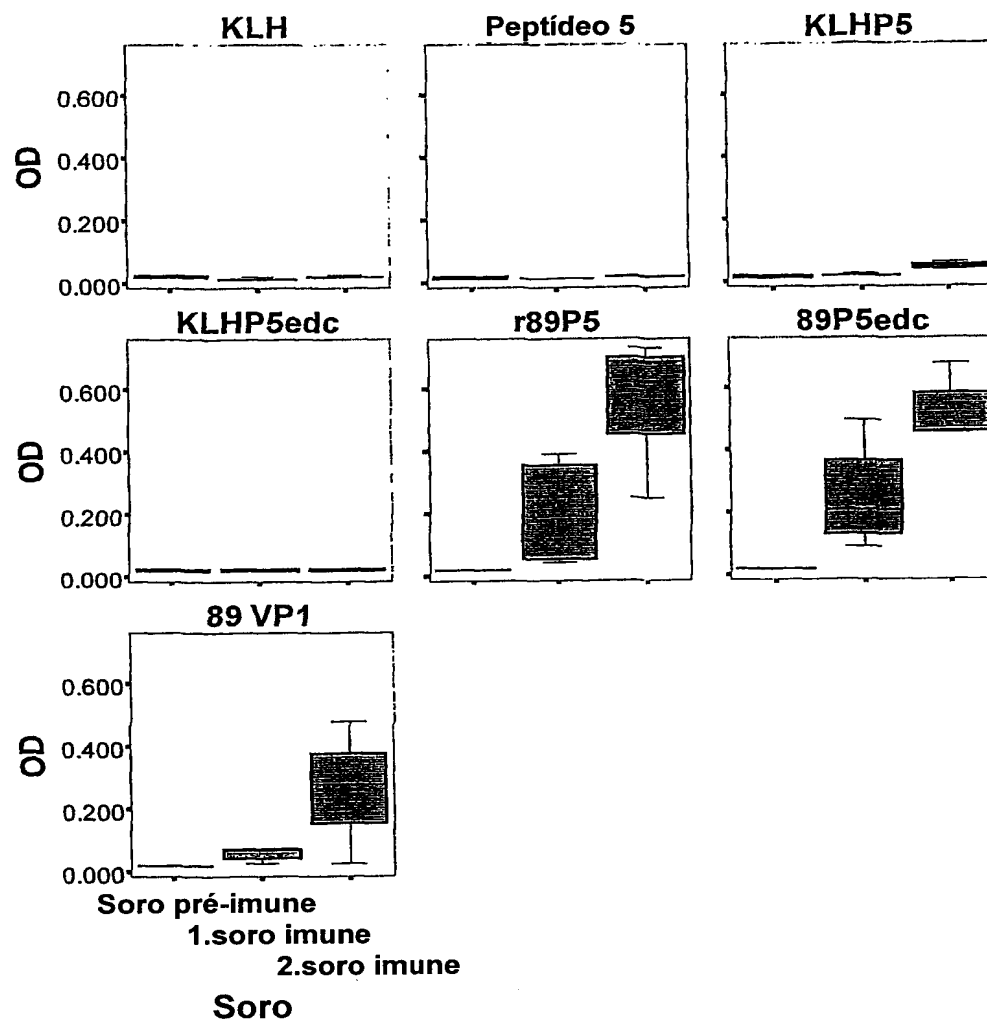


Fig. 4

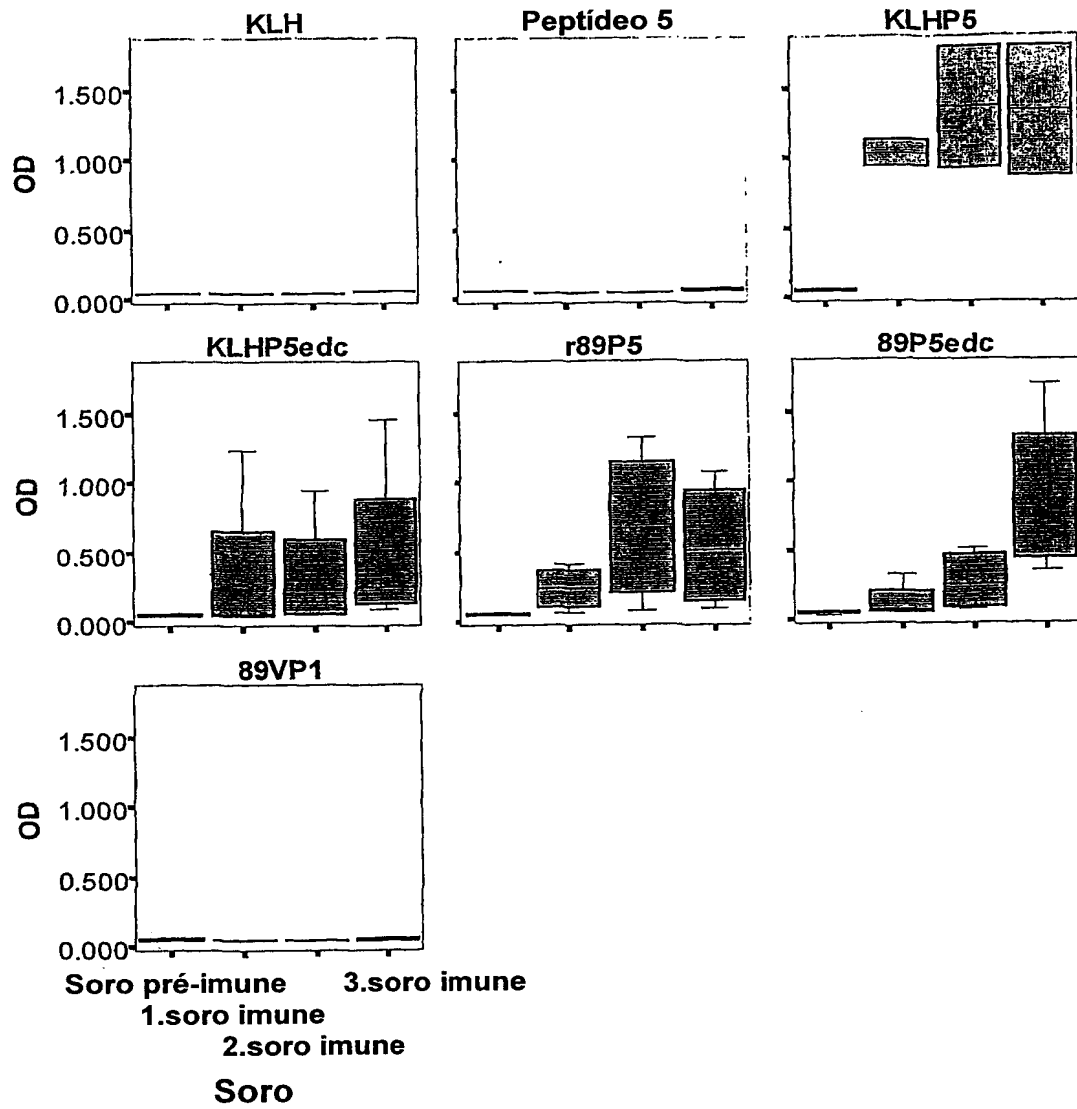


Fig. 5

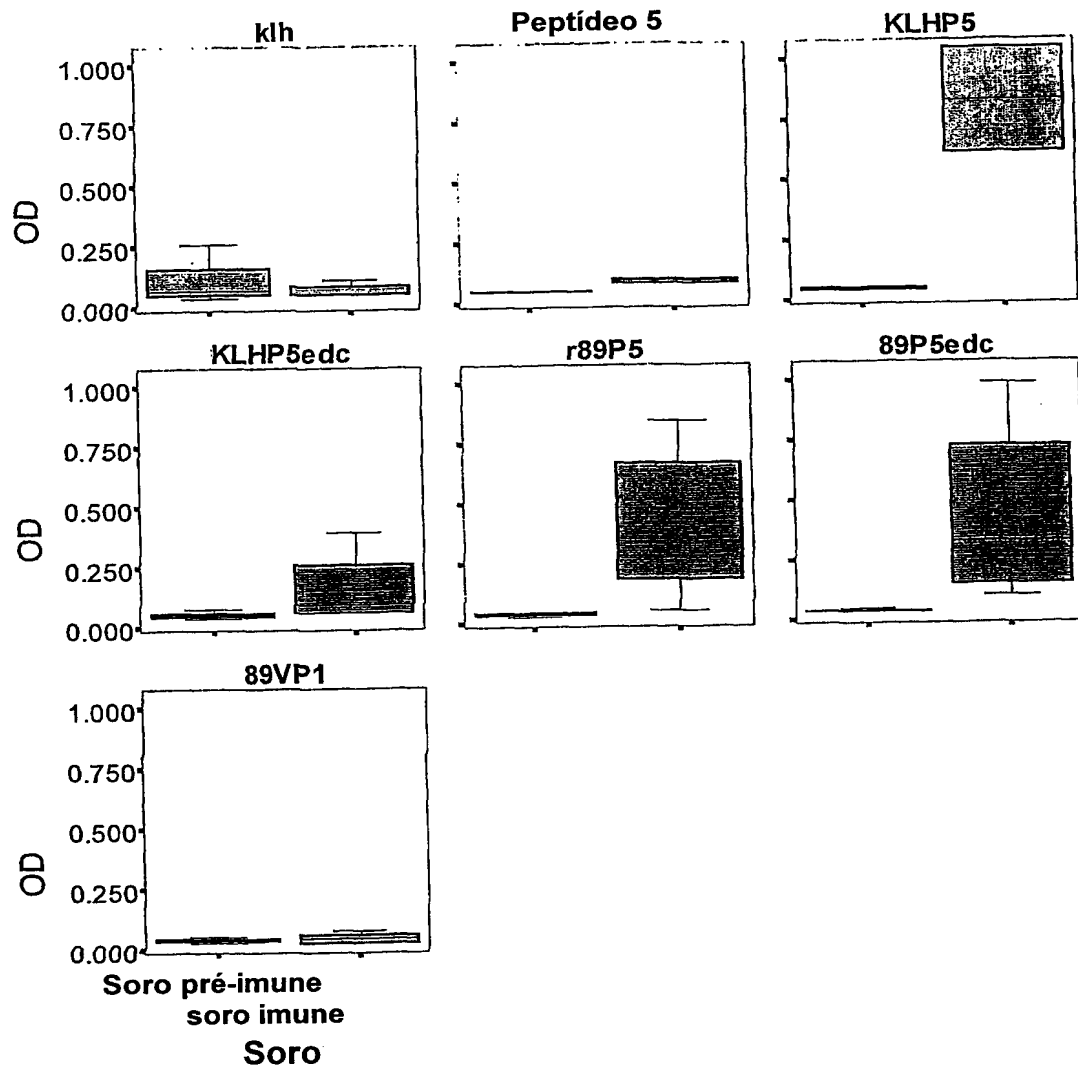


Fig. 6

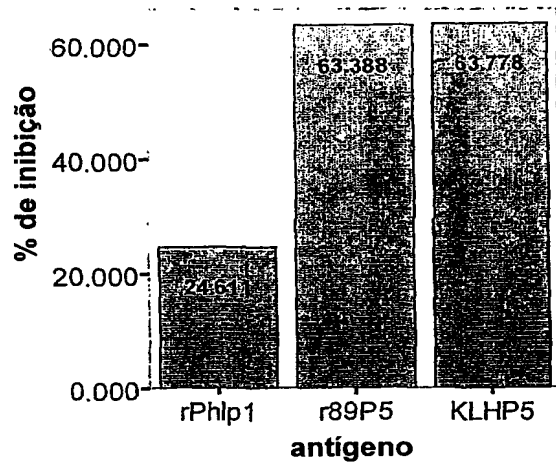


Fig. 7

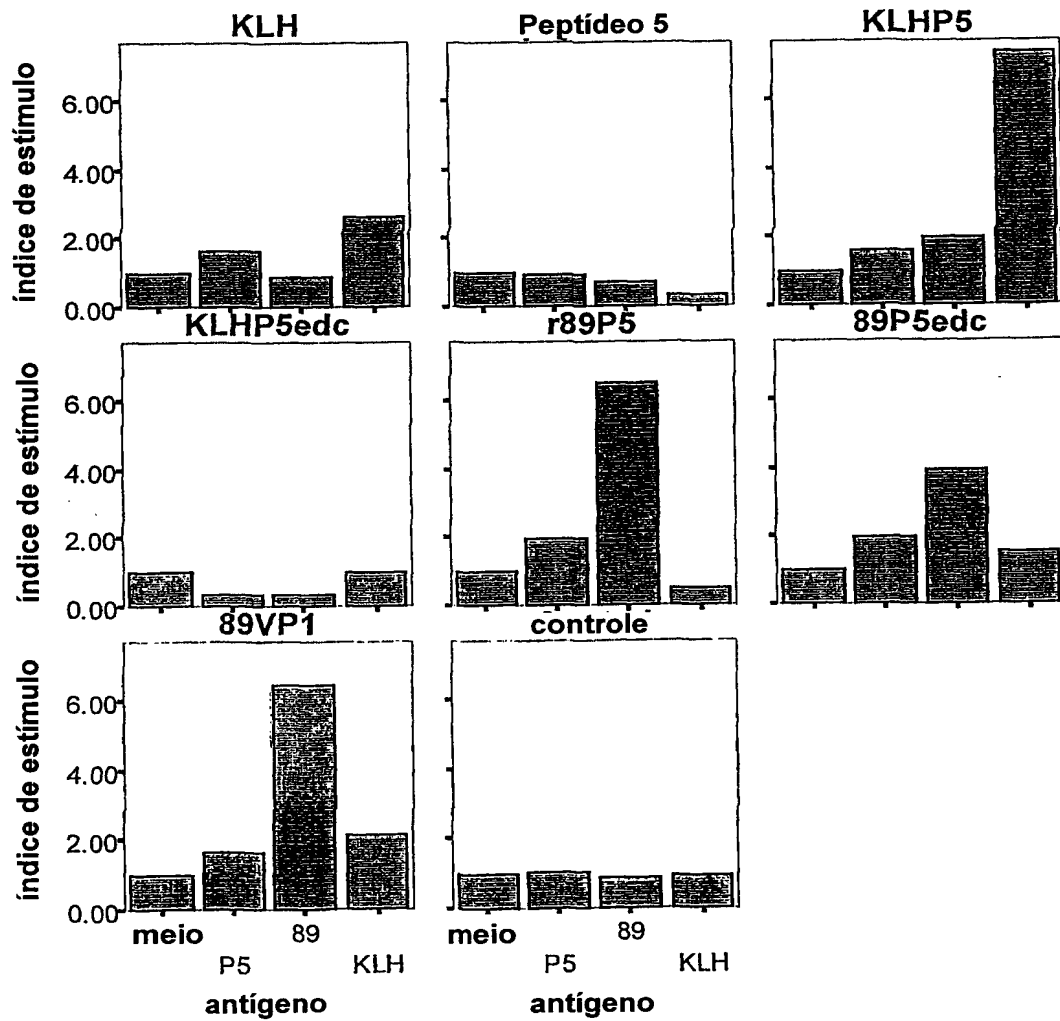


Fig. 8

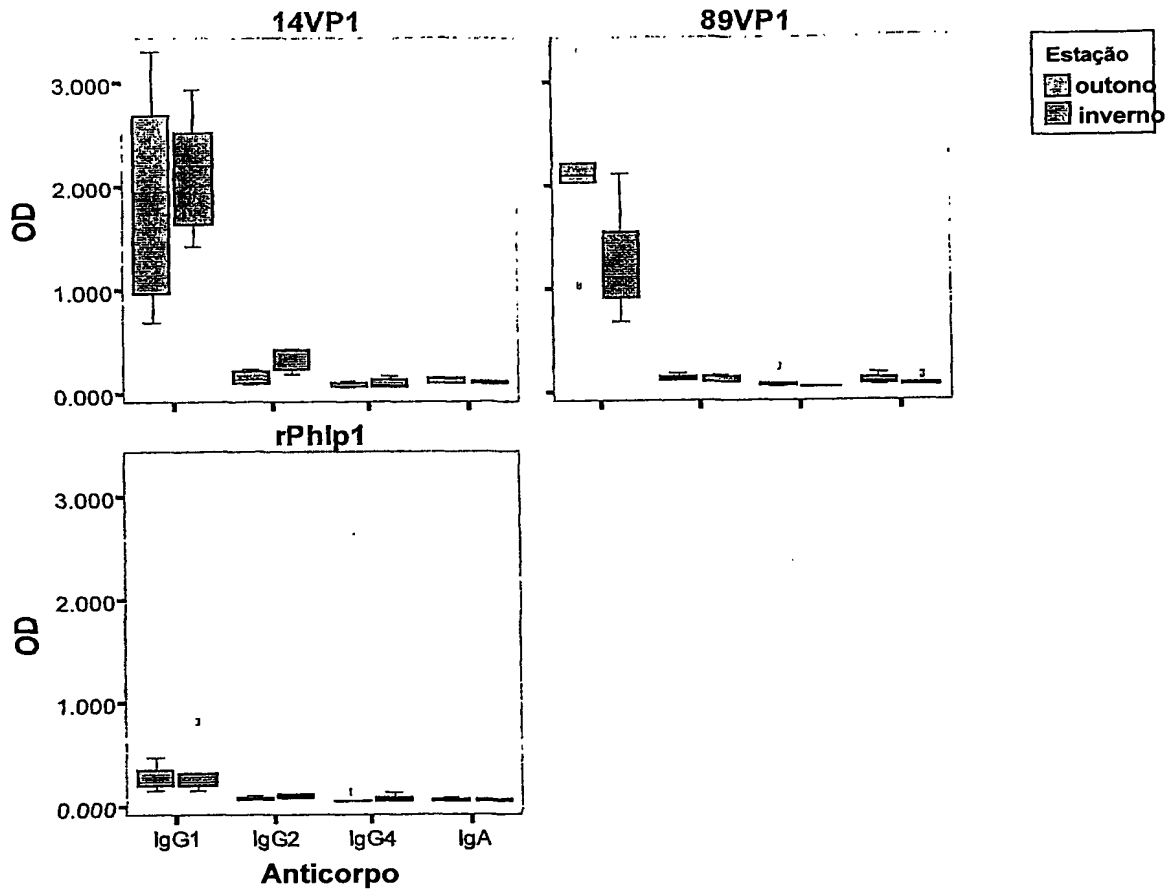


Fig. 9

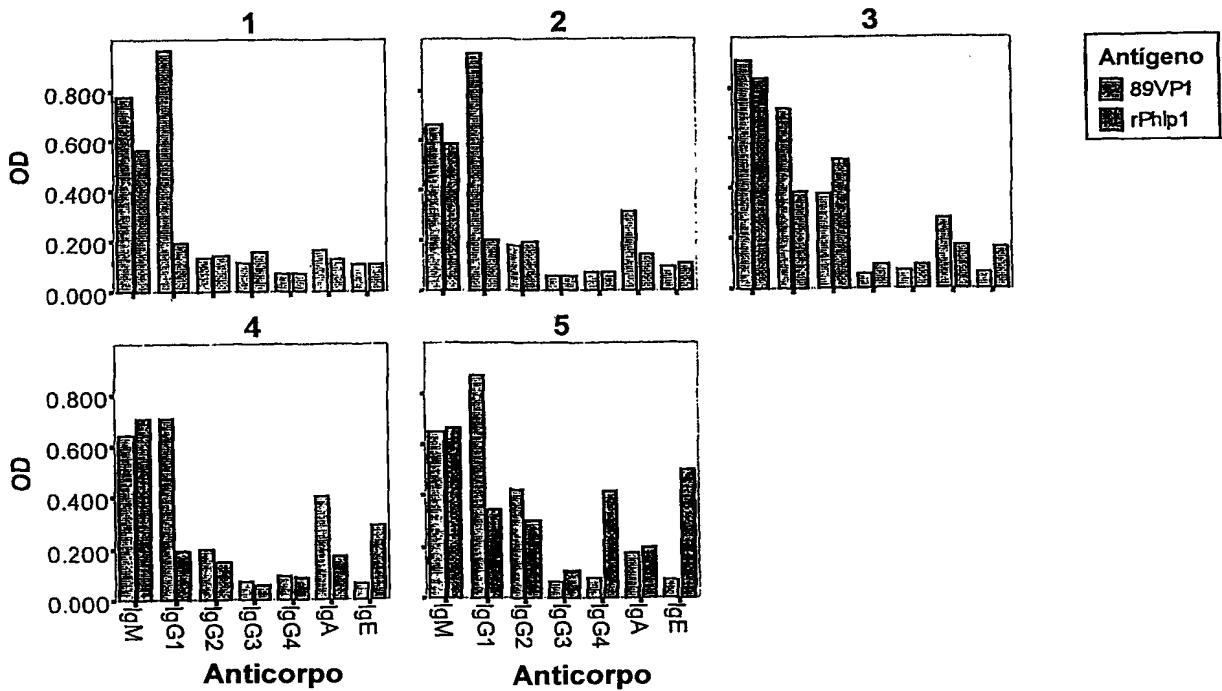


Fig. 10

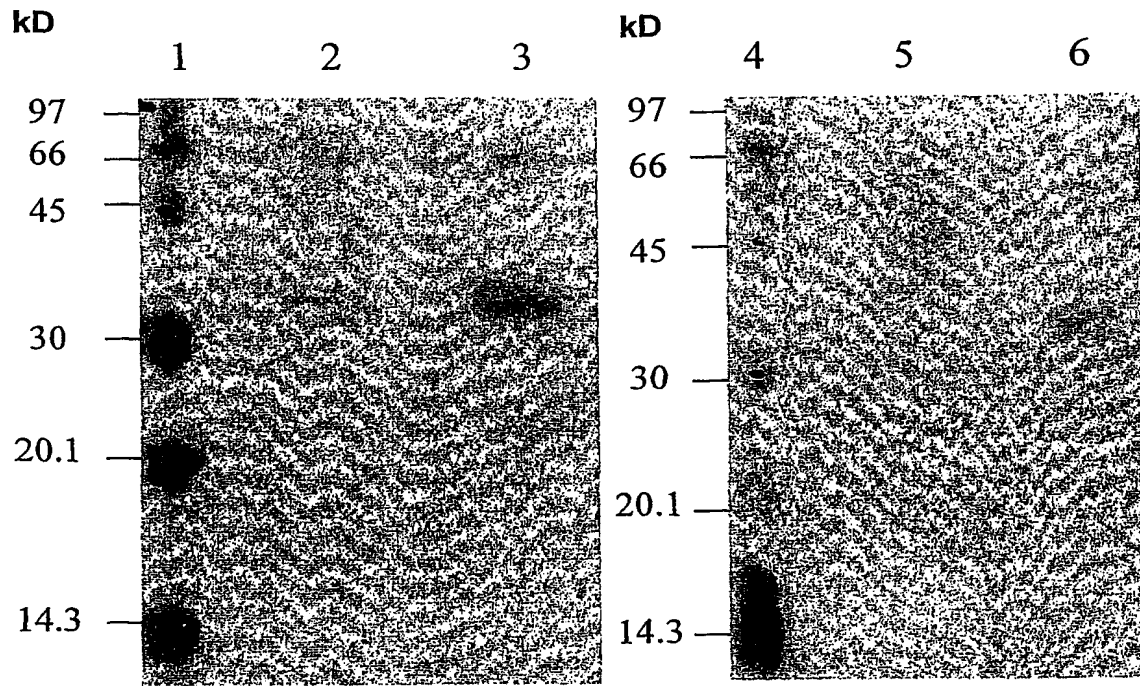


Fig. 11

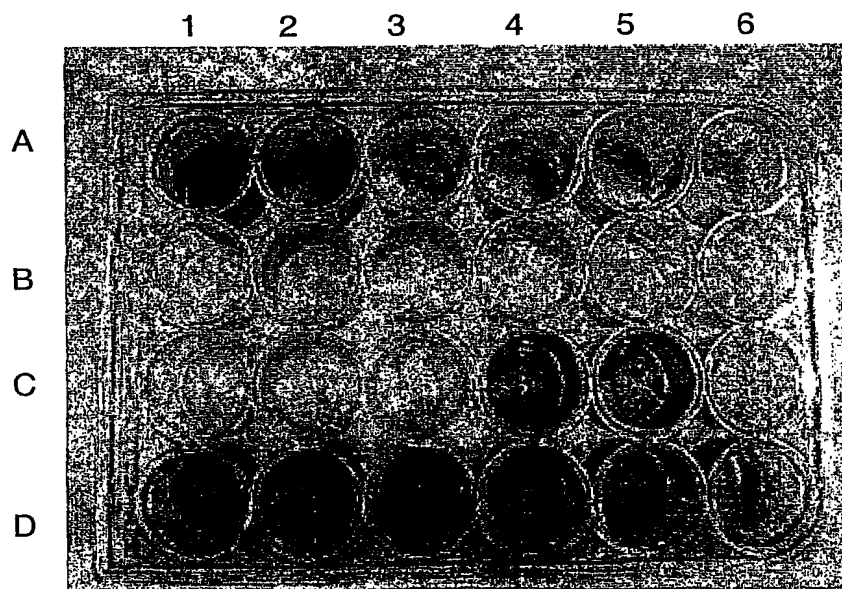


Fig. 12

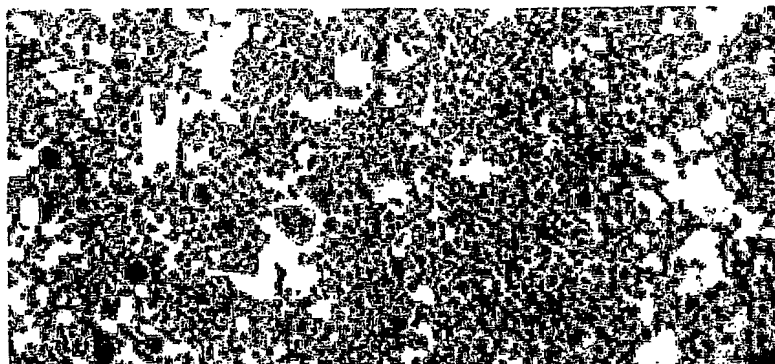


Fig. 12A

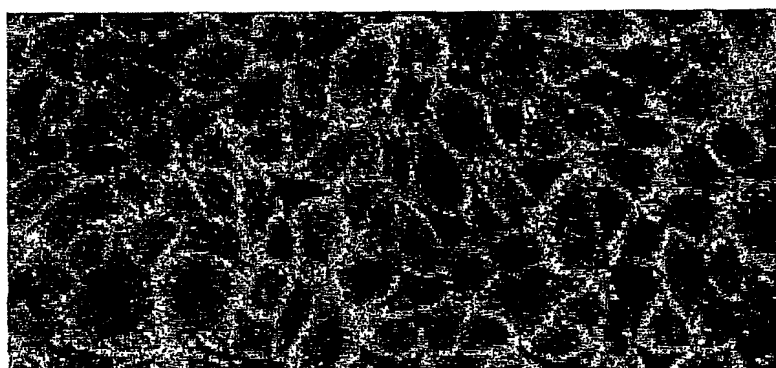


Fig. 12B

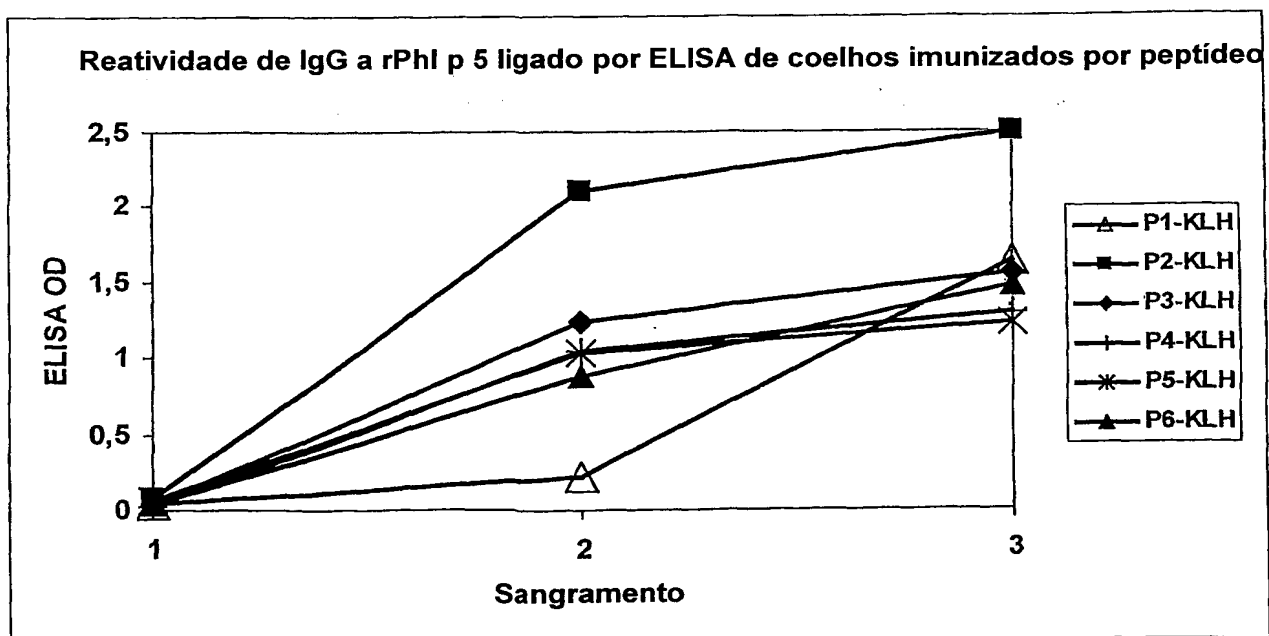


Fig. 13

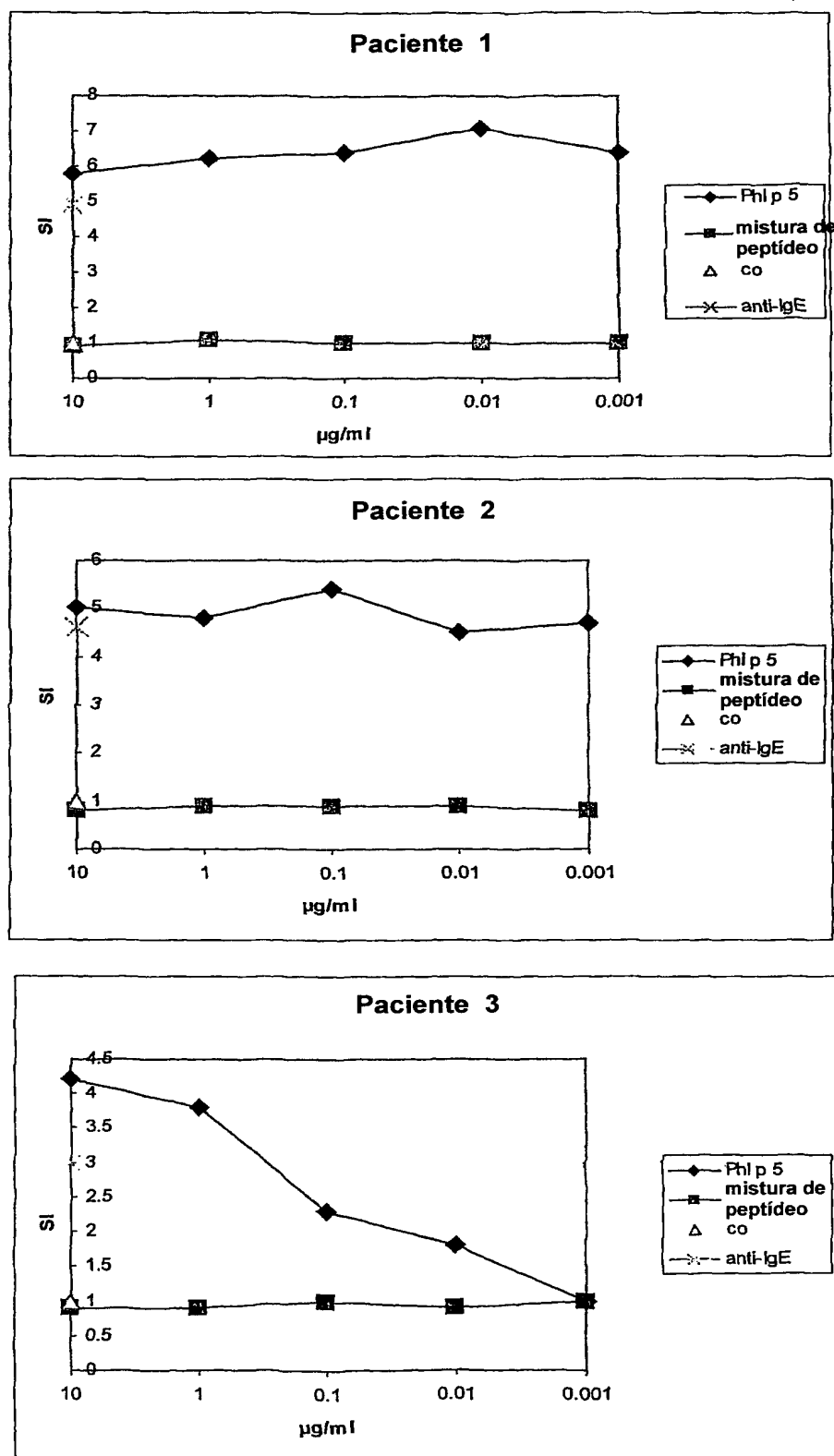


Fig. 14

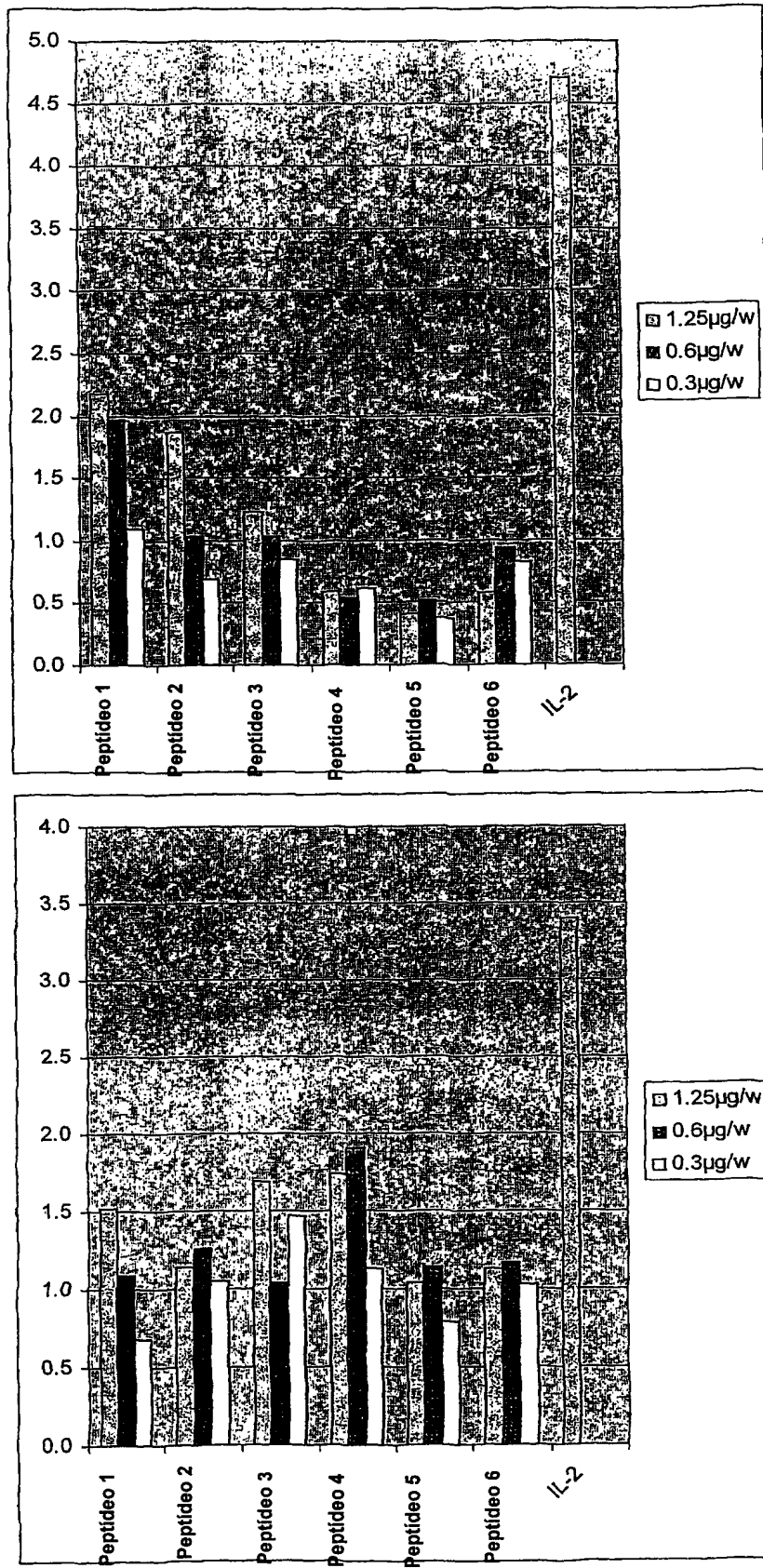


Fig. 15

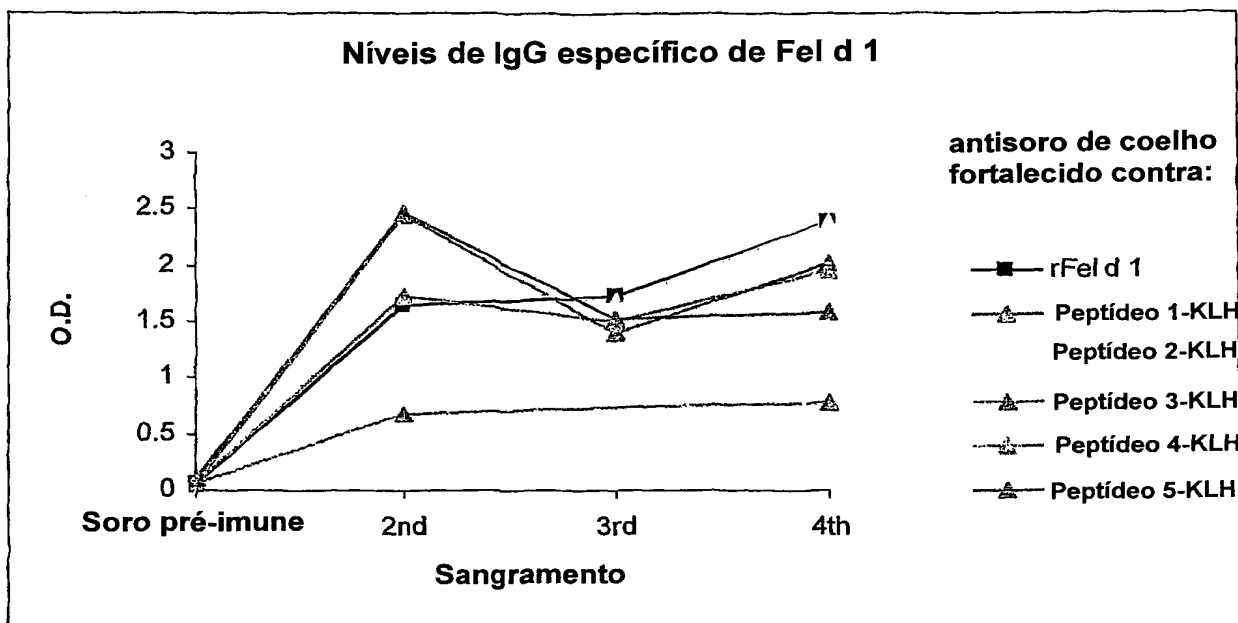
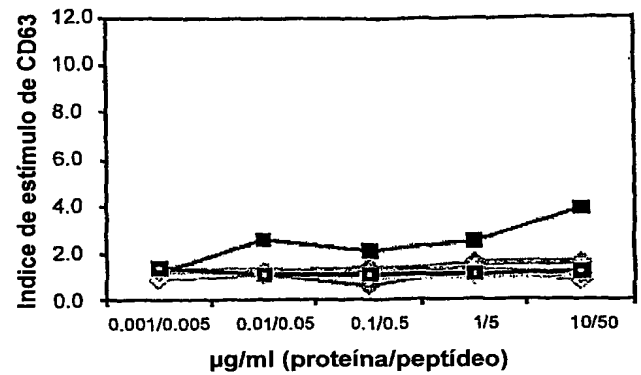
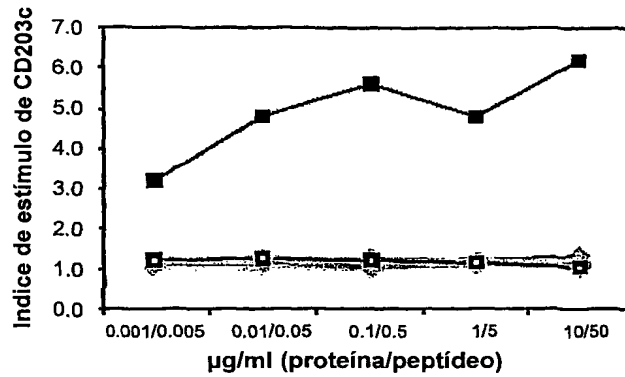


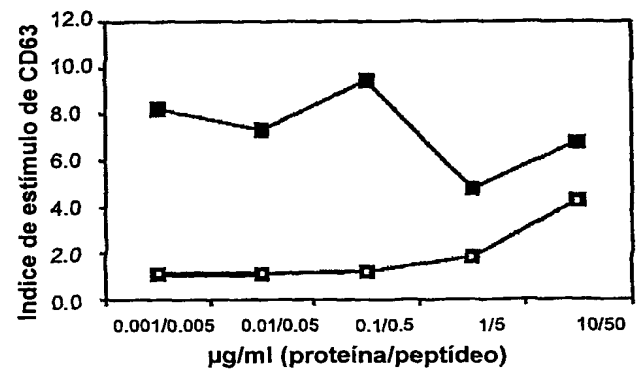
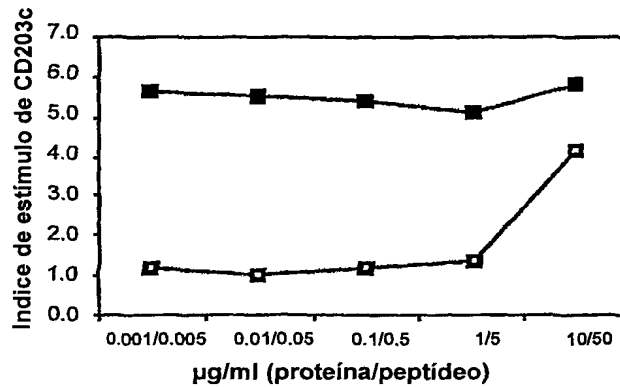
Fig. 16

Paciente RR



■ r Fel d 1
 ◆ Peptídeo 1
 ◆ Peptídeo 2
 ◆ Peptídeo 3
 ◆ Peptídeo 4
 ◆ Peptídeo 5
 ■ Mistura de peptídeo

Paciente EB



Paciente KC

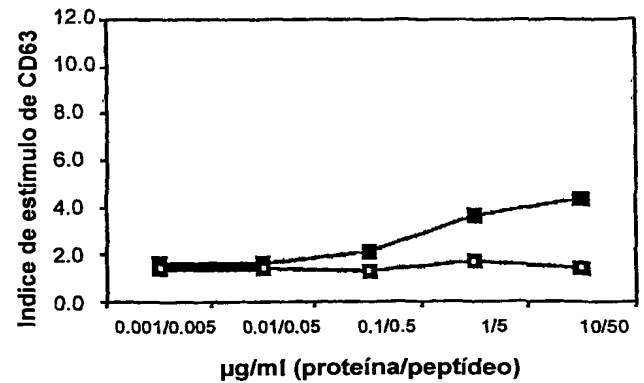
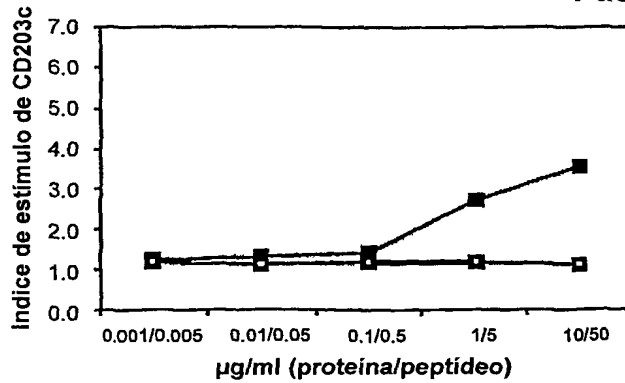
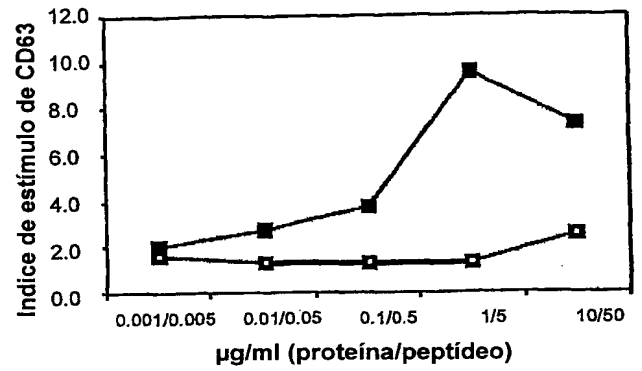
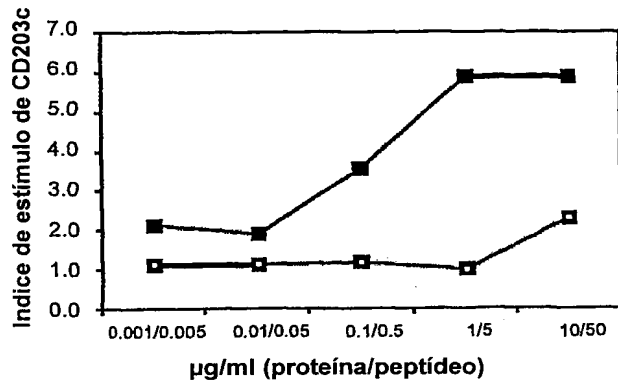
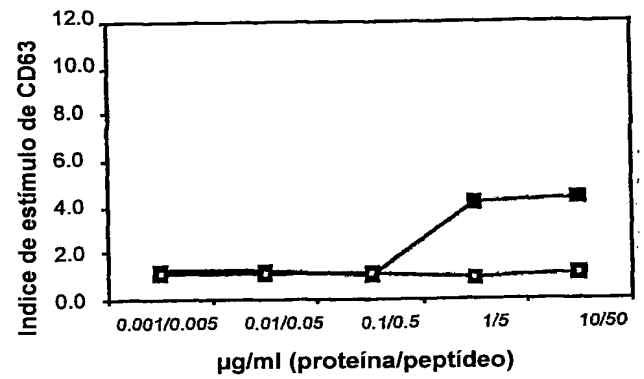
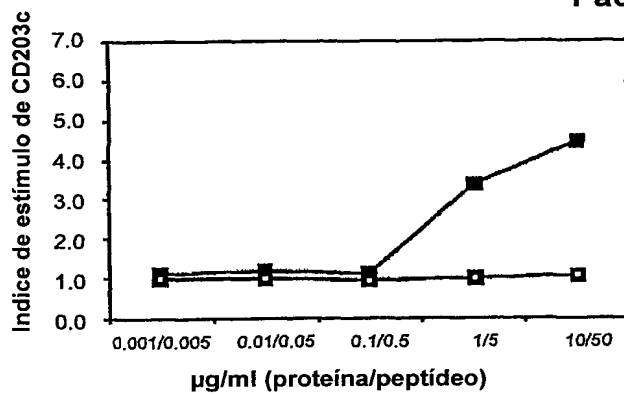


Fig. 17

Paciente MG**Paciente SM**

Cont. Fig. 17

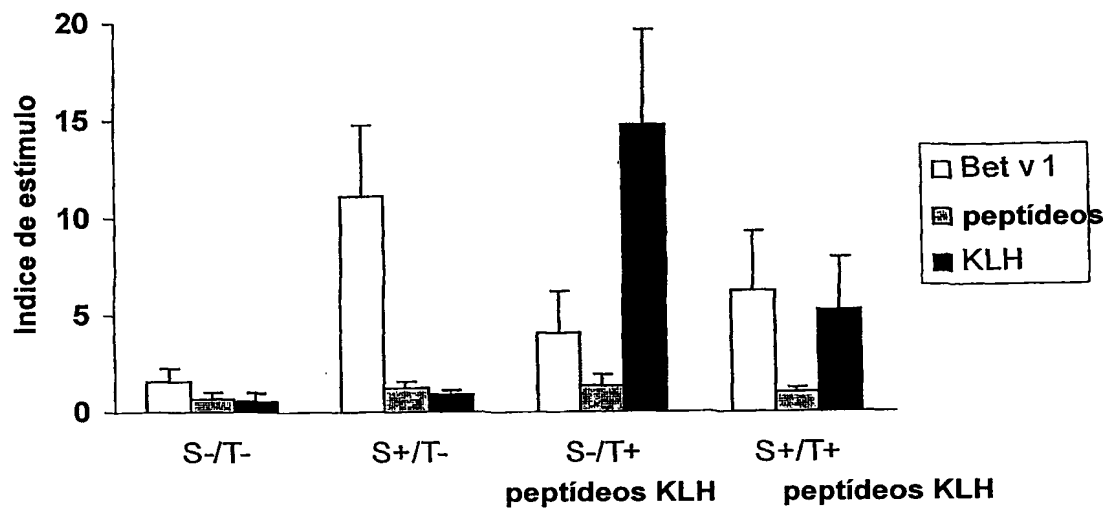


Fig. 18

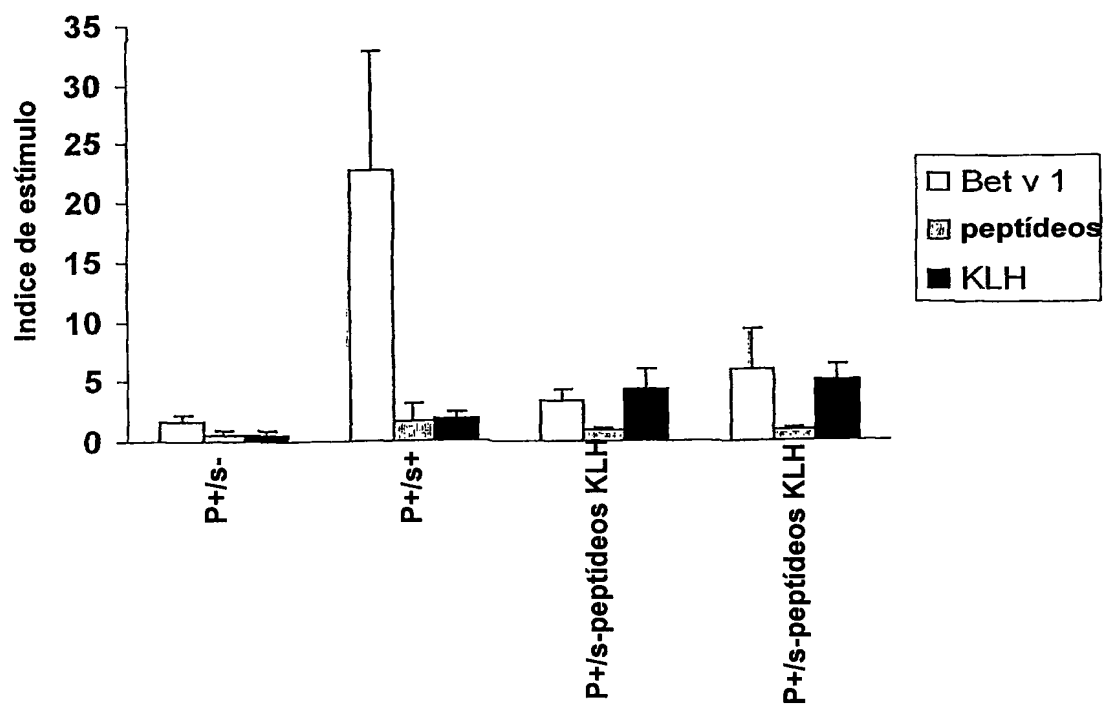


Fig. 19

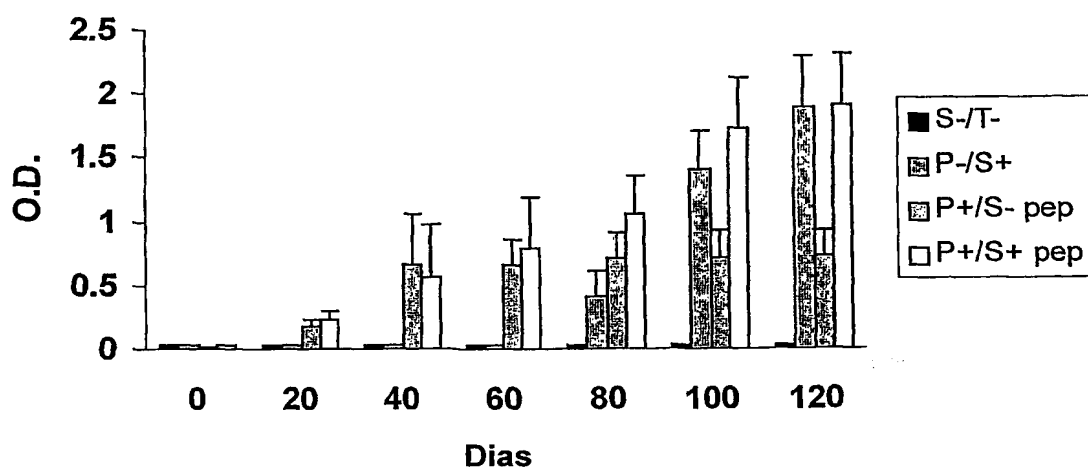


Fig. 20

Reatividade de IgE

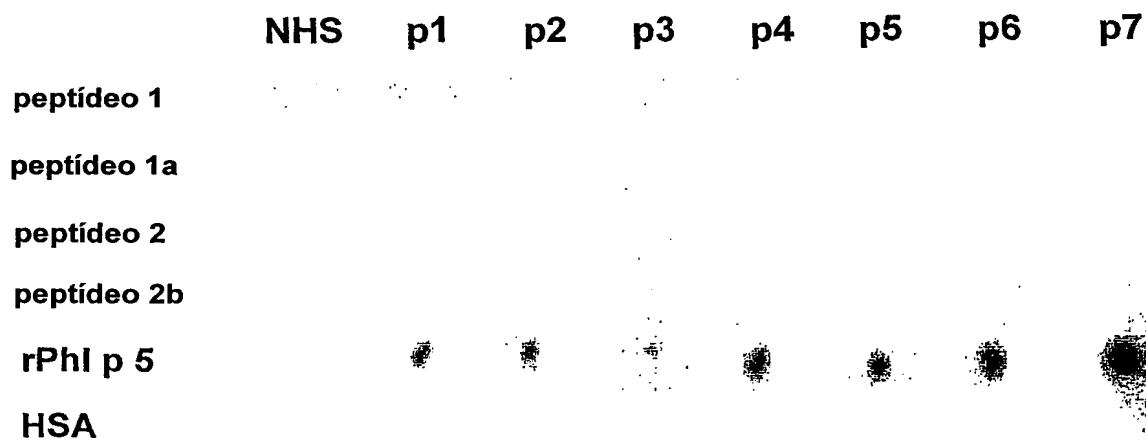


Fig. 21

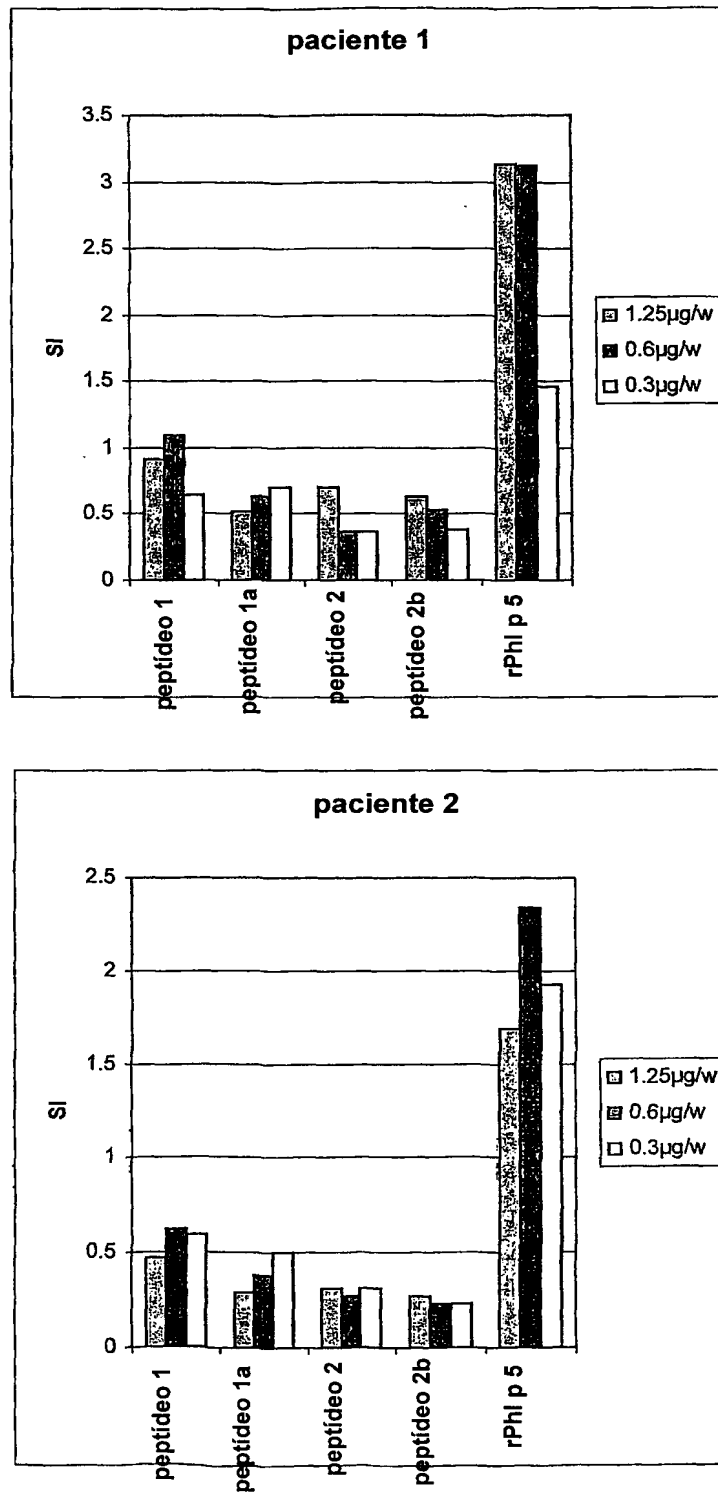
Reatividade de célula T

Fig. 22

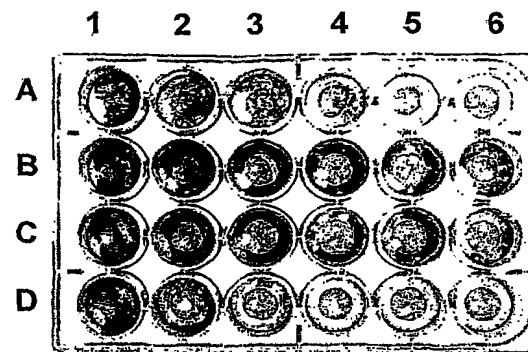


Fig. 23

RESUMO

“PROTEÍNA HIPOALERGÊNICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, HOSPEDEIRO, ANTICORPO, FORMULAÇÃO DE VACINA, USOS DE UMA PROTEÍNA HIPOALERGÊNICA, DE UM COMPLEXO
5 HIPOALERGÊNICO E DE UMA PROTEÍNA DE CAPSÍDEO VIRAL DE UM VÍRUS DA FAMÍLIA DE PICORNAVIRIDAE, MOLÉCULA HIPOALERGÊNICA, E, USO DE UMA MOLÉCULA HIPOALERGÊNICA, UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, UM VETOR OU UM ANTICORPO”

10 A presente invenção diz respeito a uma proteína hipoalergênica que consiste de pelo menos uma molécula hipoalergênica derivada de um alérgeno, que é fundido ou conjugado a pelo menos uma segunda proteína não alérgica ou fragmento desta.