



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014031327-0 B1



(22) Data do Depósito: 15/06/2012

(45) Data de Concessão: 01/02/2022

(54) Título: MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO PARA O TRATAMENTO DE ALERGIAS

(51) Int.Cl.: A61K 38/00.

(73) Titular(es): IMMUNOMIC THERAPEUTICS, INC..

(72) Inventor(es): WILLIAM HEARL; TERI HEILAND.

(86) Pedido PCT: PCT US2012042552 de 15/06/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/187906 de 19/12/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/12/2014

(57) Resumo: ÁCIDOS NUCLEICOS PARA O TRATAMENTO DE ALERGIAS. A presente invenção fornece vacinas de DNA para o tratamento de alergias. As vacinas compreendem a sequência de codificação para um ou mais epítopos alérgenos, e de preferência a sequência completa de proteína, da proteína alergênica de onde o(s) epítopo(s) são derivados, fundido na estrutura com o domínio luminal da membrana de proteína associada ao lisossoma (LAMP) e à sequência alvo da LAMP. As vacinas permitem a apresentação de epítopos configurados apropriadamente em três dimensões para produzir uma resposta imunológica. As vacinas podem ser moléculas multivalentes, e/ou pode ser fornecida como parte de uma vacina multivalente contendo dois ou mais constructos de DNA.

MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO PARA O TRATAMENTO DE ALERGIASReferência cruzada aos pedidos de depósito correlatos

Este pedido depende da revelação de e reivindica o benefício da data de depósito de pedido de patente provisório 5 n° U.S. 61/496.866, depositado em 14 junho de 2011, incorporado ao presente documento em sua totalidade a título de referência.

Antecedentes da invençãoCampo da invenção

A presente invenção refere-se aos campos de biologia molecular e medicina. Mais especificamente, a invenção refere-se a ácidos nucleicos para uso como vacinas de DNA e métodos de que usam as mesmas para tratar indivíduos que sofrem de ou suscetíveis a reações alérgicas.

Discussão de técnica relacionada

15 A alergia é uma doença de hipersensibilidade caracterizada pela produção de anticorpos IgE contra um alérgeno ou molécula que causa alergia. As alergias afetam mais de 25% da população. Os alérgenos podem entrar no corpo através de muitas rotas, incluindo o trato respiratório, contato com 20 a pele, ingestão, mordida de inseto ou injeção de um fármaco.

O gerenciamento de doença de alergia compreende diagnóstico e tratamento. Os alergistas diagnosticam uma alergia com o uso de uma variedade de técnicas, como um teste de punctura de pele, técnicas com base em radioalergosorvente, 25 ELISA ou teste de provação para demonstrar o alérgeno específico IgE e para identificar a fonte do alérgeno. O tratamento de alergia frequentemente se encontra em duas categorias: evitação e dosagem com anti-histamínicos. Uma terceira alternativa, imunoterapia de alergia, exige que o 30 paciente receba injeções semanais que consiste em pequenas

quantidades dos alérgenos agressores a fim de ajudar o sistema imunológico a reeducar sua resposta ao alérgeno.

O uso e geração de proteínas de fusão de alérgeno são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, patente US n° 7.566.456 ensina uma proteína de fusão com domínios de ligação de IgE e IgG bem como a codificar um alérgeno. Adicionalmente, o documento no WO 97/07218 ensina proteínas de fusão de CD32 anti-alérgeno para uso em imunoterapia de alergia. Nenhum desses documentos, entretanto, ensina como sua respectiva proteína de fusão interage com células T através de representação de antígeno para induzir ou modificar uma resposta Th1. Ademais, não há conexão teórica entre direcionar a vacina que contém anti-CD32 para células dendríticas para afetar uma indução positivo de células Th1. Ambos os documentos ensinam uma composição que introduz um alérgeno terapeuticamente, para que o alérgeno possa ser encontrado no soro como uma proteína de fusão de alérgeno.

Foi estabelecido por Toda et al, 2002 que um epítopo de célula T de um alérgeno, nesse caso um epítopo Cry J2 localizado no aminoácido 247 a 258, pode ser fixado a uma proteína de fusão e ser usado para conduzir imunoterapia específica para alergia. A composição específica descrita por Toda et al, 2002 é o uso de uma vacina de DNA que codifica o principal epítopo de célula CD4 T de Cry J2, localizado em aminoácidos 247 a 258, fixado a peptídeo de cadeia invariante associado a classe II (CLIP). CLIP contém uma sequência de diapedese endossomal/lisossomal e contém um domínio que se liga ao sulco de ligação de peptídeo de MHC II. Toda et al, 2002 mostra que imunização com a vacina de DNA CLIP/peptídeo Cry J2 resulta em preparar um camundongo para uma resposta predominantemente Th1, caracterizado por IFN-gama mais alto e produção de IgG2a. Entretanto, Toda et al.

não ensina o direcionamento intracelular de toda a sequência de codificação de proteína de um alérgeno útil para conduzir imunoterapia específica para alergia.

A patente US nº 6.982.326 e a patente US nº 6.090.386 descrevem sequências de ácidos nucleicos que codificam os principais alérgenos de pólen de *Cryptomeria japonica*: Cry J1, Cry J2, Jun s I e Jun v I e fragmentos ou peptídeos dos mesmos. A invenção também fornece Cry J1, Cry J2, Jun s I e Jun v I purificado e pelo menos um fragmento do mesmo produzido em uma célula hospedeira transformada com uma sequência de ácidos nucleicos que codificam o Cry J1, Cry J2, Jun s I e Jun v I ou pelo menos um fragmento da mesma e fragmentos de Cry J1, Cry J2, Jun s I ou Jun v I ou pelo menos um fragmento da mesma e fragmentos de Cry J1, Cry J2, Jun s I ou Jun v I preparado sinteticamente. Cry J1, Cry J2, Jun s I e Jun v I e fragmentos do mesmo são revelados como úteis para diagnosticar, tratamento e prevenir polinose decorrente do cedro japonês. A invenção também fornece peptídeos isolados de Cry J1 e Cry J2. Os peptídeos dentro do escopo da invenção compreendem ao menos um epítopo de célula T ou de preferência pelo menos dois epítopos de célula Ts de Cry J1 ou Cry J2. A invenção também se refere a peptídeos modificados que tem propriedades terapêuticas aprimoradas ou similares como a porção ou alérgeno que ocorre naturalmente correspondente das mesmas mas que tem efeitos colaterais reduzidos. Métodos de tratamento ou de diagnóstico de sensibilidade a pólens de cedro japonês em composições terapêuticas e individuais e formulações de múltiplos peptídeos que compreendem um ou mais peptídeos da invenção também são fornecidos. A invenção não ensina como combinar os epítopos ou alérgenos para o interior de uma vacina de DNA com propriedades imunoestimulatórias.

A patente US nº 7.547.440 e a patente US nº 7.112.329 identificam o sítio de epítopo de célula T em uma molécula de alérgeno de pólen de cipreste (hinoki) japonês estimulando-se uma linha de célula T estabelecida a partir de um paciente que 5 sofre de alergia de pólen de cipreste japonês com um peptídeo de sobreposição que cobre a estrutura primária do alérgeno de pólen de cipreste japonês. O peptídeo é útil em imunoterapia com base em peptídeo para pacientes com polinose de árvore nascente que inclui pacientes com polinose de cipreste japonês 10 que tem reatividade cruzada com pólen de cipreste japonês. O peptídeo também é útil para diagnosticar polinose de árvore nascente. A invenção é limitada a diagnósticos e aplicação de polipeptídeo de epítopos.

As vacina de DNA foram desenvolvidas como uma alternativa 15 às vacinas de vírus inteira ou de célula inteira tradicional. De um modo geral, as vacina de DNA são ácidos nucleicos manipulados que incluem sequências que codificam um ou mais epítopos. Os ácidos nucleicos são distribuídos para células, tipicamente células apresentadoras de antígeno (APCs), os ácidos 20 nucleicos são expressos e os epítopos presentes nas proteínas expressadas são processados no compartimento lisossomal/endossomal e, por fim, apresentados sobre a superfície da célula. A patente US nº 5.633.234 concedida a August et al. revela e caracteriza a sequência de direcionamento 25 lisossomal/endossomal da proteína de membrana associada lisossomal (LAMP). Esta patente identifica resíduos típicos na região terminal C da proteína, que são necessários para o direcionamento da proteína para o compartimento lisossomal/endossomal. A patente revela que a fusão de peptídeos 30 antigênicos da sequência de direcionamento LAMP de terminal C

pode fornecer apresentação e processamento aprimorados de epítopos para a geração de uma resposta imunológica.

Além disso, a publicação de pedido de patente US no 2004/0157307 concedida a Harris et al. revela o uso do domínio luminal LAMP como um “domínio de diapedese” para direcionar proteínas quiméricas expressadas a partir de vacinas de DNA através de uma ou mais organelas/compartimentos celulares, como através da trajetória veicular lisossomal. As proteínas quiméricas incluem o domínio luminal de um polipeptídeo LAMP, um domínio antigênico que compreende uma sequência de epítopo de peptídeo anteriormente identificada e selecionada a partir de uma proteína de antígeno, um domínio transmembranar e uma sequência de direcionamento lisossomal/endossomal.

As vacinas de DNA foram propostas como um tratamento de doença alérgica (Raz et al, 1996; Hartl et al, 2004; Hsu et al, 1996; Crameri 2007; Weiss et al, 2006). A lógica subjacente é que a proteína de alérgeno codificada por uma vacina de DNA irá de preferência ativar a resposta celular de Th1 específica para alérgeno com a produção de interferons por células APCs, extermadoras naturais (NK) e T, em vez da resposta do tipo Th2 característica, como secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 e a formação de IgE por linfócitos B e a maturação e recrutamento de eosinófilos em reações de fase tardia. Entretanto, os mecanismos subjacentes da indução diferencial dos fenótipos de célula T Th1 e Th2 parecem envolver um grande número de fatores, como propriedades exclusivas do DNA bacteriano de preparações de vacina, por exemplo., não metilado e resíduos de DNA CpG, o meio de citoquina obtido por imunidade inata e as propriedades de diapedese celular dos alérgenos (Chen et al, 2001; Kaech et al, 2002). Nenhuma invenção ou método tratou

com sucesso a incerteza de tratamento de alergia conforme conduzido por distribuição de ácidos nucleicos que codifica um alérgeno. Desse modo, até a presente data, um método de tratamento de alergia não foi possibilitado. Além disso, a 5 administração de vacinas de DNA para o tratamento de doença alérgica resultou na secreção do peptídeo alérgeno no ambiente extracelular, potencialmente levando a indução acidental de uma resposta alérgica permeável ativação de IgE.

Sumário da invenção

10 A presente invenção fornece ácidos nucleicos (também chamado no presente documento de "construtos") que codificam proteínas alergênicas, polipeptídeos alergênicos e peptídeos alergênicos. Os ácidos nucleicos são projetados para serem distribuídos para células imunes e produção de proteínas alergênicas, polipeptídeos e peptídeos dentro dessas células. 15 As proteínas codificadas, polipeptídeos e peptídeos têm sequências de direcionamento para direcionar as proteínas para o compartimento MHC-II para o processamento e exibição de um ou mais epítopos, resultando em uma resposta imunológica 20 aos epítopo(s). Em geral, os ácidos nucleicos compreendem os domínio seguintes, que são correlacionados aos respectivos domínios da proteína codificada: um domínio de sequência de sinais; um domínio estabilizante de intra-organela; um domínio alérgeno; um domínio transmembranar; e um domínio de 25 direcionamento lisossomo/endossomo citoplasmático.

Dentro do contexto da proteína codificada, a sequência de 30 sinais é fornecida para direcionar a proteína codificada para o retículo endoplásmico ou um lisossomo. O domínio estabilizante de intra-organela é uma sequência que é projetada para ser proteoliticamente resistente e para proteger as porções

remanescentes da proteína e, em particular, o domínio alérgeno de degradação antes do processamento para apresentação de epítopo pela célula. Em modalidades exemplificadoras, o domínio estabilizante de intra-organela é o domínio luminal de LAMP-1.

5 O domínio alérgeno compreende a sequência de um ou mais epítopos alergênicos que podem servir para provocar uma resposta imunológica em um animal no qual os epítopos são apresentados. Tipicamente, o domínio alérgeno compreende uma ou mais proteína de alérgenos, embora em modalidades, fragmentos de peptídeo ou

10 polipeptídeo imunogênico de proteínas alergênicas podem ser usados. Em modalidades exemplificadoras discutidas abaixo, o epítopo é um epítopo de um alérgeno de planta. Nas proteínas codificadas da invenção, o domínio alérgeno não inclui um peptídeo de sinalização, como o(s) peptídeo(s) de sinalização de ocorrência natural como parte da(s) proteína(s) de alérgeno.

15 O domínio alérgeno pode compreender uma única proteína alergênica, polipeptídeo ou peptídeo ou pode compreender duas ou mais proteínas alergênicas, polipeptídeos ou peptídeos. Quando dois ou mais alérgenos estão presentes, cada alérgeno pode

20 ser da mesma espécie/fonte ou um ou mais podem ser de uma ou mais fontes diferentes. Quando dois ou mais alérgenos estão presentes, os mesmos são expressos de modo coordenado para fornecer um número igual de cópias de cada região de codificação na proteína expressa. O domínio transmembranar pode ser qualquer

25 sequência que é adequada para direcionar inserção e transferência de uma proteína através de uma membrana. Muitas tais sequências são conhecidas na técnica ou podem ser facilmente projetadas. O domínio de direcionamento de lisossomo/endossomo pode ser qualquer sequência que tenha capacidade para direcionar

30 o peptídeo para um lisossomo ou endossomo. Tais sequências são

conhecidas na técnica e são exemplificadas no presente documento pela sequência de cauda citoplasmática de LAMP-1.

Conforme mencionado acima, em modalidades preferenciais, os ácidos nucleicos compreendem um domínio alérgeno que inclui 5 toda a sequência de codificação de alergênico para uma proteína alergênica, mas carece da sequência de codificação para a sequência de sinais do alergênico. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos da invenção não compreendem toda a sequência 10 de codificação alergênica, mas em vez disso compreende apenas uma quantidade suficiente da sequência de codificação para que o polipeptídeo codificado, quando expressado, tem capacidade de dobrar para alcançar a estrutura tridimensional natural de pelo menos um epítopo presente no polipeptídeo. Tal como os construtos compreendem uma sequência de codificação de alérgeno 15 completa, em que menos que a sequência de codificação completa está presente, o construto de ácidos nucleicos também carece da sequência de codificação para um peptídeo de sinal de ocorrência natural para o polipeptídeo ou peptídeo alergênico.

Em modalidades preferenciais, o construto de ácido 20 nucleico compreende as sequências de codificação para múltiplas proteínas alergênicas, polipeptídeos e/ou peptídeos no domínio alérgeno. Cada alérgeno presente pode ser da mesma fonte, cada um de uma fonte diferente ou qualquer combinação dos mesmos.

Os ácidos nucleicos e, desse modo, as proteínas 25 codificadas, polipeptídeos e peptídeos da invenção podem ser usados em métodos para tratar indivíduos e, em particular, sujeitos animais que sofrem de ou potencialmente desenvolvem alergias. Em geral, um método de tratamento de acordo com a presente invenção compreende administrar um ácido nucleico da 30 invenção para um indivíduo em uma quantidade suficiente para

distribuir o ácido nucleico para uma ou mais células imunes e, de preferência, para uma ou mais células apresentadoras de antígeno (APC) do sistema imune. Uma vez distribuído, o ácido nucleico é expresso, a proteína codificada processada dentro da célula e o(s) epítopo(s) exibidos sobre a superfície da célula. O método de tratamento pode ser considerado um método de usar os ácidos nucleicos e proteínas para fornecer uma resposta imunológica profilática ou terapêutica.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 é uma representação esquemática de um ácido nucleico de acordo com uma modalidade da invenção na qual um único antígeno compreende um único epítopo é fornecido no domínio alérgeno.

A Figura 2 mostra um mapa vetor de um ácido nucleico de acordo com a invenção, no qual o domínio alérgeno compreende o alérgeno CryJ2 (um alérgeno de *C. japonica*), mas sem uma sequência de sinais, inserida entre sequências de terminal N LAMP humano (SS e ISOD) e sequências de terminal C LAMP humano (TM e TG).

A Figura 3 é uma representação esquemática de um ácido nucleico de acordo com uma modalidade alternativa da invenção, na qual múltiplas sequências de epítopo de um único alérgeno são fornecidas no domínio alérgeno.

A Figura 4 é uma representação esquemática de um ácido nucleico de acordo com uma modalidade alternativa da invenção, na qual múltiplas sequências de alérgeno diferentes são fornecidas no domínio alérgeno.

A Figura 5 mostra um mapa vetor de um ácido nucleico de acordo com a invenção no qual o domínio alérgeno compreende as sequências de alérgeno (sem peptídeos de sinal) para os

alérgenos CryJ1 (um alérgeno de *C. japonica*) e CryJ2 (um alérgeno de *C. japonica*).

A Figura 6A mostra um mapa vetor de um ácido nucleico que inclui três alérgenos de amendoim (*AraH1*, *AraH2* e *AraH3*, todos carecendo de sequências de sinais) no domínio alérgeno.

A Figura 6B mostra um desenho esquemático da proteína codificada pelo ácido nucleico da Figure 6A.

A Figura 7 mostra um mapa vetor de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção, que retrata a ausência da sequência de sinais de ocorrência natural para a sequência de alérgeno CryJ1. O construto particular é usado nos experimentos detalhados abaixo para mostrar a importância da remoção da sequência de sinais natural de sequências de alérgeno.

A Figura 8 mostra um mapa vetor de um construto de ácido nucleico não abrangido pela presente invenção, no qual o alérgeno CryJ2 é codificado em uma espinha dorsal de plasmídeo, mas na ausência dos domínios TG SS, IOS e TM. Esse construto é usado como um controle comparativo em experimentos detalhados abaixo.

A Figura 9 mostra Western blots que representam a expressão de construtos de acordo com a invenção em 293 células.

O Painel A mostra a expressão dos alérgenos combinados CryJ1-CryJ2 (consulte Figura 5) e o alérgeno CryJ2 sozinho (consulte Figura 2) em construtos de acordo com a invenção, quando testados com anticorpos anti-CryJ2. O Painel B mostra a expressão dos alérgenos combinados CryJ1-CryJ2 e do alérgeno CryJ1 (faltando sua sequência de sinais nativa; consulte Figura 7), quando testados com anticorpos anti-CryJ1. O Painel B mostra adicionalmente que a expressão do alérgeno CryJ1 não é detectável em um construto no qual a sequência de sinais natural para o alérgeno CryJ1 não é removida (mapa vetor não mostrado).

A Figura 10 mostra gráficos de linha que retratam a eficácia de construtos de ácido nucleico de acordo com a presente invenção conforme em comparação com outros construtos que compreendem sequências de alérgeno. O Painel 5 A mostra que um aumento significativo em detecção e produção de IgG1 é visto como resultado, de administração do construto LAMP de CryJ2 da invenção (consulte Figura 2) quando em comparação com um construto que compreende uma cadeia principal de plasmídeo fundida à sequência de codificação CryJ2 (consulte Figura 8). O Painel B mostra que um aumento significativo em detecção e produção de IgG2a é visto como um resultado de administração do construto LAMP de CryJ2 da invenção (como por Painel A) quando em comparação com um construto que compreende uma cadeia principal de plasmídeo fundida à sequência de codificação CryJ2 (como por Painel A).
 10
 15

A Figura 11 retratas gráficos de barra que mostram efeitos de dosagem do construto LAMP de CryJ2 em rato. O Painel A retrata detecção de IgG2a em 21 dias e 28 dias após injeção da vacina de DNA em diversas quantidades na faixa de 10 ug a 20 100 ug, em comparação à injeção de DNA vetor sozinho. O Painel B retrata detecção de IgG1 em 21 dias e 28 dias após injeção da vacina de DNA em diversas quantidades na faixa de 10 ug a 100 ug, em comparação à injeção de DNA vetor sozinho.

A Figura 12 retrata gráficos de barra que mostram o 25 efeito sobre indução de IL-4 e IFN-gama em culturas de baço de camundongo tratadas com o construto LAMP de CryJ2 da invenção em comparação ao vetor sozinho. O Painel A mostra o efeito de IL-4. O Painel B mostra o efeito de IFN-gama.

A Figura 13 retrata gráficos de linha que mostram a 30 eficácia de imunização de ratos previamente sensibilizados

com a vacina de DNA LAMP CryJ2. O Painel A mostra títulos de IgG1 ao longo do tempo. O Painel B mostra títulos de IgG2a ao longo do tempo.

A Figura 14 retrata gráficos de barra que mostram a indução de IFN- γ (Painel A) e IL-4 (Painel B) em culturas de célula de baço de camundongo.

A Figura 15 retrata um gráfico de barra que mostra quantificação de proteína CryJ2 em circulação em rato imunizado.

A Figura 16 retrata gráficos de barra de dados de cobaia que mostram a detecção de IgG1 (Painel A) e a detecção de IgG2 (Painel B) para porquinhos da índia imunizados com o construto LAMP de CryJ2 e contestado com CryJ2 recombinante.

A Figura 17 retrata um gráfico de barra que mostra a resposta anti-CryJ2 em coelhos brancos da Nova Zelândia imunizados com vacina de DNA LAMP CryJ2 durante um estudo de segurança de GLP toxicológico de 85 dias.

A Figura 18 retrata um Western blot que mostra a coexpressão de alérgenos do amendoim H1, H2, e H3 de um construto de acordo com a presente invenção.

20 Descrição detalhada de modalidades exemplificadoras

Agora, será feita referência em detalhes a diversas modalidades exemplificadoras da invenção. Entende-se que a discussão a seguir de modalidades exemplificadoras não tem como intenção limitar a invenção, conforme amplamente revelado no presente documento. Ao invés disso, a discussão a seguir é fornecida para fornecer ao leitor um entendimento mais detalhado de determinados aspectos e recursos da invenção. A prática da presente invenção emprega, exceto onde indicado em contrário, biologia molecular convencional, microbiologia e técnicas de DNA recombinante por aqueles versados na técnica.

Tais técnicas são explicadas completamente na literatura conhecida pela pessoa de habilidade comum nesses campos e, desse modo, não precisa ser detalhado no presente documento. De modo semelhante, a prática da invenção para tratamento 5 médico segue protocolos padrão conhecidos na técnica e esses protocolos não precisam ser detalhados no presente documento.

Antes que as modalidades da presente invenção sejam descritas em detalhes, deve ser entendido que a terminologia usada no presente documento tem como propósito descrever apenas 10 modalidades particulares e é não se destina a limitar. Adicionalmente, onde uma faixa de valores é fornecida, entende-se que cada valor de intervalo, até o décimo da unidade do limite inferior, a menos que o contexto claramente determine de outro modo, entre os limites superiores e inferiores daquela 15 faixa também é especificamente revelada. Cada faixa menor entre qualquer valor declarado ou valor de intervalo em uma faixa declarada e qualquer outro declarado ou valor de intervalo no qual a faixa declarada é abrangida dentro da invenção. Os limites superiores e inferiores dessas faixas menores podem 20 independentemente ser incluídos ou excluídos na faixa e cada faixa em que um, outro ou ambos os limites sejam incluídos nas faixas menores também é abrangida dentro da invenção, sujeito 25 a qualquer limite especificamente incluído na faixa declarada. Em que a faixa declarada inclui um ou ambos os limites, faixas que excluem um ou ambos daqueles limites incluídos também são 30 incluídos na invenção. Desse modo, deve ser entendido que, onde uma faixa de valores é apresentada, cada valor dentro dessa faixa e cada faixa dentro dessa faixa, também é inherentemente referida e que evitar uma menção específica de cada e todo valor e cada e toda faixa de valores possível não é uma omissão desses

valores e faixas, mas em vez disso é uma conveniência para o leitor e para a brevidade dessa revelação.

Exceto onde definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado conforme comumente compreendido pelo versado na técnica para o qual o termo pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente documento possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os materiais e métodos preferenciais são agora descritos. Todas as publicações mencionadas no presente documento são incorporados ao presente documento a título de referência para revelar e descrever os métodos e/ou materiais em conjunto com as publicações que são citadas. A presente revelação é controlada na medida em que a mesma entra em conflito com qualquer publicação incorporada.

Conforme usado no presente documento e nas reivindicações anexas, as formas singulares "uma", "um" e "o/a" incluem referências no plural a menos que o contexto claramente determine de outro modo. Desse modo, Por exemplo, a referência a "um alérgeno" inclui uma pluralidade de tais alérgenos e referência a "a amostra" inclui referência a uma ou mais amostras e equivalentes do mesmo conhecido por aqueles versados na técnica e assim por diante. Ademais, o uso de termos que podem ser descritos com o uso de termos equivalentes incluem o uso desses termos equivalentes. Desse modo, Por exemplo, o uso do termo "indivíduo" deve ser entendido para incluir os termos "animal", "ser humano" e outros termos usados na técnica para indicar um indivíduo que é submetido a um tratamento médico.

Conforme usado no presente documento, o termo "que comprehende" se destina a significar que os construtos,

composições e métodos incluem os elementos referidos e/ou etapas, mas não excluem outros elementos e/ou etapas. “Consistindo essencialmente em”, quando usado para definir construtos, composições e métodos, significa excluir outros 5 elementos e etapas de qualquer significância essencial para os referidos construtos, composições e métodos. Desse modo, uma composição consistindo essencialmente em elementos conforme definido no presente documento não exclui contaminantes de traço do método de isolamento e purificação e portadores 10 farmaceuticamente aceitável, como solução salina tamponada com fosfato, conservantes e similares. “Consiste em” significa excluir mais que elementos de traço de outros ingredientes e etapas de método substancial para a administração de composições dessa invenção. As modalidades definidas por cada um desses 15 termos de transição estão dentro do escopo dessa invenção.

Um “DNA quimérico” é um segmento identificável de DNA dentro da maior molécula de DNA que não é encontrada em associação com a maior molécula na natureza. Desse modo, quando o DNA quimérico codifica um segmento de proteína, a sequência 20 de codificação de segmento será flanqueado pelo DNA que não realiza oflanqueamento da sequência de codificação em qualquer genoma de ocorrência natural. No caso em que o DNA flanqueado codifica uma sequência de polipeptídeo, a proteína codificada é chamada de uma “proteína quimérica” (isto é, uma que tem 25 sequências de aminoácido que não têm ocorrência natural fundidos juntos). Variações alélicas ou eventos mutacionais de ocorrência natural não dão origem a um DNA quimérico ou proteína quimérica conforme definido no presente documento.

Conforme usados no presente documento, os termos 30 “polinucleotídeo” e “molécula de ácido nucleico” são usados de

forma intercambiável para se referirem a formas poliméricas de nucleotídeos de qualquer comprimento. Os polinucleotídeos podem conter desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos e/ou seus análogos. Os nucleotídeos podem ter qualquer estrutura 5 tridimensional e pode executar qualquer função, conhecida ou desconhecida. O termo "polinucleotídeo" inclui, por exemplo, moléculas helicoidais triplas, duplas ou únicas, um gene ou fragmento de gene, exons, íntrons, mRNA, tRNA, rRNA, ribozimas, moléculas anti-senso, cDNA, polinucleotídeos recombinantes, 10 polinucleotídeos ramificados, aptâmeros, plasmídios, vetores, DNA isolado de qualquer sequência, RNA isolado de qualquer sequência, sondas de ácido nucleico e iniciadores. Uma molécula de ácido nucleico também pode compreender moléculas de ácido nucleico modificadas (por exemplo., que compreende bases 15 modificadas, açúcares e/ou ligantes internucleotídicos).

Conforme usado no presente documento, o termo "peptídeo" se refere um composto de dois ou mais aminoácidos de subunidade, aminoácidos análogos ou peptidomiméticos. As subunidades podem ser unidas por ligações de peptídeo ou por outras ligações (por 20 exemplo., como ésteres, éteres e similares). O termo "peptídeo" é usado no presente documento genericamente para se referir a peptídeos (isto é, ácidos poliamínicos de 2 a cerca de 20 resíduos), polipeptídeos (isto é, peptídeos de cerca de 20 resíduos a cerca de 100 resíduos) e proteínas (isto é, peptídeos 25 que tem cerca de 100 ou mais resíduos).

Conforme usado no presente documento, o termo "aminoácido" se refere tanto a aminoácidos sintéticos quanto aminoácidos não naturais que incluem glicina e tanto isômeros ópticos D quanto L e aminoácidos análogos e peptidomiméticos. Um peptídeo de três 30 ou mais aminoácidos é comumente chamado de um oligopeptídeo da

cadeia de peptídeos que é curta. Enquanto o termo “proteína” abrange o termo “polipeptídeo”, um “polipeptídeo” pode ser menor que uma proteína de comprimento completo.

O termo “alérgeno” se refere a qualquer proteína de 5 ocorrência natural ou misturas de proteínas sobre as quais foi relatado que induzem alérgico, isto é, reações mediadas de IgE mediante sua exposição repetida a um indivíduo. Um alérgeno é qualquer composto, substância ou material que tem capacidade para evocar uma reação alérgica. Os alérgenos são usualmente 10 entendidos como uma subcategoria de抗原s, que são compostos, substâncias ou materiais com capacidade para evocar uma resposta imunológica. Para realizar a invenção, o alérgeno pode ser selecionado, dentre outras coisas, de alérgenos nativos ou naturais, alérgenos naturais modificados, 15 alérgenos sintéticos, alérgenos recombinantes, alergóides e misturas ou combinações dos mesmos. De interesse específico são os alérgenos que tem capacidade de causar uma hipersensibilidade do tipo imediata mediada por IgE.

Exemplos de alérgenos de ocorrência natural incluem 20 alérgenos de pólen (por exemplo, alérgenos de pólen de árvore, erva daninha, erva e grama), alérgenos de ácaro (de por exemplo. ácaros de poeira doméstica e ácaros de armazenamento), alérgenos de inseto (por exemplo., alérgenos de origem venosa, 25 inalantes e saliva), alérgenos animais de por exemplo. saliva, cabelo e pelo de animais (por exemplo. cachorro, gato, cavalo, rato, camundongo, etc.), alérgenos de fungo e alérgenos alimentícios. O alérgeno pode estar sob a forma de um extrato de alérgeno, um alérgeno purificado, um alérgeno modificado ou um alérgeno recombinante ou um alérgeno mutante

recombinante, um fragmento de alérgeno acima de 30 aminoácidos ou qualquer combinação dos mesmos.

Em termos de sua produto químico ou bioquímica natural, os alérgenos podem representar peptídeos ou proteínas recombinantes ou naturais, fragmentos ou versões truncadas de peptídeos ou proteínas recombinantes ou naturais, proteínas de fusão, compostos sintéticos (alérgenos de produto químico), compostos sintéticos que repetem um alérgeno ou alérgenos alterados física ou quimicamente, como alérgenos modificados por desnaturação por calor.

A classificação de um alérgeno como um alérgeno principal pode ser submetida a diversos testes. Um alérgeno é comumente classificado como um alérgeno principal se pelo menos 25% de pacientes mostram ligação de IgE forte (contagem 3) e pelo menos ligação moderada (contagem 2) de 50% dos pacientes, sendo que a ligação é determinada por uma CRIE (Rádio Imunoelétroforese Cruzada) (ligação forte de CRIE, Le., ligação de IgE visível em um filme para raios X após um dia; ligação Moderada de CRIE, Le., ligação após 3 dias; ligação fraca de CRIE, Le., ligação após 10 dias). A ligação de IgE forte de pelo menos 10% dos pacientes classifica o alérgeno como um alérgeno intermediário e claramente ligação específica de menos que 10% dos pacientes classifica o mesmo como um alérgeno menor. Outros métodos também podem ser usados para determinar a ligação de IgE de, por exemplo, blots de IgE.

Um “epítopo” é uma estrutura, usualmente produzida a partir de uma sequência de peptídeo curta ou oligossacarídeo, que é especificamente reconhecido ou especificamente ligado por um componente do sistema imunológico. Os epítópos de célula T foram, em geral, mostrados para ser oligopeptídeos

lineares. Dois epítópos correspondem um ao outro se os mesmos podem ser especificamente ligados pelo mesmo anticorpo. Dois epítópos correspondem um ao outro se ambos têm capacidade para se ligar ao mesmo receptor de célula B ou ao mesmo receptor de célula T e a ligação de um anticorpo a seu epítopo substancialmente previne a ligação pelo outro epítopo (por exemplo, menos que cerca de 30%, de preferência, menos que cerca de 20% e com mais preferência, menos que cerca de 10%, 5%, 1% ou ao redor do 0,1% das outras ligações de epítopo).

Conforme usado no presente documento, duas sequências de codificação de ácido nucleico "correspondem" uma a outra se as sequências ou suas sequências complementares codificarem as mesmas sequências de aminoácidos.

Conforme usado no presente documento, um polinucleotídeo ou região de polinucleotídeo (ou um polipeptídeo ou região de polipeptídeo) que tem uma certa porcentagem (por exemplo, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 99%) de "identidade de sequência" para outra sequência significa que, quando maximamente alinhados, manualmente ou com o uso de rotina de programas de software na técnica, aquelas porcentagens de base (ou aminoácidos) são as mesmas em comparação à duas sequências.

Duas sequências de nucleotídeos são "substancialmente homólogas" ou "substancialmente similares" quando pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75% e de preferência pelo menos cerca de 80% e, com a máxima preferência, ao menos cerca de 90 ou 95% dos nucleotídeos correspondem ao comprimento definido das

sequências de DNA. De modo similar, duas sequência de polipeptídeos são “substancialmente homólogas” ou “substancialmente similares” quando pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos 5 cerca de 66%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75% e de preferência ao menos cerca de 80% e, com a máxima preferência, ao menos cerca de 90 ou 95% ou 98% dos resíduos de aminoácidos do polipeptídeo correspondem a um comprimento definido da sequência de polipeptídeo. As sequências que são 10 substancialmente homólogas podem ser identificadas comparando-se as sequências com o uso de software padrão disponível em bancos de dados de sequência. As sequências de ácido nucleico substancialmente homólogas também podem ser 15 identificadas em um experimento de hibridização Southern mediante, por exemplo, condições estringentes conforme definido para aquele sistema particular. Definindo condições de hibridização apropriadas está dentro da competência da técnica. Por exemplo, condições estringentes podem ser: hibridização a 5xSSC e 50% de formamida a 42°C e lavagem a 20 0,1xSSC e 0,1% de dodecil sulfato de sódio a 60°C.

As “variantes modificadas de modo conservador” de sequências de domínio também podem ser fornecidas. Em relação a sequências de ácidos nucleicos particulares, o termo variantes modificadas de modo conservador se referem a aqueles 25 ácidos nucleicos que codificam sequências de aminoácidos essencialmente idênticas ou idênticas ou em que o ácido nucleico não codifica uma sequência de aminoácidos, para sequências essencialmente idênticas. Especificamente, as substituições de códon degenerado podem ser alcançadas gerando-se sequências nas 30 quais a terceira posição de um ou mais (ou todos) códons

selecionados é substituída com resíduos de dioxinosina e/ou de base misturada (Batzer, et al, 1991, Nucleic Acid Res. 19: 5081; Ohtsuka, et al, 1985, J. Biol. Chem. 260: 2605 a 2608; Rossolini et al, 1994, Mol. Cell. Probes 8: 91 a 98).

5 O termo “fragmento biologicamente ativo”, “forma biologicamente ativa”, “equivalente biologicamente ativo” e “derivado funcional” de uma proteína do tipo selvagem, significa uma substância que possui uma atividade biológica que é pelo menos substancialmente igual (por exemplo., não 10 significativamente diferente de) da atividade biológica da proteína do tipo selvagem conforme medido com o uso de um teste adequado para detectar a atividade. Por exemplo, um fragmento biologicamente ativo que compreende um domínio de diapedese é um dos quais pode colocalizar para o mesmo compartimento 15 conforme um polipeptídeo de comprimento completo compreende o domínio de diapedese.

Uma célula foi “transformada”, “transduzida” ou “transfetada” por ácidos nucleicos heterólogos ou exógenos quando tais ácidos nucleicos foram introduzidos dentro da 20 célula. A transformação de DNA pode ou não ser integrada (unida covalentemente) com DNA cromossômico produzindo o genoma da célula. Em células procariontes, de levedura e de mamífero, por exemplo, o DNA de transformação pode ser mantido em um elemento episomal, como um plasmídeo. Em uma célula eucariótica, uma 25 célula transformada de modo estável é uma na qual o DNA de transformação se torna integrado a um cromossomo de modo que o mesmo é herdado por células-filhas através de replicação de cromossomo. Essa estabilidade é demonstrada pela habilidade da célula eucariótica para estabelecer linhagens celulares ou 30 clones que compreendem uma população de células-filhas que

contém o DNA de transformação. Um “clone” é uma população de células derivadas de uma única célula ou ancestral comum por mitose. Uma “linhagem de células” é um clone de uma célula primária que tem capacidade de crescimento estável *in vitro* para muitas gerações (por exemplo, pelo menos cerca de 10).

Um “réplicon” é qualquer elemento genético (por exemplo., plasmídeo, cromossomo, vírus) que funciona como uma unidade autônoma de replicação de DNA *in vivo*.

Conforme usado no presente documento, um “vetor viral” se refere a um vírus ou partícula viral que compreende um polinucleotídeo a ser distribuído em uma célula hospedeira, tanto *in vivo*, *ex vivo* quanto *in vitro*. Exemplos de vetores virais incluem, porém, sem limitação, vetores adenovírus, vetores virais associados por adeno, vetores retrovirais e similares. Em aspectos em que a transferência de gene é mediada por um vetor adenoviral, um construto de vetor se refere ao polinucleotídeo que compreende o genoma adenovírus ou parte do mesmo e um gene não adenoviral selecionado em associação com proteínas de capsídeo adenovirais.

Conforme usado no presente documento, um “vetor de distribuição de ácido nucleico” é uma molécula de ácido nucleico que pode transportar um polinucleotídeo de interesse em uma célula. De preferência, tal vetor compreende uma sequência de codificação unida de maneira funcional a uma sequência de controle de expressão. Entretanto, uma sequência de polinucleotídeos de interesse não necessariamente compreendem uma sequência de codificação. Por exemplo, em um aspecto, uma sequência de polinucleotídeos de interesse é um aptâmero que se liga a uma molécula alvo. Em um outro aspecto, a sequência de interesse é uma sequência complementar de uma

sequência reguladora que se liga a uma sequência reguladora para inibir a regulação da sequência reguladora. Em ainda um outro aspecto, a sequência de interesse é por si só uma sequência reguladora (por exemplo, para a titulação de fatores reguladores em uma célula).

Conforme usado no presente documento, um "veículo de distribuição de ácido nucleico" é definido como qualquer molécula ou grupo de moléculas ou macromoléculas que podem transportar polinucleotídeos inseridos em uma célula hospedeira (por exemplo, como genes ou fragmento de genes, moléculas anti-senso, ribossomos, aptâmeros e similares) e que ocorre em associação com um vetor de distribuição de ácido nucleico conforme descrito acima.

Conforme usado no presente documento, "distribuição de ácido nucleico" ou "transferência de ácido nucleico" se refere à introdução de um polinucleotídeo exógeno (por exemplo, como um transgene) em uma célula hospedeira, independentemente do método usado para a introdução. O polinucleotídeo introduzido pode ser mantido transitória ou estavelmente na célula hospedeira. A manutenção estável tipicamente exige que o polinucleotídeo introduzido ou contenha uma origem de replicação compatível com a célula hospedeira ou se integre em um replicon da célula hospedeira como um replicon extracromossômico (por exemplo, um plasmídeo) ou uma cromossomo mitocondrial ou nuclear.

Conforme usado no presente documento, "expressão" se refere ao processo pelo qual polinucleotídeos são transcritos em RNA e/ou traduzidos em peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Se o polinucleotídeo é derivado de DNA genômico, a expressão pode incluir emendar do mRNA transcrito do DNA genômico.

Conforme usado no presente documento, "mediante controle transcripcional" ou "unido de maneira funcional" se refere à expressão (por exemplo, transcrição ou tradução) de uma sequência de polinucleotídeos que é controlada por uma justaposição apropriada de um elemento de controle de expressão e uma sequência de codificação. Em um aspecto, uma sequência de DNA é "unida de modo operacional" a uma sequência de controle de expressão quando a sequência de controle de expressão controla e regula a transcrição da sequência de DNA.

Conforme usado no presente documento, "sequência de codificação" é uma sequência que é transcrita e traduzida em um polipeptídeo quando colocada sob o controle de sequências de controle de expressão apropriadas. Os contornos de uma sequência de codificação são determinados por um códon inicial no terminal 5' (amino) e um códon de parada de tradução no terminal 3' (carboxila). Uma sequência de codificação pode incluir, não sem limitação a, uma sequência procariótica, cDNA de mRNA eucariótico, uma sequência de DNA genômico de DNA eucariótico (por exemplo, mamífero) e mesmo sequências de DNA sintético. Um sinal de poliadenização e a sequência de terminação de transcrição serão usualmente colocados 3' na sequência de codificação.

Conforme usado no presente documento, uma "modificação genética" se refere a qualquer adição a ou deleção ou ruptura de uma sequência de nucleotídeo normal da célula. Qualquer método que possa alcançar a modificação genética de APCs que estão dentro do espírito e escopo dessa invenção. Os métodos reconhecidos pela técnica incluem transferência de gene por mediação viral, transferência mediada por lipossoma, transformação, transfecção e transdução, por exemplo,

transferência de gene por mediação viral como o uso de vetores à base de vírus de DNA como adenovírus, vírus associado por adeno e herpes vírus, bem como vetores baseados em retroviral.

Conforme usado no presente documento, "o compartimento endossomal/lisossomal" se refere a vacúolos ácidos de ligação por membrana que contêm moléculas LAMP na membrana, enzimas hidrolíticas que funcionam em processamento de antígeno, e moléculas de classe II MHC para reconhecimento e apresentação de antígeno. Esse compartimento funciona como um sítio para degradação de materiais estranhos internalizados da superfície celular por qualquer variedade de mecanismos que incluem endocitose, fagocitose e pinocitose e de material intracelular distribuído para esse compartimento por fenômeno autolítico especializado (consulte, Por exemplo, de Duve, Eur. J. Biochem. 137: 391, 1983). O termo "endossomo" conforme usado no presente documento circunda uma lisossomo.

Conforme usado no presente documento, uma "organela relacionada a lisossomo" se refere a qualquer organela que compreenda lisossomos e inclua, não não se limite a, MIIC, CUV, melanossomas, grânulos secretores, grânulos líticos, grânulos densos de plaqueta, grânulos basofiliares, grânulos Birbeck, fagolisossomos, lisossomos secretores e similares. De preferência, tal organela carece de receptores de 6 fosfato de manose e compreende LAMP, mas pode ou não compreender uma molécula de classe II MHC. Para revisões, consulte, por exemplo, Blott e Griffiths, Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 2002; Dell'Angelica, et al, The FASEB Journal 14: 1265 a 1278, 2000.

Conforme usado no presente documento um "polipeptídeo FAMP" se refere a FAMP-1, FAMP-2, CD63/FAMP-3, DC-FAMP ou qualquer proteína de membrana associada a lisossomo ou

homólogos, ortólogos, variantes (por exemplo, variantes alélicas) e formas modificadas (por exemplo, que compreendem uma ou mais mutações, tanto as de ocorrência natural quanto as manipuladas). Em um aspecto, um polipeptídeo FAMP é uma 5 proteína de membrana de mamífero associada a lisossomo, por exemplo, como uma proteína de membrana associada a lisossomo de ser humano ou camundongo. De modo mais genérico, uma “proteína de membrana lisossomal” se refere a qualquer proteína que compreende um domínio encontrado na membrana de um 10 compartimento lisossomal/endossomal ou organela relacionada a lisossomo e que compreende adicionalmente um domínio luminal.

Conforme usado no presente documento, “direcionamento” denota a sequência de polipeptídeo que direciona uma proteína quimérica da invenção a um sítio preferencial, como uma 15 organela celular ou compartimento em que o processamento e a ligação de antígeno a MHC II ocorre. Sendo assim, um “domínio de direcionamento” se refere a uma série de aminoácidos que 20 são necessário para distribuição para uma organela/compartimento celular. De preferência, uma domínio de direcionamento é uma sequência que se liga a um adaptador ou proteína AP (por exemplo, como uma proteína AP1, AP2 ou AP3). As sequências de domínio de direcionamento exemplificativas 25 são descritas em Dell'Angelica, 2000, por exemplo.

Conforme usado no presente documento, a distribuição de ácido nucleico *in vivo*, a transferência de ácido nucleico, a 25 terapia de ácido nucleico e similares, se referem a introdução de um vetor que compreende um polinucleotídeo exógeno diretamente no corpo de um organismo, como uma ser humano ou mamífero não humano, pelo qual o polinucleotídeo exógeno é 30 introduzido em uma célula de tal organismo *in vivo*.

Conforme usado no presente documento, o termo *in situ* se refere a um tipo de distribuição de ácido nucleico *in vivo* na qual o ácido nucleico é trazido para proximidade com uma célula alvo (por exemplo, o ácido nucleico não é administrado 5 sistemicamente). Por exemplo, os métodos de distribuição *in situ* incluem, porém, sem limitação, injetar um ácido nucleico diretamente em um sítio (por exemplo, em um tecido, como um tumor ou músculo do coração), que entra em contato com o ácido nucleico com célula(s) ou tecido através de um campo cirúrgico 10 aberto ou distribuir o ácido nucleico para um sítio com o uso de um dispositivo de acesso médico como um cateter.

Conforme usado no presente documento, os termos "isolado" e "purificado" são usado em tempos de forma intercambiável para significar separados de constituintes, 15 celular e de outro modo, nos quais o polinucleotídeo, peptídeo, polipeptídeo, proteína, anticorpo ou fragmentos do mesmo são normalmente associado a na natureza. Por exemplo, em relação a um polinucleotídeo, um polinucleotídeo isolado é um que é separado das sequências 5' e 3' com as quais o mesmo é, 20 normalmente, associado ao cromossomo. Conforme é evidente para aqueles versados na técnica, um polinucleotídeo de ocorrência não natural, peptídeo, polipeptídeo, proteína, anticorpo ou fragmentos do mesmo, não exigem "isolamento" para distinguir os mesmos de sua contraparte de ocorrência natural. 25 Ademais, os termos "isolado" e "purificado" não implicam isolamento total e pureza total. Esses termos são usado para denotar tanto pureza total ou parcial de alguns quanto todas as outras substâncias naturalmente encontradas em associação com o polinucleotídeo, etc. Desse modo, esses termos podem 30 significar isolamento ou purificação de uma substância

naturalmente associada (por exemplo, isolamento ou purificação de DNA de RNA), isolamento ou purificação de outras substâncias da mesma classe geral de molécula (por exemplo, uma proteína particular que mostra 20% de pureza 5 conforme comparado a todas as proteínas em uma amostra) ou qualquer combinação. Isolamento e purificação podem significar qualquer nível de cerca de 1% a cerca de 100%, incluindo 100%. Como tal, uma população "isolada" ou "purificada" de células é substancialmente isenta de células 10 e materiais com os quais a mesma é associada na natureza. APCs substancialmente livres ou substancialmente purificados significam que pelo menos 50% da população de células são APCs, de preferência pelo menos 70%, com mais preferência pelo menos 80% e, com mais preferência ainda, pelo menos 90% livre de 15 células de não APCs com as quais os mesmos são associados na natureza. Certamente, aqueles versados na técnica irão reconhecer que todos os valores específicos, incluindo frações valores, são abrangidos dentro dessas faixas sem a necessidade por cada valor particular a ser listado no 20 presente documento. Cada valor não é especificamente revelado pela brevidade; Entretanto, o leitor deve entender que cada e todo valor específico é inherentemente apresentado e abrangido pela invenção.

Conforme usado no presente documento, uma "célula alvo" 25 ou "célula receptora" se refere a uma célula individual ou célula na qual é desejado que seja ou tenha sido uma receptora de moléculas de ácido nucleico exógenas, polinucleotídeos e/ou proteínas. O termo também se destina a incluem progênie de uma única célula e o progênie pode não ser necessariamente idêntico 30 por completo (em morfologia ou pol genômico ou complemento de

DNA total) à célula progenitora original devido à mutação natural, acidental ou deliberada. Uma célula alvo pode estar em contato com outras células (por exemplo, como em um tecido) ou pode ser encontrado circulando dentro do corpo de um organismo.

5 O termo "célula apresentadora de antígeno" ou "APC" conforme usado no presente documento se destina a qualquer célula que apresenta em sua superfície um antígeno em associação com uma molécula complexa de histocompatibilidade principal ou porção da mesma ou, alternativamente, uma ou mais 10 moléculas MHC não clássicas ou uma porção das mesmas. Exemplos de APCs adequados são discutidos em detalhes abaixo e incluem, porém, sem limitação, células completas como macrófagos, células dendríticas, células B, APCs híbridos e células apresentadoras de antígeno.

15 Conforme usado no presente documento um "célula que apresente antígeno modificado" se refere a uma célula que apresenta antígeno que tem uma porção química molecular não natural em sua superfície. Por exemplo, tal célula pode não ter naturalmente um coestimulador em sua superfície ou pode 20 ter coestimulador artificial adicional além do coestimulador natural em sua superfície ou pode expressar uma molécula de classe II não natural em sua superfície.

Conforme usado no presente documento, o termo "células efetoras imunes" se refere a células que tem capacidade para 25 ligar um antígeno e que mediam uma resposta imunológica. Essas células incluem, porém, sem limitação, células T, células B, monócitos, macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos (CTLs). Por exemplo linhas CTL, clones CTL e CTLs de tumor, inflamatório ou outras infiltrações.

Conforme usado no presente documento, os termos “indivíduo” e “paciente” são usados de forma intercambiável para indicar um animal para ao qual a presente invenção é direcionada. O termo animal deve ser entendido para incluir animais humanos e não humanos; em que uma distinção entre os dois é desejada, sendo que os termos animal humano e/ou não humano são usados. Em modalidades, o indivíduo ou paciente é um vertebrado, de preferência um mamífero, com mais preferência um ser humano. Os mamíferos incluem, porém, sem limitação, murinos, símios, seres humanos, animais de fazenda (por exemplo., bovinos, ovinos, suínos), animais utilizados para esporte (por exemplo. equinos) e animais de estimação (por exemplo, caninos e felinos).

Os sintomas de alergia de teste clínico são conhecidos por aqueles versados na técnica e uma listagem exaustiva no presente documento não é exigida. Exemplos não limitadores incluem rinite, conjuntivite, asma, urticária, eczema, que incluem reações na cobertura, olhos, nariz, vias respiratórias superiores e inferiores com sintomas comuns como vermelhidão e prurido de olhos e nariz, prurido e corrimento nasal, tosse, respiração ofegante, deficiência respiratória, prurido e inchaço de tecido.

Exemplos de “testes imunológicos *in vivo*” são Teste para Punção Cutânea (SPT), Teste de Provocação Conjuntival (CPT), Teste de Provocação Brônquica com Alérgeno (BCA) e vários testes clínicos nos quais um ou mais sintomas de alergia são monitorados. Consulte, Por exemplo, Haugaard et al, J Allergy Clin Immunol, Vol. 91, No. 3, páginas 709 a 722, March 1993.

Conforme usado no presente documento, o termo “veículo farmaceuticamente aceitável” abrange qualquer um dos veículos farmacêuticos padrão conhecidos na técnica, como uma solução

salina tamponada com fosfato, água e emulsões, como uma emulsão de água/óleo ou óleo/água e diversos tipos de agentes umectantes. As composições também podem incluir estabilizadores e conservantes. Para Exemplos de veículos, estabilizadores e 5 compostos auxiliares, consulte Martin Remington's Pharm. Sci., 15^a Edição (Mack PubL Co., Easton (1975)).

Conforme usado no presente documento, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é usada no presente documento para significar uma quantidade suficiente para prevenir, corrigir e/ou 10 normalizar uma resposta fisiológica anormal. Em um aspecto, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é uma quantidade suficiente para reduzir em pelo menos cerca de 30 por cento, com mais preferência em pelo menos 50 por cento, com a máxima preferência em pelo menos 90 por cento, um recurso clinicamente 15 significativo de patologia, como, por exemplo, tamanho de uma massa de tumor, produção de anticorpos, produção de citoquinas, febre ou contagem de leucócitos ou nível de histamina.

Um "anticorpo" é qualquer imunoglobulina, incluindo anticorpos e fragmentos dos mesmos, que liga um epítopo específico. O termo abrange anticorpos policlonais, monoclonais e quiméricos (por exemplo, anticorpos biespecíficos). Um "sítio de combinação de anticorpo" é aquela porção estrutural de uma molécula de anticorpo compreendida de cadeia leve e pesada variável e regiões hipervariáveis que especificamente ligam 20 antígeno. As moléculas de anticorpo exemplificadoras são moléculas de imunoglobina intactas, substancialmente moléculas de imunoglobina intactas e essas porções de uma molécula de imunoglobina que contém o parátopo, incluindo Fab, Fab', porções 25 F(ab')₂ e F(v), nas quais as porções são preferenciais para uso 30 nos métodos terapêuticos descritos no presente documento.

O termo “administração mucosa oral” se refere a uma via de administração em que a forma de dosagem é colocada sob a língua ou em qualquer outro lugar na cavidade oral para permitir que o ingrediente ativo entre em contato com a mucosa da cavidade bucal ou a faringe do paciente a fim de obter um efeito sistêmico ou local do ingrediente ativo. Um exemplo de uma via de administração mucosa oral é a administração sublingual. O termo “administração sublingual” se refere a uma via de administração em que uma forma de dosagem é colocada abaixo da língua a fim de obter um efeito sistêmico ou local do ingrediente ativo.

Conforme usado no presente documento, o termo “distribuição intradérmica” significa distribuição da vacina para a derme na pele. Entretanto, a vacina não necessariamente estará localizada exclusivamente na derme. A derme é a camada na cobertura localizada entre cerca de 1,0 e cerca de 2,0 mm da superfície em pele humana, mas há uma certa quantidade de variação entre indivíduos e em partes diferentes do corpo. Em geral, pode ser esperado alcançar a derme indo a 1,5 mm abaixo da superfície da pele. A derme está situada entre o estrato córneo e a epiderme na superfície e a camada subcutânea abaixo.

Dependendo do modo de distribuição, a vacina pode por fim estar localizada somente ou principalmente dentro da derme ou a mesma pode por fim ser distribuída dentro da epiderme e da derme.

Conforme usado no presente documento, o termo “prevenir” no contexto de imunoterapia de alergia, tratamento de alergia ou outros termos que descrevem uma intervenção projetada para um paciente de alergia, significa a prevenção de uma resposta de IgE em pelo menos 20% dentre todos os pacientes. O termo “prevenir” não significa prevenção total ao desenvolvimento de uma doença mediada por IgE em todos os pacientes e tal definição

está fora do escopo da presente invenção para tratar alergia permeável de um mecanismo que reduz sintomas de alergia e é inconsistente com o uso do termo na técnica. É sabido por aqueles versado na técnica que a imunoterapia de alergia para tratamentos de alergia não são 100% eficazes em 100% dos pacientes e como tal uma definição absoluta de "prevenir" não se aplica dentro do contexto da presente invenção. O conceito reconhecido pela técnica de prevenção é contemplado pela presente invenção.

A presente invenção fornece ácidos polinucleicos, poliaminoácidos e métodos de tratar indivíduos que necessitam dos ácidos polinucleicos e poliaminoácidos. Em termos gerais, os ácidos polinucleicos podem ser pensados como vacinas de ácido nucleico (por exemplo, DNA, RNA) para a produção intracelular de sequências alergênicas (poliaminoácidos) que obtém uma resposta imunológica protetora dentro do estrutura do indivíduo cujo o ácido polinucleico é administrado. Os ácidos polinucleicos, quando administrados, de preferência evocam uma resposta imunológica mediada por células através da produção e trajetória de MHC-II de anticorpos de IgG ativando-se uma resposta celular do tipo 1 (Th1) T-helper de alérgeno específico com a produção de interferons por APCs, células NK e células T em vez de uma resposta do tipo Th2, que envolve produção de anticorpos de IgE, granulócitos (por exemplo, eosinófilos) e outras substâncias. Até certo ponto, tanto uma resposta MHC-II quanto uma resposta MHC-I pode ser gerada; Entretanto, a invenção fornece uma resposta que é principal ou substancialmente uma resposta MHC-II. De preferência, os ácidos nucleicos não codificam um gene para resistência a antibióticos.

A invenção tem como base, pelo menos em parte, no reconhecimento de que em uma combinação de certa estrutura e,

desse modo funcional, os elementos fornecem propriedades vantajosas para vacinas de ácido nucleico e os alérgenos codificados permite que os métodos de tratamento de alergia satisfaçam necessidades não atendidas na técnica. Nas diversas 5 modalidades da invenção, que se destinam a ser entendidas como sozinhas como modalidades independentes e conforme as modalidades que combinam dois ou mais recursos das modalidades independentes, as combinações incluem o uso de um domínio de diapedese lisossomal para direcionar sequências de aminoácido de alérgeno para lisossomos com proteínas MHC II. A partir disso, 10 permite predominantemente uma resposta de IgG como oposta a uma resposta de IgE para as sequências de alérgeno. Além disso, as modalidades independentes ou combinações de modalidades fornecem construtos que contém um comprimento suficiente de uma 15 sequência de ácidos nucleicos para codificar uma sequência de aminoácidos que fornece uma estrutura tridimensional de ocorrência natural de um epítopo. Em modalidades preferenciais, a sequência de ácidos nucleicos fornece/codifica a sequência de codificação de alérgeno de comprimento completo, mas que 20 carece de qualquer sequência de peptídeo de sinalização de ocorrência natural associada à sequência de alérgeno. Em outras modalidades, a sequência de ácidos nucleicos codifica pelo menos uma região alergênica de um alérgeno, mas não a proteína de alérgeno de comprimento completo (e também a ausência da 25 sequência de sinais, se uma estava naturalmente presente). Embora seja reconhecido na técnica que uma resposta imunológica pode ser gerada em relação a sequência primária de um epítopo, a presente invenção reconhece que vacinas de ácido nucleico para a produção de uma resposta imunológica MHC-II para 30 epítopenos codificados de preferência usam construtos de ácido

nucleico que codificam dados de sequência suficiente para produzir uma estrutura de peptídeo tridimensional correta na região que compreende um epítopo alergênico, pelo menos no tempo quando a sequência alergênica é distribuída para um lisossomo para processamento. Enquanto não é limitada a qualquer teoria molecular particular, acredita-se que a distribuição de uma proteína apropriadamente dobrada de modo tridimensional, polipeptídeo ou peptídeo para um endossomo aprimora o processamento e a apresentação de epítopos alergênicos para uma resposta imunológica.

Como em ainda outro exemplo de uma modalidade que pode ser implantada, sozinha ou como parte de uma combinação de modalidades, a expressão de múltiplos alérgenos de um único construto é fornecido. Até a presente data, não foi mostrado que uma vacina de ácido nucleico que é protetora contra um alérgeno pode ser eficazmente produzido e usado. A presente invenção não apenas fornece uma vacina de ácido nucleico eficaz contra um alérgeno, mas fornece adicionalmente uma vacina de ácido nucleico eficaz contra múltiplos alérgenos ao mesmo tempo. O alérgenos podem ser alérgenos da mesma fonte (por exemplo, uma única planta) ou podem ser alérgenos de duas ou mais fontes (por exemplo., uma árvore, uma flor, um alimento, etc.). Como acima, as sequências de alérgeno de comprimento completo podem ser usadas (na ausência de quaisquer sequência de sinais naturalmente associados para o alérgeno) ou porções de alergênico podem ser usadas. Em construtos que compreendem múltiplas sequências de alérgeno, qualquer mistura de sequências de alérgeno truncadas ou de comprimento completo pode ser usada. Adicionalmente, como em outras modalidades, é preferencial que a sequência de sinais de ocorrência natural

para cada sequência de alérgeno seja removida (isto é, as sequências de sinais de ocorrência natural para cada sequência de alérgeno não estão presentes nos construtos).

Embora tenha-se descoberto que o uso de sequências de 5 sinais para as sequências alergênicas independentes dentro do domínio alérgeno são prejudiciais para a função do construto de ácido nucleico, foi descoberto que o uso de região de sequência de sinais ou domínio dentro dos construtos de vacina de ácido nucleico é um recurso importante. Como tal, em 10 modalidades, a vacina de ácido nucleico inclui pelo menos uma sequência de sinais dentro do domínio de sequência de sinais para direcionar o peptídeo codificado para e através de uma membrana. Embora a sequência de aminoácidos da sequência de 15 sinais possa variar de construto para construto e qualquer sequência de sinais conhecida pode ser selecionada, descobriu-se que em modalidades preferenciais, a sequência de sinais está presente e fornecida em matriz (em quadro) com uma sequência de codificação da(s) sequência(s) de alérgeno. O uso de uma única sequência de sinais é adequada para direcionar 20 toda a proteína quimérica codificada para e através de uma membrana. Como tal, as sequências de sinais para cada sequência de alérgeno não são necessário e, de fato, descobriu-se que são prejudiciais para localização apropriada, processamento e expressão de epítopos de alérgeno em 25 superfícies de célula imune.

E adicionalmente, em modalidades específicas e em combinações de modalidades, descobriu-se que o sequestro ou proteção física de sequências de alérgeno durante a transferência do polipeptídeo do citoplasma para o endossomo, 30 incluindo o tempo no endossomo antes da clivagem do

polipeptídeo em unidades para apresentação na superfície da célula, pode ser um fator importante no fornecimento de uma vacina de ácido nucleico útil de acordo com a invenção. Como tal, em geral, a invenção inclui um construto que compreende 5 um domínio estabilizante de intra-organela (IOSD) para proteger as sequências de alérgeno.

O ácido nucleico da invenção compreende pelo menos os seguintes domínios: um domínio de sequência de sinais; um domínio estabilizante de intra-organela; um domínio alérgeno 10 (que pode compreender um único alérgeno ou dois ou mais alérgenos, em que cada um compreende um ou mais epítopos alergênicos); um domínio transmembranar; e um domínio de direcionamento lisossomo/endossomo citoplasmático. Os diversos domínios estão presentes em um único ácido nucleico 15 quimérico ou manipulado. Os diversos domínios podem ser combinados em qualquer ordem linear com o uso de técnicas conhecidas e amplamente praticadas na técnica. Em modalidades preferenciais, os domínios são combinados e dispostos de modo que os mesmos compreendam uma única quadro de leitura aberto 20 que codifica uma proteína quimérica, o quadro de leitura aberto é unido de maneira funcional a elementos transcricionais suficientes para a expressão da proteína quimérica. O ácido nucleico, desse modo, pode ser um vetor de expressão, como um plasmídeo, fagemídeo, vetor viral ou similares. De preferência, 25 o ácido nucleico compreende elementos transcricionais adequados para a expressão em células de mamífero, como células humanas. Tais elementos de vetor de expressão e vetores de expressão são conhecidos e amplamente usados na técnica, conforme exemplificado pela publicação de pedido de patente US 30 no 2004/0157307, que é incorporada ao presente documento a

título de referência. Um exemplo não limitante de uma cadeia principal de plasmídeo para uso em criação de construtos de ácido nucleico de acordo com a invenção é chamado de em tempo no presente documento um plasmídeo “PITI”, sendo que a 5 sequência do qual é fornecida como SEQ ID NO: 1.

Três configurações exemplificativas do ácido nucleico da invenção são retratadas esquematicamente nas figuras 1, 3 e 4, respectivamente. A Figura 1 mostra uma disposição sequencial de domínios nos quais um único alérgeno que compreende um único 10 epítopo é incluído na proteína quimérica codificada. A Figura 3 mostra uma disposição sequencial de domínios nos quais múltiplos epítopos diferentes de um único alérgeno são incluído na proteína quimérica codificada dentro do domínio alérgeno. Os dois epítopos são disposto de modo que os mesmos estejam no 15 mesmo quadro de leitura e sejam, desse modo, produzidos como parte da proteína quimérica. O versado na técnica irá reconhecer imediatamente que três ou mais epítopos podem ser fornecidos no mesmo quadro de leitura dentro do domínio de epítopo com o uso de técnicas de biologia molecular padrão. A Figura 4 mostra 20 uma disposição sequencial de domínios na qual dois alérgenos diferentes estão presentes no domínio alérgeno. Certamente, o versado na técnica irá reconhecer que cada sequência de alérgeno pode conter um ou múltiplos epítopos alergênicos. Com base nessas três representações esquemáticas de modalidades dos 25 ácidos nucleicos da invenção, o leitor irá reconhecer imediatamente que qualquer número de alérgenos, de qualquer número de fontes e contendo qualquer número de epítopos, podem ser incluídos dentro do domínio alérgeno e podem ser unidos em matriz com o uso de técnicas de biologia molecular padrão.

A Figura 2 retrata um mapa vetor de um ácido nucleico de acordo com uma modalidade da invenção (“pITI-CRY J2-LAMP”; também chamado no presente documento em tempo de “CRYJ2-LAMP”), que se refere, de modo geral, à modalidade da invenção retratada esquematicamente na Figura 1. O vetor ou veículo de distribuição inclui uma cadeia principal de plasmídeo com uma origem de replicação pUC e várias transcrições e elementos de expressão para produção da proteína codificada. Mais especificamente, inclui a sequência da cadeira principal de pITI (SEQ ID NO:1).

Deve ser verificado que o construto de ácido nucleico não inclui um gene para resistência a antibióticos, de acordo com as modalidades preferenciais da invenção. O ácido nucleico compreende adicionalmente sequências para a proteína codificada, que compreende uma região terminal N da proteína LAMP humana, que inclui uma sequência de sinais e um domínio estabilizante de intra-organela. O ácido nucleico fornece adicionalmente sequências para a proteína codificada que compreende a sequência CryJ2 de alérgeno (na ausência de sua sequência de sinais) fundidos em matriz para a região terminal N da proteína LAMP. O ácido nucleico inclui adicionalmente sequências que codificam uma porção da região terminal C da proteína LAMP humana, que inclui uma região de membrana e uma região de direcionamento. A região de codificação para a sequência de proteína quimérica LAMP CryJ2 é fornecida como SEQ ID NO:2. A sequência de aminoácidos para a proteína quimérica LAMP CryJ2 é fornecida como SEQ ID NO:3.

Em modalidades exemplificadoras, a invenção também se refere a construtos de ácido nucleico para a distribuição e expressão de outros alérgenos de *C. japonica*, que incluem o alérgeno CryJ1. Com o uso da mesma cadeia principal de

plasmídeo, um construto LAMP pITI-CRYJ1 foi criado. A proteína quimérica pode obter uma MHC resposta imunológica do tipo MHC II. A região de codificação do construto LAMP pITI- CRYJ1 é apresentada como SEQ ID NO:4. A sequência de aminoácidos para 5 a proteína quimérica LAMP CryJ1 é fornecida como SEQ ID NO:5.

Conforme mostrado nas Figuras 3 e 4, o domínio alérgeno pode incluir um alérgeno que tem múltiplos epítulos alergênicos ou pode incluir múltiplos alérgenos (em que cada um tem um ou mais epítulos alergênicos). A Figura 5 retrata um mapa vetor 10 de uma modalidade exemplificadora particular de um construto de ácido nucleico no qual o domínio alérgeno inclui duas sequências alergênicas. Nessa modalidade exemplificadora, o domínio alérgeno contém os alérgenos CryJ1 e CryJ2 (cada um com sua ausência de sequência de sinais natural) de *C. japonica* 15 fundido em matriz e fundido na extremidade terminal N com um domínio de sequência de sinais LAMP e domínio estabilizante de intra-organela. As sequências CryJ1 a CryJ2 também são fundidas na extremidade de terminal C com um domínio transmembranar LAMP e domínio de direcionamento. A sequência de nucleotídeo 20 completa da região de codificação para a proteína quimérica é apresentada como SEQ ID NO:6. A sequência de aminoácidos completa da proteína quimérica codificada é apresentada como SEQ ID NO:7, na qual: os resíduos 1 a 27 representam a sequência de sinais para a proteína quimérica; os resíduos 28 a 380 25 representam o domínio estabilizante de intra-organela (sequência tirada de LAMP humano); os resíduos 381 e 382 representam um ligante; os resíduos 383 a 735 representam a região de codificação do CryJ1 (sem sua sequência de sinais); os resíduos 736 a 741 representam uma região ligante; os 30 resíduos 742 a 1232 representam a região de codificação para

o alérgeno CryJ2; os resíduos 1233 a 1234 representam uma região ligante; os resíduos 1235 a 1258 representam a transmembrânicas e domínio de direcionamento; e os resíduos 1259 a 1270 representam resíduos de terminal C adicionais.

5 Os construtos de ácido nucleico da invenção são essencialmente ilimitados no número de alérgenos que podem ser produzidos de modo coordenado. Como tal, dois, três, quatro, cinco, seis, dez, doze ou mais alérgenos diferentes (da mesma ou uma mistura de fontes diferentes) podem ser incluídos nos
10 construtos de ácido nucleico da invenção. A Figura 6A apresenta um mapa vetor de outro ácido nucleico exemplificador de acordo com uma modalidade da invenção. O vetor ou veículo de distribuição inclui uma cadeia principal de plasmídeo com uma origem de replicação pUC e várias transcrições e elementos de
15 expressão para produção da proteína codificada. A cadeia principal pode ser, mas não é necessariamente, a cadeira principal de pITI da SEQ ID NO:1. O ácido nucleico comprehende adicionalmente sequências para a proteína codificada, que comprehende uma região terminal N da proteína LAMP humana, que
20 inclui um domínio de sequência de sinais e um domínio estabilizante de intra-organela. O ácido nucleico fornece adicionalmente sequências para uma proteína quimérica codificada que comprehende a poliproteína de alérgeno de amendoim AraH1/AraH2/ArafB. O ácido nucleico inclui adicionalmente
25 sequências que codificam uma porção da região terminal C da proteína LAMP humana, que inclui uma região de membrana e uma região de direcionamento. A sequência de nucleotídeo para a região de codificação da proteína quimérica é fornecida como SEQ ID NO:8 A proteína quimérica codificada pelo vetor da Figura 6A
30 é apresentada esquematicamente na Figura 6B (e como SEQ ID NO:9).

Os domínios presentes nos ácidos nucleicos da invenção são descritos em maiores detalhes abaixo em relação às funções fornecidas pelas proteínas quiméricas codificadas. Deve ser entendido que a prática da invenção não é dependente de ou limitada por qualquer sequência de proteína ou de ácido nucleico particular, mas ao invés disso a mesma é uma combinação de elementos e domínios que fornecem as vantagens e propriedades para os construtos. Também deve ser entendido que a descrição relacionada aos diversos domínios do construto de ácido nucleico, quando discutida no contexto das características funcionais e físicas da proteína codificada e vice-versa. É suficiente informar uma pessoa versada na técnica das características funcionais e físicas tanto dos ácidos nucleicos quanto das proteínas. É uma questão simples com o uso de computadores e a degenerescência do código genético para chegar em toda molécula de ácidos nucleicos possível que codifica sequências de proteína conhecidas e para chegar em proteínas codificadas por ácidos nucleicos. Desse modo a referência a uma característica funcional ou física de uma sequência de proteína particular imediatamente revela para o versado na técnica todas as sequências de ácido nucleico possíveis associadas àquela característica funcional ou física e vice-versa.

Também está no âmbito da prática daqueles versados na técnica projetar e combinar duas ou mais molécula de ácido nucleicos ou sequências para chegar a uma sequência que codifica uma proteína químérica de acordo com a invenção. Do mesmo modo, está no âmbito das habilidades dos versados na técnica selecionar e combinar elementos de controle de transcrição e tradução para expressar as sequências de codificação e proteínas químéricas *in vivo* ou *in vitro* como

desejado. Consequentemente, essas técnicas comumente usadas não precisam ser discutidas em detalhes no presente documento possibilitam a prática da presente invenção.

O ácido nucleico da invenção compreende um domínio de sequência de sinais. O domínio de sequência de sinais contém uma sequência de sinais que é fornecida para inserção da proteína quimérica codificada em uma membrana biológica que define o contorno entre um ambiente externo e um ambiente interno. A sequência de sinais também direciona a transferência da proteína do ambiente externo para o ambiente interno. A estrutura geral de uma sequência de sinais é bem conhecida na técnica, conforme são diversos exemplos de sequências de sinais particulares. O praticante é livre para selecionar qualquer sequência de sinais apropriada de acordo com os vários parâmetros de seleção para cada modalidade que se encontra dentro do escopo dessa invenção. Em modalidades exemplificadoras, a sequência de sinais é uma que direciona a proteína quimérica para o retículo endoplásmico. É importante notar que nessa junção, o domínio de sequência de sinais é a apenas parte da proteína quimérica que contém uma sequência de sinais. Como tal, as sequências de sinais de ocorrência natural de alérgenos residentes no domínio alérgeno foram removidas antes da inclusão das sequências de alérgeno no construto. Descobriu-se que a remoção dessas sequências de sinais individuais aprimoraram o desempenho geral do construto *in vivo*.

O ácido nucleico da invenção compreende um domínio estabilizante de intra-organela (IOSD). O IOSD compreende uma sequência que codifica uma sequência de aminoácidos que liga, através de ligações químicas, a uma ou mais sequências no domínio alérgeno e protege essas sequências da degradação (por exemplo,

proteólise) antes da chegada da proteína quimérica no compartimento lisossomal/endossomal. Em essência, o IOSD pode ser previsto como uma tampa protetora para as sequências de domínio alérgeno, resguardando essas sequências e, em particular, sequências de epítopo alergênico, de enzimas proteolíticas, baixo pH e outras condições e substâncias que desestabilizam proteínas. O IOSD pode ser quaisquer inúmeras conhecidas ou sequências manipuladas, incluindo, mas sem limitação a, um domínio luminal de polipeptídeo LAMP e a proteína macrosialina/CD68, que é uma proteína transmembranar altamente glicolisada que é expressa em macrófagos e células do tipo macrófago como uma proteína endossomal tardia. A característica principal do IOSD é a habilidade do IOSD se ligar a e proteger o domínio alérgeno de proteólise até que a molécula de classe II MHC seja liberada do peptídeo invariante. Dessa maneira, as estruturas tridimensionais do(s) epítopo(s) alergênico(s) são preservada até que as moléculas de classe II MHCs ativas estejam disponíveis para interação. Em modalidades preferenciais, o IOSD compreende a totalidade ou parte da sequência de uma proteína lisossomal. Em algumas modalidades, o IOSD é uma proteína ou polipeptídeo além de um domínio luminal de polipeptídeo LAMP, como, mas sem limitação a, macrosialinaa/CD68.

O construto de ácido nucleico da invenção compreende um domínio alérgeno. O domínio alérgeno compreende uma ou mais sequências que codificam proteína de alérgenos, polipeptídeos ou peptídeos, que compreendem um ou mais epítopos alergênicos. O domínio alérgeno não inclui sequências de sinais dos alérgenos presentes. Diversos alérgenos proteicos são conhecidos na técnica e qualquer um ou combinação de alérgenos e/ou epítopos alergênicos pode ser usada de acordo com a

presente invenção. Em que menos que uma sequência alergênica de comprimento completo é usada, de preferência, um ou mais epítopos da proteína de alérgeno de comprimento completo são fornecidos no contexto de suas posições naturais dentro da 5 proteína alergênica. Mais especificamente, a presente invenção fornece vacinas de ácido nucleico aprimoradas, nas quais as vacinas codificam proteínas quiméricas que retêm ou retêm substancialmente sua estrutura tridimensional até que as moléculas de classe II MHCs sejam competentes para ligar 10 a epítopos nas proteínas quiméricas. Dessa maneira, uma resposta imunológica aprimorada pode ser obtida, quando comparada a distribuição para a molécula de classe II MHCs de peptídeos pequenos, que em geral irão ter ausência de estruturas tridimensionais apropriadas. Consequentemente, é 15 preferencial que o domínio alérgeno codifique sequências de aminoácido relativamente longas que incluem um ou mais epítopos, se originalmente presentes na proteína de alérgeno.

O domínio alérgeno pode incluir dois ou mais alérgenos, cada um contendo um ou mais epítopos alergênicos. Sabe-se que 20 certas proteínas alergênicas contêm dois ou mais epítopos. Como uma modalidade preferencial da invenção usa toda uma região de codificação alergênica (isto é, a região de codificação com ausência de uma sequência de sinais) ou uma porção substancial da mesma, de uma proteína alergênica, certos domínios alérgenos 25 irão incluir dois ou mais epítopos em sua relação de ocorrência natural. Alternativamente, dois ou mais epítopos conhecidos podem ser fundidos em uma região de codificação. Novamente, em modalidades exemplificadoras, duas ou mais proteínas alergênicas ou regiões alergênicas das mesmas, estão presentes 30 no domínio alérgeno. Em que dois ou mais epítopos são

manipulados para estar presentes em um único domínio de epítopo, sendo que os epítopos podem ser da mesma proteína antigênica. Alternativamente, os mesmos podem ser de duas proteínas diferentes da mesma espécie. Novamente, os mesmos podem ser da 5 mesma proteína de duas espécies diferentes. Ademais, os mesmos podem ser de duas ou mais proteínas diferentes de duas ou mais espécies diferentes. Em essência, qualquer combinação de epítopos da mesma ou de proteínas diferentes da mesma ou de espécies diferentes é contemplada por essa invenção. De modo 10 semelhante, a ordem dos vários alérgenos e epítopos pode ser variada de qualquer maneira imaginável. A mistura de proteínas alergênicas e/ou peptídeos alergênicos de múltiplas espécie permite a criação de uma vacina de ácido nucleico robusta que 15 pode fornecer tratamento para alergias para um único organismo fonte (por exemplo, espécies específicas de árvore) com base em múltiplos alérgenos, bem como tratamento para alergias para múltiplos organismos fonte (por exemplo, múltiplas plantas que liberam esporos durante a mesma estação do ano) com base em múltiplos alérgenos. A habilidade de combater múltiplas 20 alergias de uma única vacina de ácido nucleico não foi provada até a presente data.

O construto de ácido nucleico da invenção compreende adicionalmente um domínio transmembranar. Os domínios transmembranares são elementos funcionais e físicos bem 25 conhecidos e bem caracterizados de proteínas que existem parcialmente em ambos os lados de uma membrana biológica. EM essência, um domínio transmembranar é uma sequência linear de aminoácidos que são de modo geral hidrofóbico ou lipofílico na natureza e que função para ancorar uma proteína em uma membrana 30 biológica. De modo geral, tais sequências são os resíduos 20 a

25 em comprimento. Os versados na técnica estão cientes de tais sequências e podem obter facilmente ou manipular uma sequência transmembranar adequada para uso na presente invenção.

Além dos elementos discutidos acima, o ácido nucleico
 5 da invenção compreende um domínio de direcionamento. O domínio de direcionamento é uma sequência que codifica uma sequência de aminoácidos que funciona para direcionar a proteína quimérica codificada para o compartimento lisossomal/endossomal. Enquanto não tão limitado a sua
 10 identidade, em modalidades preferenciais, o domínio de direcionamento compreende a sequência de direcionamento citoplasmático de terminal C do polipeptídeo LAMP, DC- LAMP, LAMP2, LAMP-3, LIMP II, ENDOLINE ou macrosialina/CD68.

Em modalidades, o ácido nucleico da invenção compreende,
 15 como parte do domínio alérgeno, a sequência da SEQ ID NO:2 (isto é, a sequência de nucleotídeo Cry J2 com ausência de sua sequência de sinais) ou outra sequência que codifica a SEQ ID NO:3 (isto é, a sequência de proteína Cry J2 na ausência de sua sequência de sinais) no domínio alérgeno. A SEQ ID NO:2
 20 consiste em nucleotídeos que codificam a sequência completa de codificação de proteína de Cry J2, com a exceção de sua sequência de sinais (isto é, SEQ ID NO:2), uma proteína liase de pectato encontrada no pólen de *Cryptomeria japonica*. O Cry J2 é bem conhecido na técnica para ser correlacionado a
 25 alergias persistentes e sazonais em áreas em que pólen de cedro está presente. O IgE específico para Cry J2 é comumente encontrado em pacientes alérgicos em áreas próximas a sulcos de cedro. Deve ser verificado que, na Listagem de Sequência fornecida como parte da revelação da invenção, a sequência de
 30 sinais para cada alérgeno, se presente, é observada. Deve ser

entendido que, dentro do contexto dos construtos da invenção, essas sequências de sinais não estão presentes.

Em outras modalidades, o ácido nucleico compreende a sequência da SEQ ID NO:4 (isto é, a sequência de nucleotídeo 5 Cry J1, na ausência de sua sequência de sinais) ou outra sequência que codifica a SEQ ID NO:5 (isto é, a sequência de proteína Cry J2 na ausência de sua sequência de sinais). Em ainda outras modalidades, o ácido nucleico compreende a sequência de ambas as SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4 ou outras 10 sequências que codificam as SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:5, respectivamente. Em modalidades, o ácido nucleico compreende uma ou mais das outras sequências reveladas no presente documento, como essas que codificam qualquer um dos seguintes alérgenos: Cry J3 (Cry J3.8; *C. japonica*; SEQ ID NO:10; 15 sequência de sinais é de resíduos 1 a 26), CJP-4 (*C. japonica*; SEQ ID NO:11), CJP-6 (*C. japonica*; SEQ ID NO:12), CJP-8 (*C. japonica*; SEQ ID NO:13; sequência de sinais é de resíduos 1 a 35), CPA63 (*C. japonica*; SEQ ID NO: 14; sequência de sinais é de resíduos 1 a 20), CJP38 (*C. japonica*; SEQ ID NO: 15; sequência 20 de sinais é de resíduos 1 a 28), Cha o 1 (*C. obtusa*; SEQ ID NO: 16; sequência de sinais é de resíduos 1 a 21), Jun a 1 (*J. ashei*; SEQ ID NO: 17; sequência de sinais é de resíduos 1 a 21), Jun v 1 (*J. virginiana*: SEQ ID NO: 18; sequência de sinais é de resíduos 1 a 21), Cup a 1 (*H. arizonica*; SEQ ID NO: 19; sequência 25 de sinais é de resíduos 1 a 21), Jun o 1 (*J. oxycedrus*; SEQ ID NO:20; sequência de sinais é de resíduos 1 a 21), Cup s 1 (*C. sempervirens*; SEQ ID NO:21; sequência de sinais é de resíduos 1 a 21) Cha o 2 (*C. obtusa*; SEQ ID NO:22; sequência de sinais é de resíduos 1 a 22), Jun a 2 (*J. ashei*; SEQ ID NO:23; sequência 30 de sinais é de resíduos 1 a 22), Cup a 2 (*H. arizonica*; SEQ ID

NO:24), Jun a 3 (*J. ashei*; SEQ ID NO:25; sequência de sinais é de resíduos 1 a 16), Jun r 3 (*J. rigida*; SEQ ID NO:26; sequência de sinais é de resíduos 1 a 26), Cup s 3 (*C. sempervirens*; SEQ ID NO:27; sequência de sinais é de resíduos 1 a 26), Cup a 3 5 (*H. arizonica*; SEQ ID NO:28), Ch4A (*P. monticola*; SEQ ID NO:29; sequências de sinais é de resíduos 1 a 25), Ch4-1 (*P. menziesii*; SEQ ID NO:30; sequência de sinais é de resíduos 1 a 26), PT-1 (*P. taeda*; SEQ ID NO:31) e LTP (*P. abies*; SEQ ID NO:32; sequência de sinais é de resíduos 1 a 25). As sequências de aminoácidos 10 e ácido nucleicos não listadas com referência a SEQ ID NOS também estão publicamente disponíveis. É uma mera questão de implantação de programa de computador para chegar nas sequências de proteínas de acordo com a presente invenção com base nas sequências de ácidos nucleicos. Obviamente, 15 sequências bioquimicamente homólogas a essas sequências de proteínas são englobadas por essas modalidades. Por exemplo, as sequências que mostram 30% ou mais de identidade, como 40% ou mais, 50% ou mais, 75% ou mais, 90% ou mais 95% ou mais, 98% ou mais, ou 99% ou mais para as sequências reveladas são 20 englobadas por essas modalidades. Compreende-se que esse conceito se aplica não somente às sequências particulares de alérgenos revelados no presente documento, mas a todas as proteínas e sequências de ácidos nucleicos fornecidas no presente documento. Adicionalmente, conforme declarado acima, 25 cada valor dentro das faixas reveladas são compreendidos como especificamente englobados pela presente revelação.

Em um caso particular da invenção, uma vacina de DNA que 30 comprehende SEQ ID NO:2 ou outra sequência que codifica SEQ ID NO:3 dentro do domínio de alérgeno é fornecida. Quando essa vacina é administrada a um paciente para o qual existe evidência

considerável de uma alergia a cedro vermelho japonês, a vacina resulta na síntese de novo de uma proteína de fusão ou quimérica (esses termos usados de forma intercambiável no presente documento) que compreende o alérgeno Cry J2 (apresentado dentro do SEQ ID NO:3). Devido à combinação de domínios presentes na proteína quimérica, a proteína é direcionada do retículo endoplásmico na trajetória endolisossomal, resultando no processamento da proteína de fusão em epítopos em vesículas MHC, algumas das quais se tornam ligadas a moléculas de classe II de MHC, levando a uma resposta imunológica humoral acentuada.

Em outro caso da invenção, uma vacina de DNA que compreende a sequência de SEQ ID NO:4 ou outra sequência que codifica SEQ ID NO:5 dentro do domínio de alérgeno é fornecida. Quando essa vacina é administrada a um paciente para o qual existe evidência considerável de uma alergia a cedro vermelho japonês, a vacina resulta na síntese de novo de uma proteína de fusão ou quimérica (esses termos usados de forma intercambiável no presente documento) que compreende o alérgeno Cry J1 (encontrado dentro da sequência de SEQ ID NO:4). Devido à combinação de domínios presentes na proteína quimérica, a proteína é direcionada do retículo endoplásmico na trajetória endolisossomal, resultando no processamento da proteína de fusão em epítopos em vesículas MHC, algumas das quais se tornam ligadas a moléculas de classe II de MHC, levando a uma resposta imunológica humoral acentuada.

Em outro caso da invenção, uma vacina de DNA que compreende SEQ ID NO:6 dentro do domínio de alérgeno é fornecida. Quando essa vacina é administrada a um paciente para o qual existe evidência considerável de uma alergia a cedro vermelho japonês, a vacina resulta na síntese de novo de uma proteína de fusão ou quimérica (esses termos usados de forma intercambiável no

presente documento) que comprehende os alérgenos Cry J1 e Cry J2 (SEQ ID NO:7). Devido à combinação de domínios presentes na proteína quimérica, a proteína é direcionada do retículo endoplasmico na trajetória endolisossomal, resultando no processamento da proteína de fusão em epítopos em vesículas MHC, algumas das quais se tornam ligadas a moléculas de classe II de MHC, levando a uma resposta imunológica humoral acentuada.

Em outro caso da invenção, um ácido nucleico que codifica a sequência de codificação de proteína completa de Jun al, uma pectato lisase que pertence ao gênero *Juniperus ashei*, é fornecida no domínio de alérgeno. Jun a 1 demonstra um alto grau de idendidade de sequência com Cry J1 e tanto retém uma atividade enzimática semelhante a Cry J1 quanto possui uma alta semelhança em epítopos conhecidos.

Outros polipeptídeos são bem conhecidos terem reação cruzada a Cry J1 e que essa reatividade cruzada é devido a epítopos compartilhados relacionados à atividade enzimática dos peptídeos da família pectato lisase A família inclui o maior alérgeno do cipreste japonês (*Chamaecyparis obtusa* (Ch o 1)), e inclui alérgenos de: *Juniperus ashei* (Jun a 1), *Juniperus virginiana* (Jun V 1), *Cupressus arizonica* (Cup a 1), *Juniperus oxycedrus* (Jun o 1), e *Cupressus sempervirens* (Cups 1). Foi observado na literatura que existe uma forte reatividade cruzada dentre pacientes alérgicos ao pólen da família de cedro (*Cupressus*). A Tabela I, abaixo, representa uma tabela que mostra níveis de reatividade cruzada dentre proteínas relacionadas. Embora a invenção seja descrita em detalhes em relação a Cry J1 e Cry J2, deve ser compreendido que um ou mais dos alérgenos revelados no presente documento

e particularmente na Tabela I podem ser usados além de ou como alternativas às sequências de Cry J1 e Cry J2.

Tabela I: Reatividade cruzada de Cryptomeria japonica a outros alérgenos

Cryptomeria Japonica	Chao 1	Jun a 1	Jun v 1	Cupa 1	Jun o 1	Cups 1	Chao 2	Jun a 2	Cupa 2	Jun a 3	Jun r 3	Cups 3	Cupa 3
Cry J1	80%	79%	80%	75%	85%	85%							
Cry J2							74%	71%	80%				
Cry J3										86%	87%	85%	87%

5

Cryptomeria Japonica	Ch4A	Ch4-1	PT-1	LTP
CJP-4	70%	57%		
CJP-6			74%	
CJP-8				45%
CPA63				

É bem conhecido na técnica que determinados sítios para inserir uma sequência de nucleotídeos para uma região de codificação na sequência de nucleotídeos para uma região de codificação diferente (isto é, sítios de fusão) são mais favoráveis do que outros. O local da sequência de alérgeno ensinada, por exemplo, nas Figuras 1 a 5 é ensinado como o local favorável para usar a composição ensinada na presente invenção. Está dentro do escopo da invenção mover o local da sequência de alérgeno para outros locais, como dentro do domínio luminal de um polipeptídeo de LAMP ou outro domínio de estabilização intraorganelar. Entretanto, é preferencial que o alérgeno não seja colocado dentro da região de codificação de qualquer transmembrânicas ou domínio citoplasmático. Em um caso preferencial da invenção, a sequência de alérgeno é inserida no domínio luminal de um polipeptídeo de LAMP dentro de 5 aminoácidos da junção com o domínio transmembranar e até 20

aminoácidos no lado de N terminal 5' de um domínio luminal de polipeptídeo de LAMP.

O ácido nucleico da invenção pode ser fornecido como uma molécula purificada ou isolada. O ácido nucleico também pode 5 ser fornecido como parte de uma composição. A composição pode consistir essencialmente no ácido nucleico, significando que o ácido nucleico é o único ácido nucleico na composição adequado para a expressão de uma sequência de codificação. Alternativamente, a composição pode compreender um ácido 10 nucleico da invenção. Em modalidades exemplificadoras, a composição é uma composição farmacêutica que compreende o ácido nucleico da invenção junto com uma ou mais substâncias ou carreadores farmaceuticamente aceitáveis. Em algumas modalidades, a composição compreende uma substância que 15 promove a absorção do ácido nucleico por uma célula. Em algumas modalidades, a composição compreende uma molécula de direcionamento que auxilia na aplicação do ácido nucleico a um tipo de célula específico, como uma célula imune (por exemplo, e APC). Nas modalidades, o ácido nucleico é parte de 20 um veículo de aplicação ou fator de aplicação para a aplicação do ácido nucleico a uma célula ou tecido.

Em um caso particular da invenção, a composição compreende uma mistura de duas vacinas de DNA, em que uma vacina compreende a sequência de um alérgeno e em que a outra vacina 25 compreende a sequência de outro alérgeno. Os dois construtos de vacina podem ser misturados juntos em uma razão de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, sequencialmente até 1:10. A razão preferencial é 1:1.

Em um caso particular da invenção, os ácidos nucleicos de Cry J1, Cry J2, e/ou Jun a2 estão presentes dentro de um fator 30 de aplicação de ácido nucleico. Em uma modalidade preferencial

da invenção, o fator de aplicação de ácido nucleico não contém um gene de resistência a antibióticos, como o fator de aplicação de ácido nucleico ensinado pela publicação de pedido de patente U.S. número 2008/006554, ou vetores que são revelados na ou 5 resultado da publicação de pedido de patente US número 2006/003148. Em um caso particular da invenção, o ácido nucleico é um vetor viral, como um vetor adenoviral.

Os ácidos nucleicos e composições são inovadoras e úteis para reduzir reações alérgicas em pacientes. Por exemplo, os 10 ácidos nucleicos e composições são úteis na redução de polinose em pacientes com uma reação alérgica demonstrada correlacionada com o pólen de cedro vermelho japonês, ou de um pólen homólogo ou alérgeno. Como outro exemplo não-limitador, os ácidos nucleicos são úteis para reduzir alergias a alimento, como 15 alergia a amendoins ou outras frutas oleaginosas. A aplicação dos ácidos nucleicos e composições para tratar polinose do pólen de cedro vermelho japonês, de modo que os ácidos nucleicos e as composições transfetem uma célula apresentadora de antígeno, o que resulta em um aumento nos níveis séricos da imunoglobulina 20 G (IgG) específica a epítocos contidos dentro de Cry J1 e/ou Cry J2. Essa resposta é útil para a redução dos sintomas de alergia. A aplicação dos alérgenos para outras alergias, incluindo erva-de-santiago, pólenes de outra árvore, e alimentos também resulta no aumento nos níveis séricos de IgG.

25 Métodos para tratar indivíduos com necessidade também são fornecidos por esta invenção. Os métodos são métodos para tratar profilaticamente ou tratar terapeuticamente um indivíduo que sofre de ou em risco de desenvolver uma reação alérgica a um ou mais alérgenos. O método compreende administrar ao indivíduo uma 30 vacina de DNA de acordo com a invenção em uma quantidade

suficiente para causar a absorção de e expressão da vacina de DNA por um APC. A expressão da vacina de DNA resulta na apresentação do(s) epítopo(s) alergênico(s) codificado(s) no APC, e o desenvolvimento de uma resposta imunológica a IgG.

5 Em um caso particular da invenção, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, e/ou outra sequência codificadora de alérgeno são administrados a uma célula. Em modalidades preferenciais, a célula é uma célula apresentadora de antígeno, como uma célula dendrítica. De preferência, a célula dendrítica é uma célula dendrítica humana. A presente invenção pode ser administrada por métodos conhecidos na técnica por serem métodos de aplicação eficazes para vacinas de ácido nucleico, incluindo injeção intramuscular, injeção subcutâneo, eletroporação, vacinação por pistola de gene, ou transferência mediada por lipossoma.

10 Essa invenção fornece uma formulação útil para o tratamento de polinose correlacionada com pólen de cedro vermelho japonês. Foi determinado anteriormente que a aplicação de um plasmídeo de DNA que codifica a sequência de codificação de proteína de um alérgeno a um animal pode aumentar a produção de IFN-gama e reduzir a produção de IL-4, o que é útil no tratamento de animais alérgicos ao alérgeno específico. A presente invenção fornece uma composição de vacina de DNA aprimorada para tratar pacientes com uma alergia correlacionada a pólen de cedro vermelho japonês. A proteína de fusão da invenção tem um padrão de tráfego intracelular específico que cruza com vesículas de classe II de MHC, e resulta na apresentação acentuada de epítopos de alérgeno ao sistema imunológico, resultando especificamente em uma resposta de anticorpo acentuada. Os ácidos nucleicos e

composições fornecidas pela presente invenção são úteis para conduzir a imunoterapia de alergia.

A presente invenção fornece uma formulação que quando administrada a uma célula resulta em uma maior resposta de anticorpo específico. A maior resposta de anticorpo ao alérgeno é útil para tratar uma doença alérgica mediada por IgE. IgE tem determinadas propriedades relacionadas a sua restrição celular e a sinalização intracelular resultante mediante a ligação de alérgeno de cognato. IgE é gerado contra um alérgeno quando as células B recebem IL-4 secretado por células Th2. Isso ajuda a instruir as células B a produzir anticorpos de classe IgE. Mediante a secreção por células B, IgE se liga a Fc-eRI, seu receptor de alta afinidade expresso por mastócitos e eosinófilos, como resultado essas células e o animal se tornam sensíveis a futura exposição a alérgeno. Consequentemente, os sintomas de alergia podem ser acionados mediante a ingestão, inalação, ou contato mucosal com um alérgeno. Devido às propriedades de ligação dos anticorpos, foi proposto que uma forma de reduzir os sintomas de alergia é quitar o alérgeno livre disponível para ligação por IgE através da competição com outras classes de anticorpo. Em particular, uma formulação de alergia que aumenta IgG foi proposta como uma trajetória para reduzir a doença alérgica. A invenção descrita no presente documento induz a produção de IgG acentuada, causando, então, uma diminuição na razão de IgE para IgG de uma forma clinicamente significativa. Os resultados dos estudos que foram conduzidos indicam que no dia 98, o nível de IgG induzida por um construto de Cry J2-LAMP é maior do que aquele induzido pela aplicação de nucleotídeos que codificam Cry J2 não modificada.

Em outro caso da invenção, um método é ensinado para selecionar polipeptídeos de pectato lisase encontrados no pólen de uma árvore de cedro, para determinar o grau de homologia de sequência com a sequência de aminoácidos ou ácido nucleicos de um Cry J1, um pectato lisase, de modo que uma nova composição de matéria semelhante a Cry J1 possa ser gerada, e de modo que a administração da composição homóloga de matéria a um paciente produziria um resultado terapêutico útil para tratar alergias correlacionadas com o pólen de cedro.

10 Exemplos

A invenção será descrita agora com referência a modalidades exemplificadoras da invenção. Os seguintes exemplos são destinados a proporcionar ao leitor uma compreensão melhor da construção e atividade dos construtos da invenção, e não deveriam ser interpretados como uma limitação do escopo da invenção.

Exemplo 1: Materiais gerais e métodos

Imunizações e coleta de soros

Camundongos BALB/c fêmea de seis a oito semanas de idade foram adquiridos a partir da Harlan Laboratories, Frederick, Maryland e mantidos em nossa instalação de animais em Rockville, Maryland. As imunizações de DNA foram dadas ou de forma intramuscular ou intradérmica com 50 ug de DNA plasmídico em um volume de 100 ul de PBS estéril. Os soros foram obtidos pelo sangramento orbital e armazenados a - 20 °C para análise posterior. Para a sensibilização, foi injetado aos camundongos 5 ug/ml de CRYJ2 recombinante (rCRYJ2) ou CRYJ1 recombinante (rCYRJ1) juntos com 100 ul de alum (2 mg/ml) em um volume total de 200 ul. Os camundongos foram sangrados

semanalmente e os soros foram analisados quanto a anticorpos específicos de CRYJ por ELISA.

Cobaias

Porquinhos-da-índia fêmea foram adquiridos e alojados em Spring Valley Laboratories (Woodline, MD, EUA). As imunizações de DNA foram dadas de forma intramuscular com 100 ug de DNA plasmídico em um volume de 200 ul se solução salina. Os soros foram obtidos pelo sangramento cardíaco e armazenados a 20°C para análise posterior.

Detecção de respostas de imunoglobulina específica a CYRJ2

placas de imunoensaio Nunc Maxisorp foram revestidas com rCRYJ2 em uma concentração de 5 ug/ml em PBS de um dia para o outro a 4°C. Após o bloqueio com 1% de BSA em PBS, os soros foram diluídos em PBS que contém 0,05% de Tween-20 (PBS-T) adicionado e incubados por 1 hora. O IgG, IgG1, ou IgG2a ligado ao CRYJ2 imobilizado nas cavidades foi detectado com o uso de anticorpos IgG, IgG1 ou IgG2a de cabra anticomundongo conjugados de peroxidase (Jackson Laboratories). O substrato de TMB (KPL) foi adicionado e a atividade enzimática interrompida com Solução de Parada TMB. As placas foram lidas em 450 nm. Em alguns casos, a Solução de Parada Certa (Sure Stop Solution) (KPL) foi usada e as placas foram lidas em 650 nm.

Preparação de Esplenócitos para Medições de citoquina

Os baços foram removidos assepticamente e esmiuçados para preparar uma suspensão de célula única. Para o estudo da resposta primária, os esplonocitos foram cultivados em placas com 24 cavidades (4×10^5 células/cavidade) na presença ou ausência de 10 ug/ml, 5 ug/ml, ou 2,5 ug/ml de rCRYJ2 por 72 horas.

Ensaios de citoquina

Os sobrenadantes foram testados quanto a presença de IFN-gama e IL-4 por ELISA. Os pares de anticorpo correspondidos foram usados para IFN-gama e IL-4 e feitos de acordo com as instruções do fabricante. As curvas padrão foram gerados com IFN-gama e IL-4 recombinantes de camundongo. Todos os anticorpos e citoquinas foram adquiridos pela Invitrogen, Carlsbad, CA. Os limites de detecção dos ensaios de IFN-gama e IL-4 foram 20 e 10 pg/ml em respectiva.

Exemplo 2: Expressão de alérgenos de construtos

Para mostrar que os construtos de ácido nucleico da invenção podem ser usados para expressar um ou múltiplos alérgenos em células transformadas, 293 células humanas foram transfetadas com os plasmídeo de CryJ2-LAMP, plasmídeo de CryJ1+J2-LAMP (Figura 4), plasmídeo de CryJ1-LAMP, plasmídeo de CryJ1 (que carece da sequência de sinais de CryJ1; Figura 7), e o vetor de plasmídeo base sozinho (controle negativo; SEQ ID NO:1). Os resultados dos experimentos são mostrados na Figura 9.

A Figura 9A mostra os resultados das reações de transfeção, com a detecção com o uso de um anticorpo anti-CryJ2. Brevemente, trinta microgramas de lisato celular foram eletroforeados, então transferidos para uma membrana para imunoblotting. As proteínas foram detectadas pelo imunoblotting com um anticorpo monoclonal de CryJ2, seguido de quimioluminescência. Como pode ser visto a partir da Figura, os construtos que compreendem o alérgeno de CryJ2 sozinho, e os alérgenos de CryJ1+CryJ2 foram detectados (vias 2 e 3), enquanto que outros alérgenos não foram detectados. Nesse experimento, as sequências de sinais de ocorrência natural para os alérgenos de CryJ1 e CryJ2 foram removidas antes do

experimento, exceto pelo construto na raia 5. Esses resultados mostram não somente que os construtos da invenção são adequados para a expressão de alérgenos, mas também que múltiplos alérgenos podem ser coexpressos.

5 A Figura 9B mostra os resultados das reações de transfecção, com a detecção com o uso de um anticorpo anti-CryJ1. Brevemente, trinta microgramas de lisato celular foram eletroforeados, então transferidos para uma membrana para imunoblotting. As proteínas foram detectadas pelo 10 imunoblotting com um anticorpo monoclonal de CryJ1, seguido de quimioluminescência. Como pode ser visto a partir da Figura, os construtos que compreendem os alérgenos de CryJ1+CryJ2 (que carecem de sequências de sinais naturais) foram detectados 15 (raia 3), como o construto que compreendem o alérgeno de CryJ1 em que a sequência de sinais de ocorrência natural foi removida (raia 5). Entretanto, o construto em que o alérgeno de CryJ1, que incluía sua sequência de sinais natural, não foi detectado. Esses resultados mostram que os construtos da invenção são 20 adequados para a expressão e detecção de múltiplos alérgenos, e que a remoção das sequências de sinais de ocorrência natural é importante na expressão e detecção de produtos.

Exemplo 3: Dados que suportam a trajetória de processamento de MHC II para construtos

Para determinar se proteínas quiméricas produzidas a 25 partir dos construtos da invenção são processadas através da trajetória de MHC II, um conjunto de experimentos foi realizado para comprar a resposta imunológica à proteína de CryJ2 quando administrada como uma região de codificação em um plasmídeo ou como um domínio de alérgeno em um construto

de acordo com a presente invenção. Os resultados são apresentados na Figura 10, Painéis A e B.

Mais especificamente, a figura mostra a resposta específica a CryJ2 após quatro imunizações de DNA e sensibilização de extrato de pólen bruto. Grupos de camundongos (n=5) foram imunizados de forma subcutânea com DNA plasmídico de CRYJ2-FAMP ou DNA plasmídico de CRYJ2 (consulte a Figura 8) nos dias 0, 7, 14, e 21. Seis semanas (dia 77) após a última imunização de DNA, os camundongos foram sensibilizados com extrato de pólen bruto em alumínio e dados um reforçador três semanas depois (dia 91). Os dados mostram os valores gerados a partir dos soros agrupados para cada ponto no tempo. Resposta de IgG1 (Painel A) e IgG2a (Painel B) em camundongos que recebem DNA de CRYJ2-FAMP permaneceu elevada através do dia 112 e bem acima daqueles camundongos que receberam DNA plasmídico de CRYJ2 que não incluía FAMP. A aplicação dos alérgenos por meio de construtos de acordo com a invenção fornecem então uma resposta de MHC II superior do que a aplicação de alérgenos sem o contexto dos construtos da invenção.

20 Exemplo 4: Lógicas de dosagem - Comparação da resposta imunológica a doses diferentes de construtos ao vetor sozinho

A Figura 1 mostra uma resposta específica a CryJ2 após quatro imunizações de DNA em níveis diferentes de dosagem, tanto para a produção de IgG2a quanto a produção de IgG1. Foram dados a grupos de camundongos (n=5) 10 ug, 50 ug, ou 100 ug de DNA plasmídico de CRYJ2-FAMP ou DNA Vetorial de forma intramuscular nos dias 0, 7, 14, e 21. Três semanas após a última imunização de DNA, os camundongos foram sacrificados e os baços removidos para os ensaios de indução de citoquina.

Os dados mostram os valores gerados a partir dos soros agrupados para cada dose de vacina. Todas as três concentrações de DNA plasmídico de CRYJ2-LAMP tiveram respostas a IgG1 e IgG2a, com a dose de 50 ug parecendo ter dado a maior resposta de 5 anticorpo. O vetor sozinho, em qualquer uma das concentrações, não induziu qualquer resposta de anticorpos. Esses dados mostram que existe uma resposta dependente de dose para invocar uma resposta imunológica, e que a resposta imunológica é, ao menos em parte, uma resposta do tipo MHC II.

10 Exemplo 5: Dados adicionais que mostram uma resposta imunológica por meio da trajetória de MHC II

Nesse conjunto de experimentos, a secreção de citoquinas em sobrenadantes de células de baço estimulado foi determinada com o uso de IL-4 e IFN-gama como marcadores. 15 Especificamente, as células de baço de camundongos (n=3) foram colhidas no dia 42 e cultivadas na presença de 10 ug/ml, 5 ug/ml, 2,5 ug/ml, ou sem rCRYJ2. As células de baço de camundongos puros foram usadas como um controle negativo. Os níveis de IF-4 e IFN-gama de esplenócitos estimulados com rCRYJ2 foram 20 medidos por EFISA em pg/ml.

Os dados são apresentados na Figura 12, Painéis A e B. Os dados mostram que os camundongos que recebem 50 ug de DNA plasmídico de CRYJ2-FAMP tiveram uma expressão significativamente maior de IFN-gama (um biomarcador estabelecido para a ativação da trajetória de resposta imunológica MHC II) do que aqueles que recebem a dose inferior de DNA plasmídico. Houve uma resposta muito pequena vista dos níveis de IF-4 em qualquer um dos grupos, um biomarcador estabelecido para a trajetória de MHC I. Também houve uma 25 resposta muito pequena, se qualquer, com IF-5 (dados não 30 respondem).

mostrados). Esses resultados indicam que a imunização de DNA de Cry J2-FAMP induziu o recrutamento de célula de memória Th1 e não células Th2, conforme indicado pela produção de IFN-gama e não IF-4 após a estimulação com a proteína de Cry J2 recombinante.

5 Exemplo 6: Estudos sobre o efeito terapêutico da imunização com Vacina de DNA de CryJ2-FAMP em camundongos sensibilizados anteriormente com CryJ2

Para estudar os efeitos terapêuticos da vacina de DNA-FAMP-CryJ2, grupos de camundongos (n=5) foram sensibilizados com três injeções de 5 ug de proteína recombinante de rCRYJ2 e quatro semanas depois, tratados com quatro injeções de DNA plasmídico de CRYJ2-FAMP dado em intervalos semanais (7 dias). As imunizações de DNA induziram um efeito reforçador para IgG2a e um aumento temporário para os anticorpos de IgG1 indicando um efeito modulador direcionado a Th1 da vacina de DNA. Duas imunizações de DNA adicionais nos dias 167 e 174 reforçaram a resposta de IgG2a específica a CRYJ2 e quase nenhuma mudança na resposta de IgG1. A exameção visual dos camundongos revelou a inexistência de aflição física ou reações na pele. Também não houveram mudanças no apetite e não pareciam letárgicos. Os efeitos sobre os títulos de IgG1 e IgG2a são mostrados na Figura 13, Painéis A e B, respectivamente.

Exemplo 7: Indução de IFN-gama e IL-4 em culturas de célula de baço de camundongo

25 O efeito terapêutico da vacina de DNA de CryJ2-LAMP também foi estudada no que se refere a indução de citoquina. As células de baço dos camundongos (n=3) foram colhidas no dia 183 e estimuladas com concentrações diferentes de rCRYJ2. As células de baço de camundongos puros foram usadas como um controle negativo. Os níveis de IL-4 e IFN-gama dos esplenócitos

estimulados com rCRYJ2 foram medidos por ELISA em pg/ml. A expressão significativamente elevada de IFN-gama foi detectada no grupo vacinado com CRYJ2-LAMP em comparação àquele no grupo vetor. Entretanto, a expressão de IL-4 não mostrou diferença do 5 grupo vetor. O aumento em IFN-gama como um resultado da imunização de DNA de Cry 12-LAMP presumivelmente envolve o recrutamento de células Th1 específicas a antígeno e a criação de um meio de citoquina de Th1. Os dados obtidos a partir deste experimento são apresentados na Figura 14, Painéis A e B.

10 Exemplo 8: Detecção de proteína de CryJ2 em circulação nos soros

Os camundongos foram imunizados com proteína de Cry J2, pDNA-Cry J2 (sem LAMP) e Cry 12-LAMP-vax. As amostras de soro foram tomadas nos dias 0, 1, 2, 3, 4, e 7 e avaliadas quanto 15 à presença de proteína de Cry J2 livre em um imunoensaio do tipo sanduíche sensível. Cry J2 livre foi detectada na proteína e imunização sem LAMP. Entretanto, nenhum alérgeno livre foi detectado em qualquer ponto no tempo em qualquer 20 experimento com camundongos imunizados com Cry J2-LAMP-vax (nível detectável mínimo de 2 ng/ml). Os dados que suportam essas declarações são fornecidos na Figura 12.

As vacinas de LAMP de acordo com a invenção serão as únicas formulações que tratam alergias sem introduzir alérgeno livre 25 no paciente sistemicamente. Isso é o contrário da imunoterapia tradicional que pode algumas vezes resultado em reações anafiláticas devido à introdução sistêmica de alérgeno. Esse experimento mostra que os camundongos que receberam o plasmídeo 30 de DNA de Cry J2-LAMP não tiveram proteína de Cry J2 livre e portanto não liberada na circulação sistêmica como visco com os camundongos dados a proteína sozinha ou DNA de Cry J2 sem LAMP.

Exemplo 9: Eficácia das vacinas de DNA em porquinhos-da-índia

Para expandir a compreensão científica da função dos presentes construtos de ácido nucleico em outros mamíferos, os estudos foram realizados em Porquinhos-da-índia fêmeas imunizadas com a vacina de DNA de CryJ2-LAMP, então desafiado com proteína de CRYJ2 recombinante. Os resultados dos estudos são mostrados na Figura 16, Painéis A e B.

Especificamente, Porquinhos-da-índia fêmeas receberam 10 injeções intramusculares de 100 ug de Vacina de DNA de CRYJ2-LAMP ou vetor sozinho nos dias 0, 7, e 14. Quatro semanas após a última imunização com vacina de DNA no dia 14, os Porquinhos-da-índia receberam injeções subcutâneas de 15 10 ug/ml de proteína de rCRYJ2/alume nos dias 42 e 49. As amostras de soro foram obtidas de Porquinhos-da-índia no dias 0, 21, 35, 63, e 77. Os dados mostram que os valores de absorbância média para os Porquinhos-da-índia que recebem DNA de CRYJ2-LAMP aumentou através do dia 35 para IgG2 com pouca ou sem resposta de IgG1. O aumento em IgG2a é consistente com 20 o que é tipicamente visto em uma resposta forçada a Th1.

Exemplo 10: Investigação adicional em outros mamíferos – Dados de toxicologia que mostram segurança

Os coelhos brancos da Nova Zelândia receberam injeções intramusculares de 4,128 mg de DNA de CRYJ2- LAMP. Os coelhos de controle correspondidos em gênero e idade receberam somente solução salina. Os coelhos foram imunizadas nos dias 1, 14, 25 28, 42, e 56. As amostras de soro foram obtidas de coelhos nos dias 1, 14, 28, 42, 56, 58, e 85. Os valores de absorbância médios de soro de coelho em 1:100 após múltiplas injeções de 30 IM de plasmídeo de CryJ2-LAMP ou solução salina são mostrados

na Figura 17. Como pode ser visto a partir da Figura, os dados mostram que os valores de absorbância médios para os coelhos que recebem solução salina são menores do que 0,100. Os valores de absorbância de coelhos nos grupos tratados com DNA de CRYJ2-LAMP geralmente aumentado através do dia 42 e em alguns casos aumentado através do dia 85.

Exemplo 11: Aplicabilidade para alergias a alimento

Ao longo dos últimos 25 anos, 8 alérgenos de amendoim significativos foram identificados com base na sensibilização em pacientes alérgicos a amendoim. Três alérgenos de amendoim principais são os mais comumente reconhecidos por IgE de indivíduos alérgicos a amendoim: 65 a 100% reconhecem Ara h1, uma proteína da família vicilina de armazenamento de semente de 63,5 kDa; 71 a 100% reconhecem Ara h2, uma proteína da família conglutina de armazenamento de semente de 17 kDa; e 45 a 95% reconhecem Ara h3, uma proteína da família glicinina de armazenamento de semente de 14 kDa. Além de ser um agente causativo comum no acionamento de reações alérgicas dependente de amendoim e anafilaxia, essas três proteína também parecem promover reações alérgicas mais fortes. O direcionamento desses alérgenos como a base para a imunoterapia de alergia de amendoim tem o potencial de fornecer a proteção mais ampla dentre a diversa população de alergias a amendoim. Os testes clínicos de fase I estão atualmente em curso os quais usam formas de hipoalergênico dos três maiores alérgenos e um adjuvante de bactéria eliminado por calor como imunoterapia de alergia. Esse teste está em andamento, mas a eventual comercialização dessa terapia será um desafio devido a um processo de fabricação altamente complexo.

Para lidar com a incidência ascendente de alergias a alimento, e em particular alergia a amendoim, um construto de

ácido nucleico de acordo com a invenção foi criado. O construto é representado na Figura 6A, e um esquemático da proteína quimérica codificada é representada na Figura 6B, conforme discutido acima. Esse construto pode ser usado para gerar uma 5 resposta predominantemente do tipo MHC II em indivíduos aos quais é administrado. A presença dos três alérgenos mais comuns em uma única proteína quimérica permite uma imunização ampla, que tratará a vasta maioria de alergias a amendoim na população.

O construto foi expresso e os resultados mostrados na 10 Figura 18. A Figura 19 mostra que todos os três alérgenos podem ser expresso e detectados como uma única poliproteína em Western blots.

Será aparente para aqueles versados na técnica que 15 várias modificações e variações podem ser feitas na prática da presente invenção e na construção dos construtos de ácido nucleico sem sair do escopo ou espírito da invenção. Outras modalidades da invenção serão aparentes àqueles indivíduos versados na técnica a partir da consideração do relatório descritivo e prática da invenção. Pretende-se o relatório 20 descritivo e exemplos sejam considerados somente como exemplificadores, com um escopo real e espírito da invenção sendo indicados pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Mólecula de ácido nucleico isolado ou purificado que codifica uma proteína quimérica **caracterizada** por consistir na SEQ ID NO: 2.

5 2. Mólecula de ácido nucleico isolado ou purificado que codifica uma proteína quimérica **caracterizada** por consistir na SEQ ID NO: 4.

3. Mólecula de ácido nucleico isolado ou purificado que codifica uma proteína quimérica **caracterizada** por consistir
10 na SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4.

4. Mólecula de ácido nucleico isolado ou purificado que codifica uma proteína quimérica **caracterizada** por consistir na SEQ ID NO: 6.

5. Mólecula de ácido nucleico isolado ou purificado que codifica uma proteína quimérica **caracterizada** por consistir
15 na SEQ ID NO: 8.

6. Molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica evoca, preferencialmente, uma resposta imune mediada por células pela via do MHC-II, ativando uma resposta celular do tipo 1 (Th1) T-helper de alérgeno específico, em vez de uma resposta do tipo Th2.

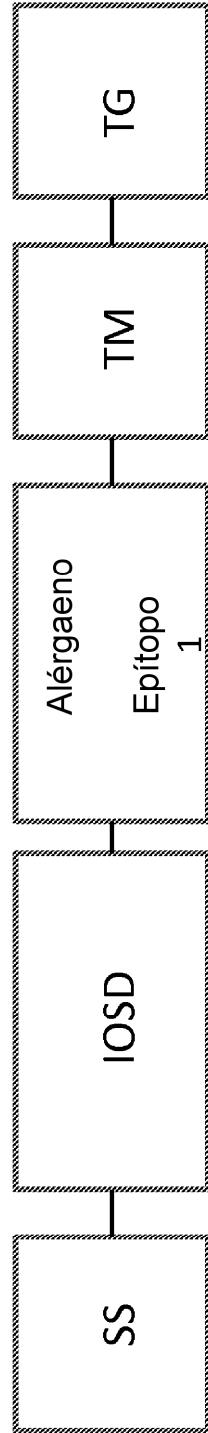
7. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 codifica a proteína quimérica CRY J2-LAMP de SEQ ID NO: 3.

8. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4 codifica a proteína quimérica
30 CRY J1-LAMP de SEQ ID NO: 5.

9. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo fato de que a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6 codifica a proteína quimérica Cry J1/Cry J2-LAMP de SEQ ID NO: 7.

5 10. Molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** pelo fato de que a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8 codifica a proteína quimérica AraH-LAMP de SEQ ID NO: 9.

Fig. 1



SS = sequência de sinais

IOSD = domínio de
estabilização intraorganelas

TM = transmembrânicas

TG = direcionamento

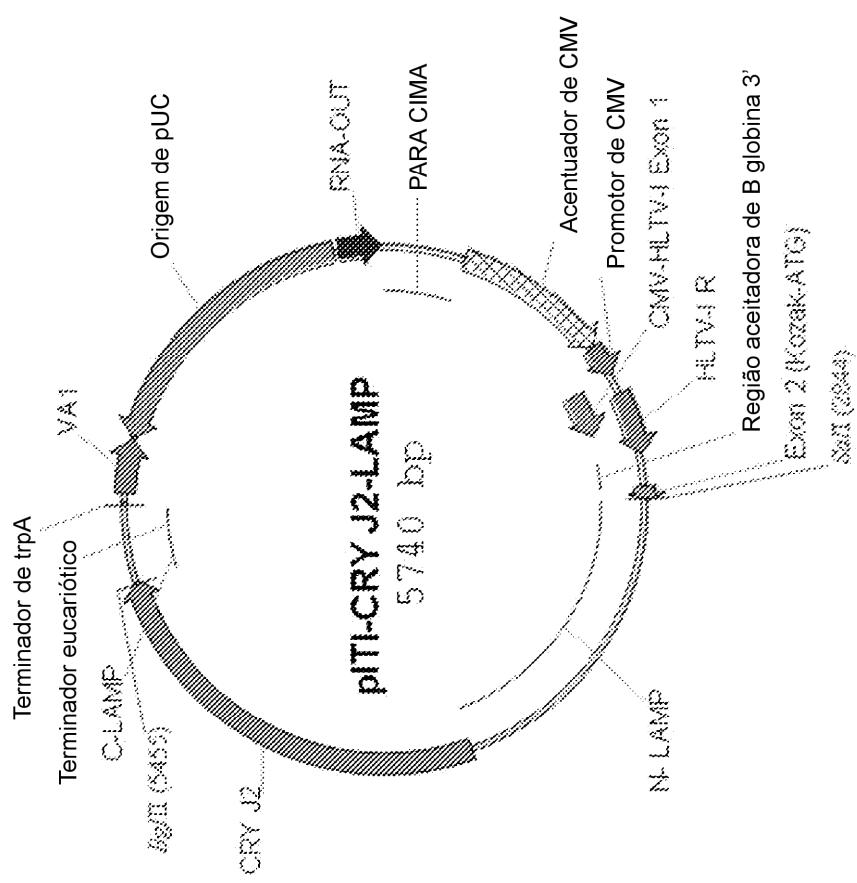
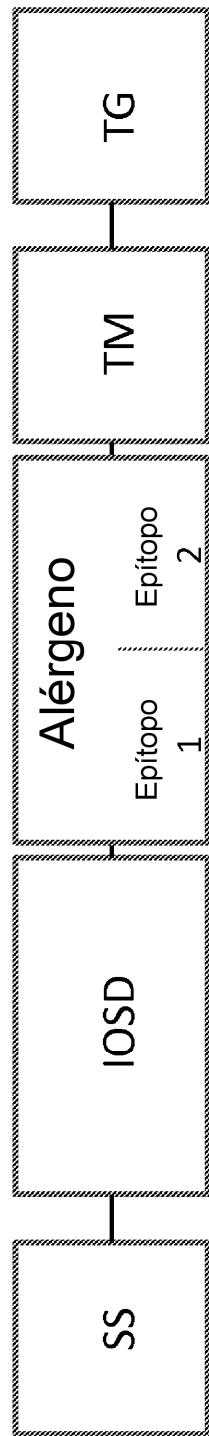
Fig. 2

Fig. 3

SS = sequência de sinais

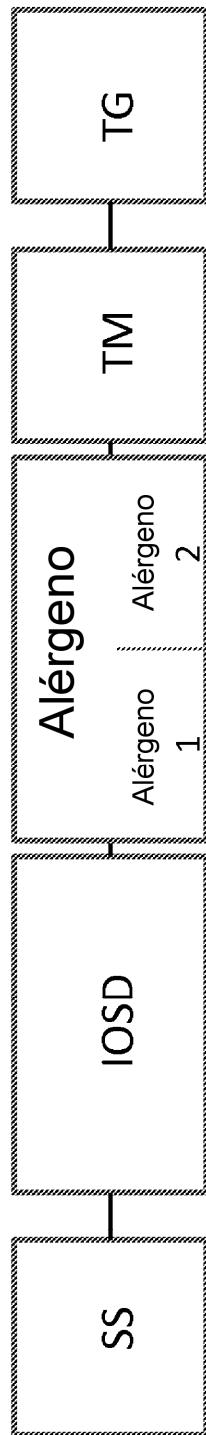
IOSD = domínio de estabilização intraorganelar

Múltiplos epitópos de alérgeno

TM = transmembrânicas

TG = direcionamento

Fig. 4



SS = sequência de sinais

IOSD = domínio de estabilização intraorganelar

Múltiplos epitópos de alérgeno

TM = transmembrañicas

TG = direcionamento

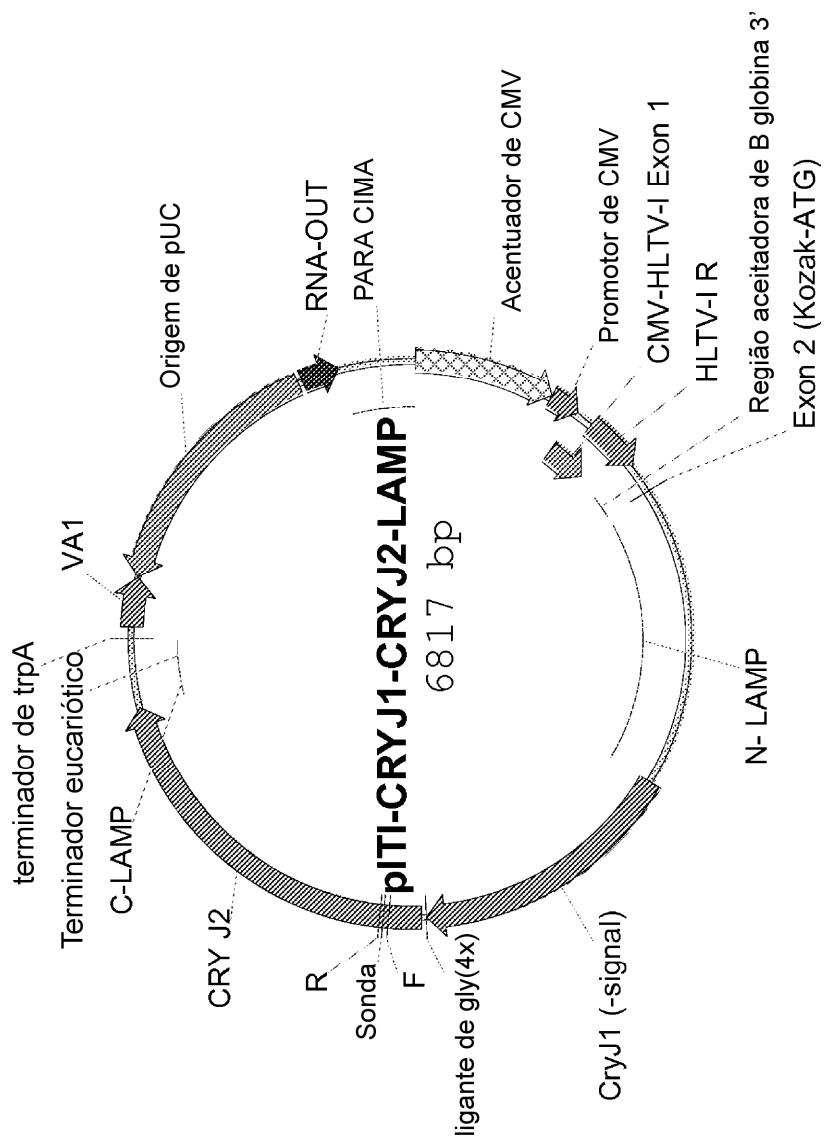
Fig. 5

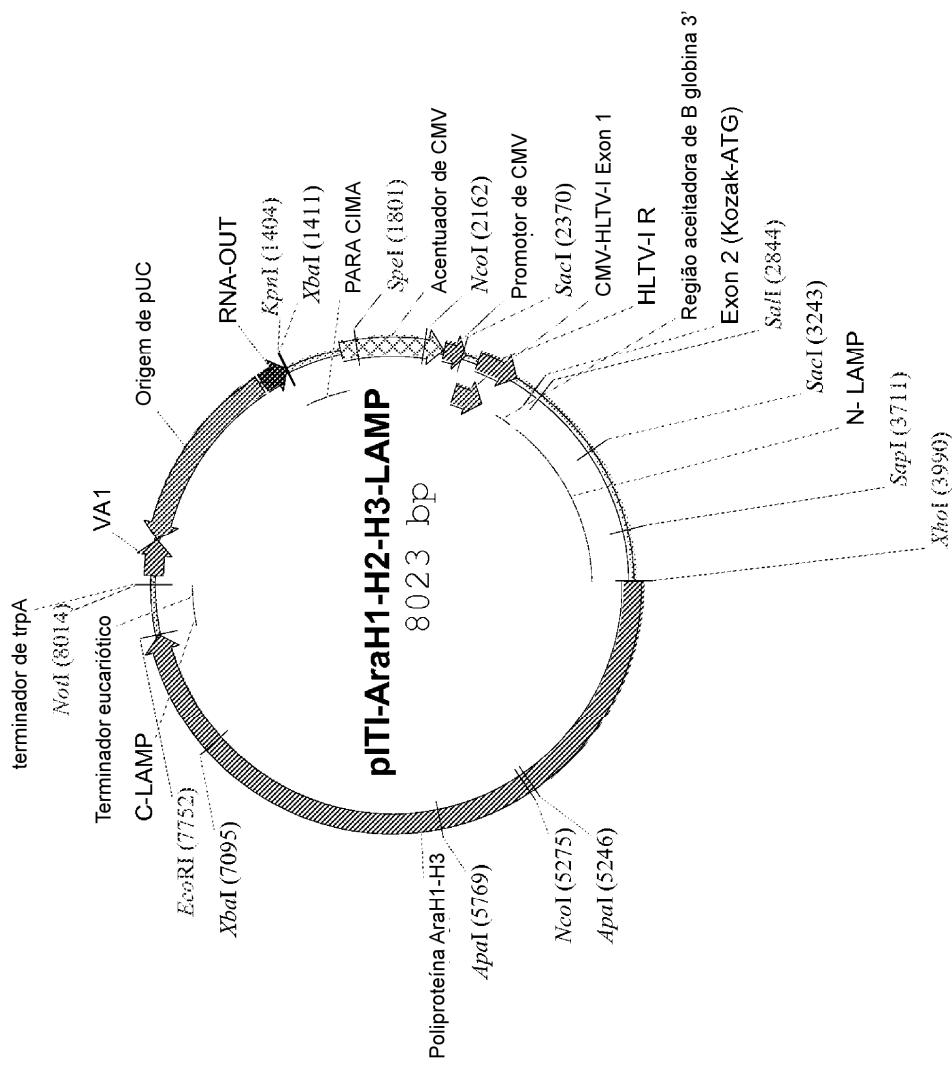
Fig. 6A

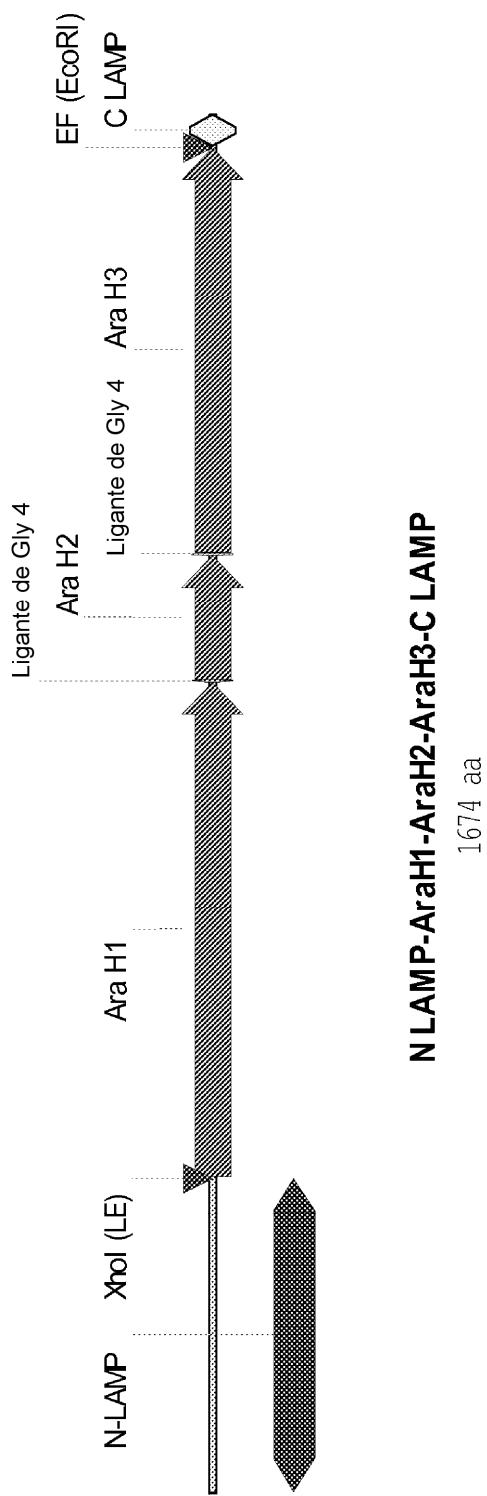
Fig. 6B

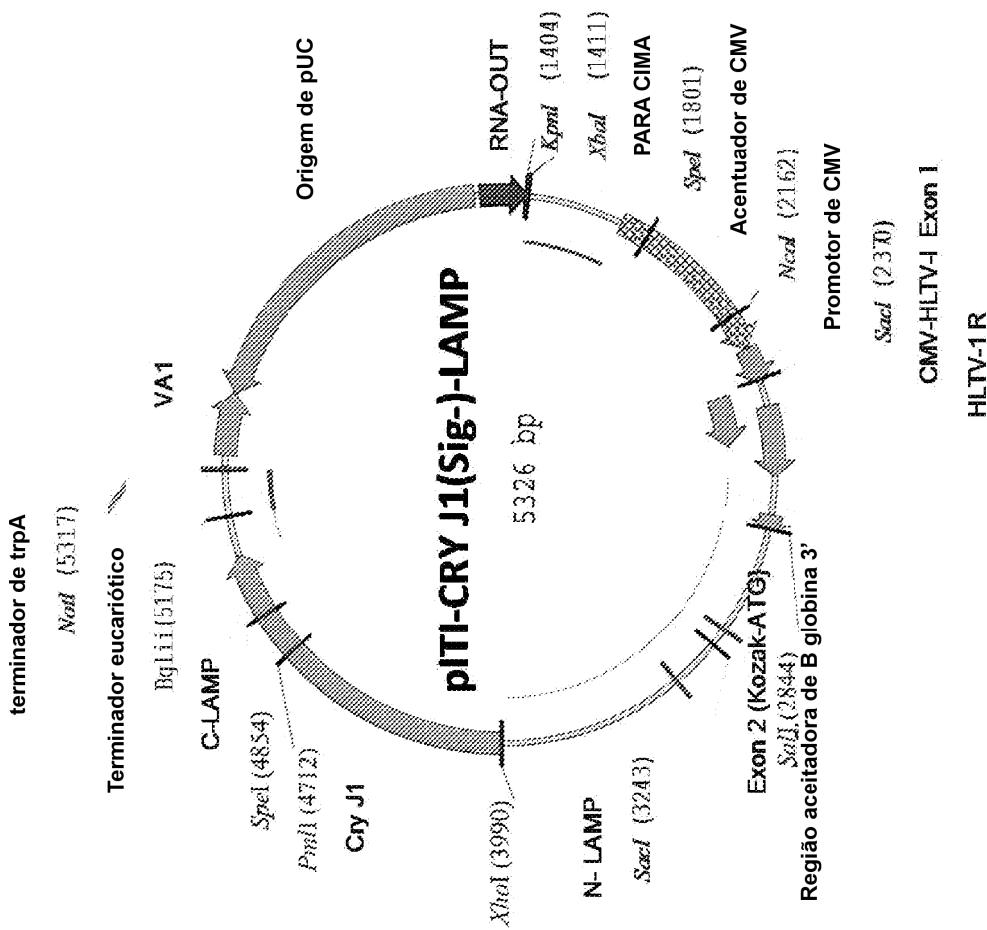
Fig. 7

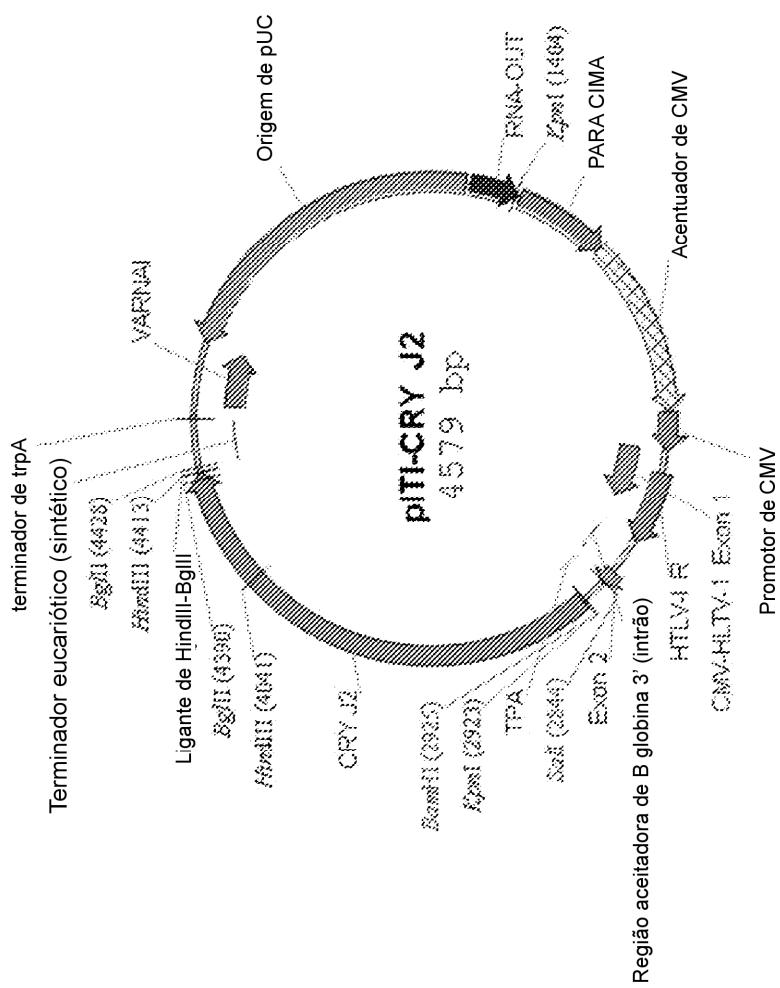
Fig. 8

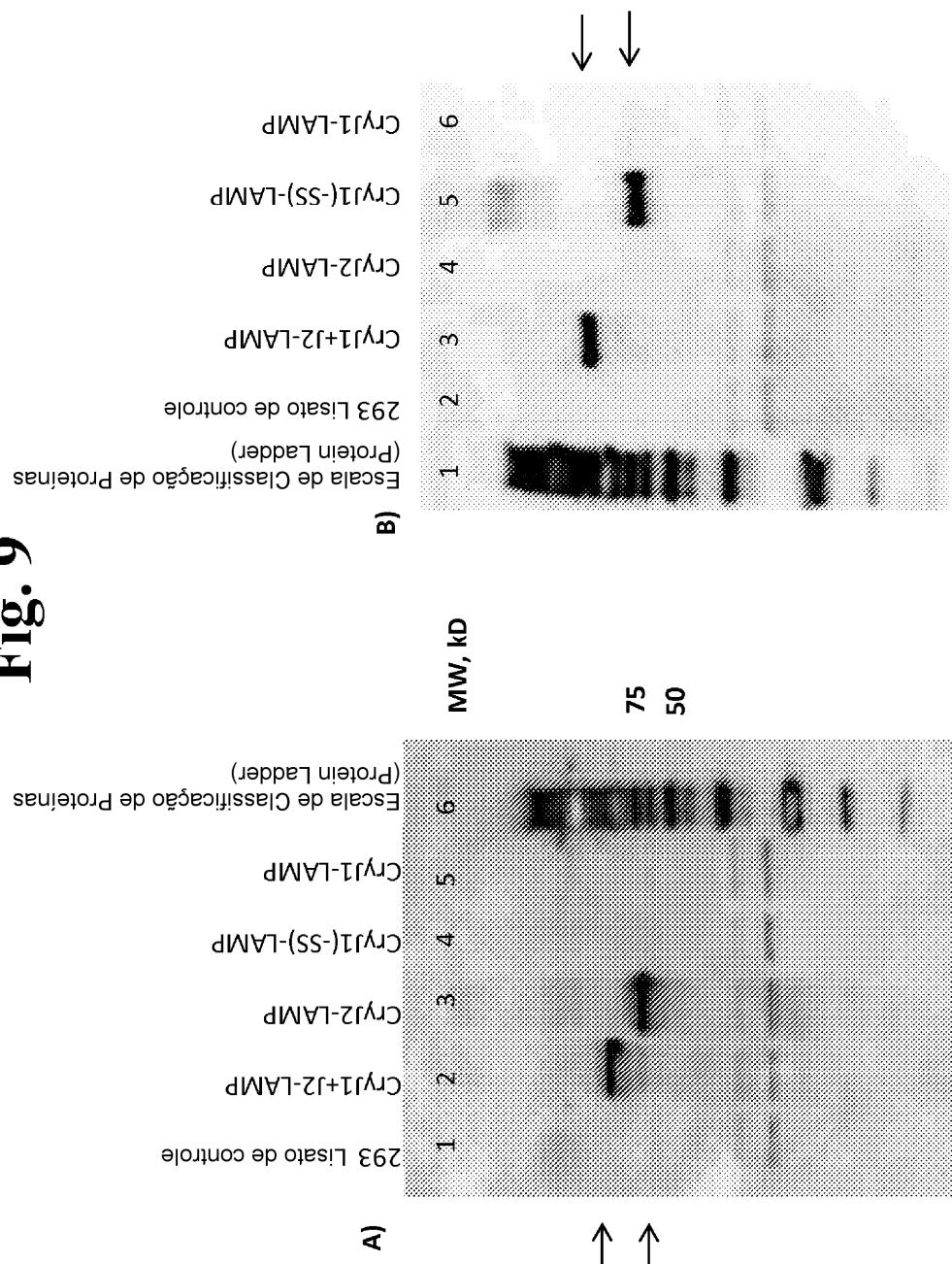
Fig. 9

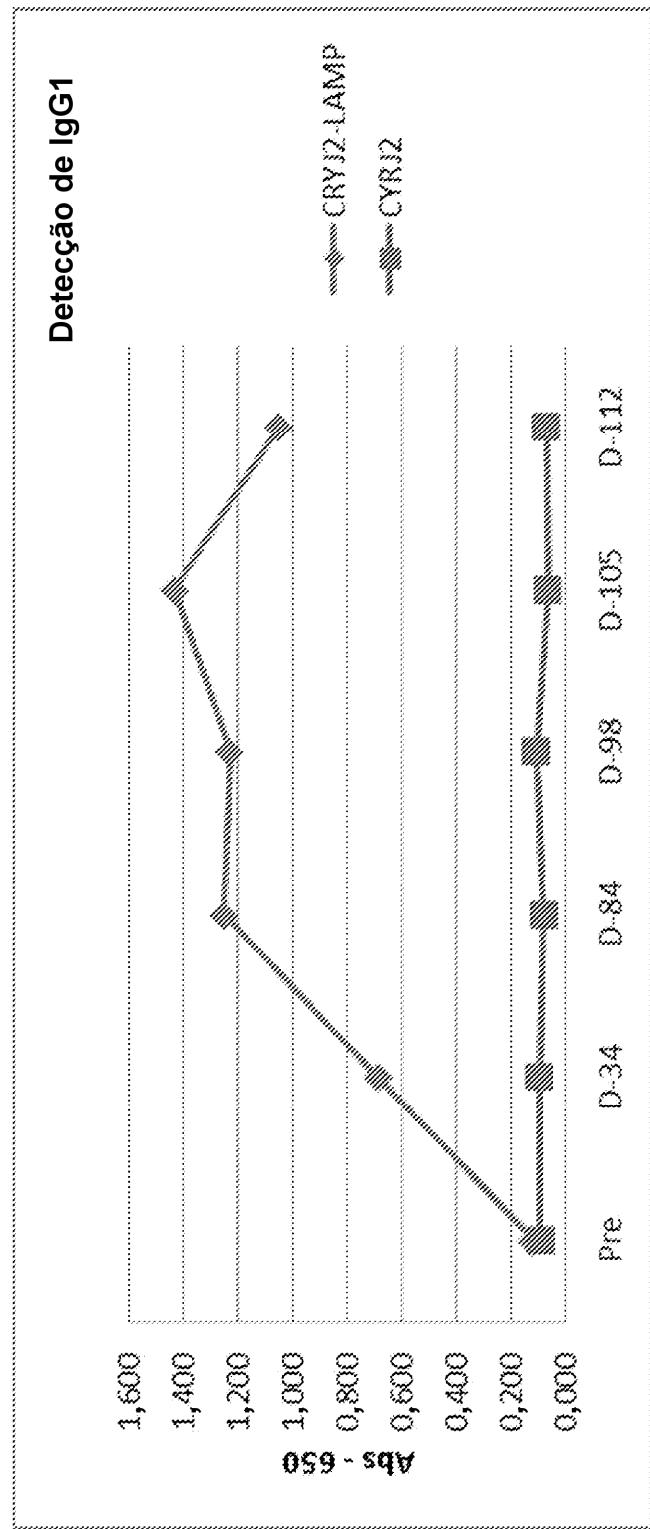
Fig. 10A

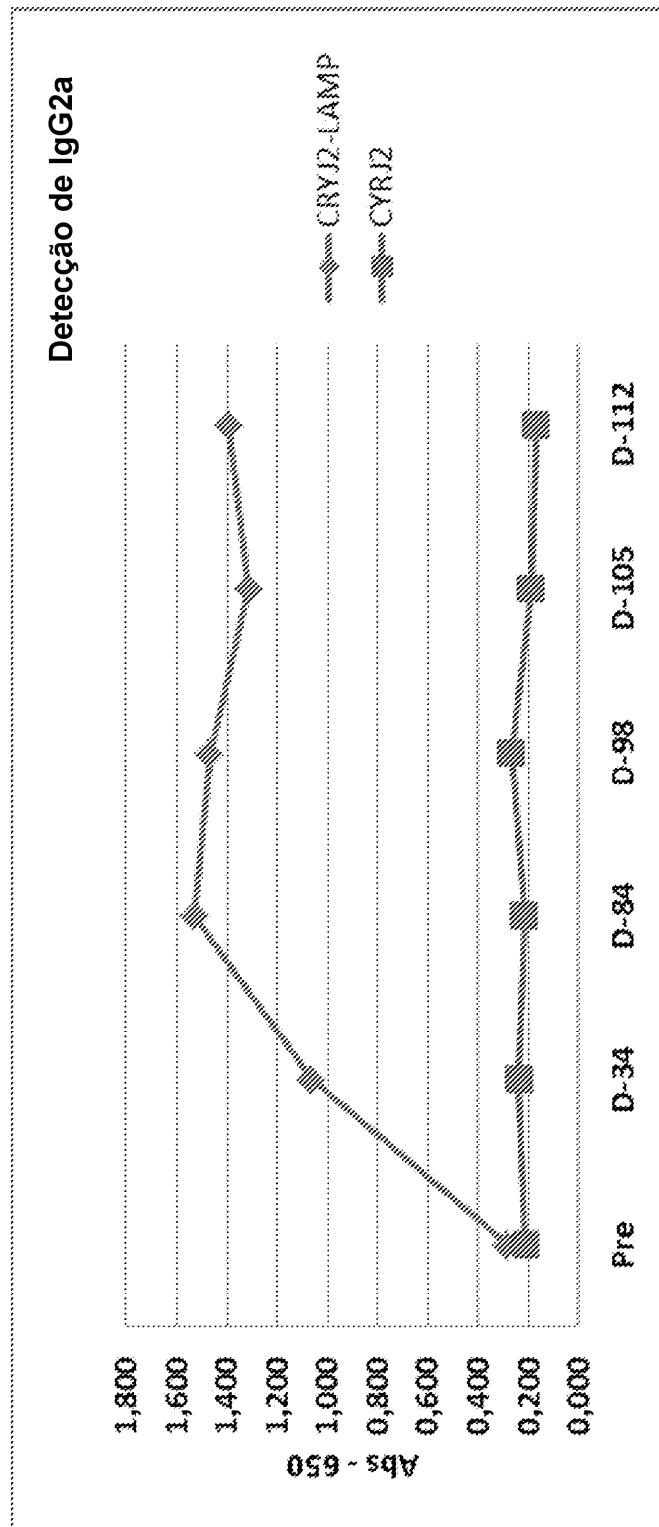
Fig. 10B

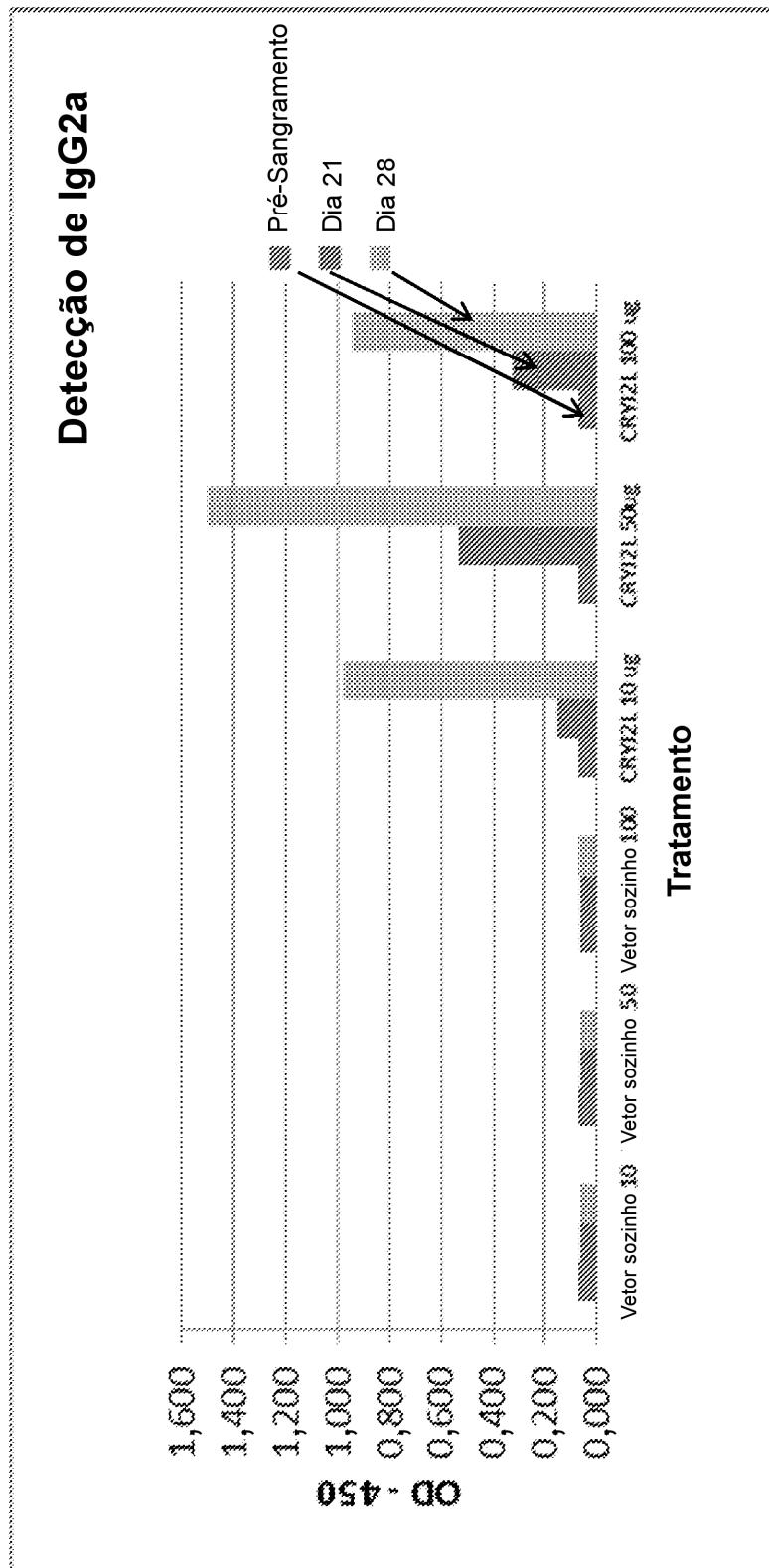
Fig. 11A

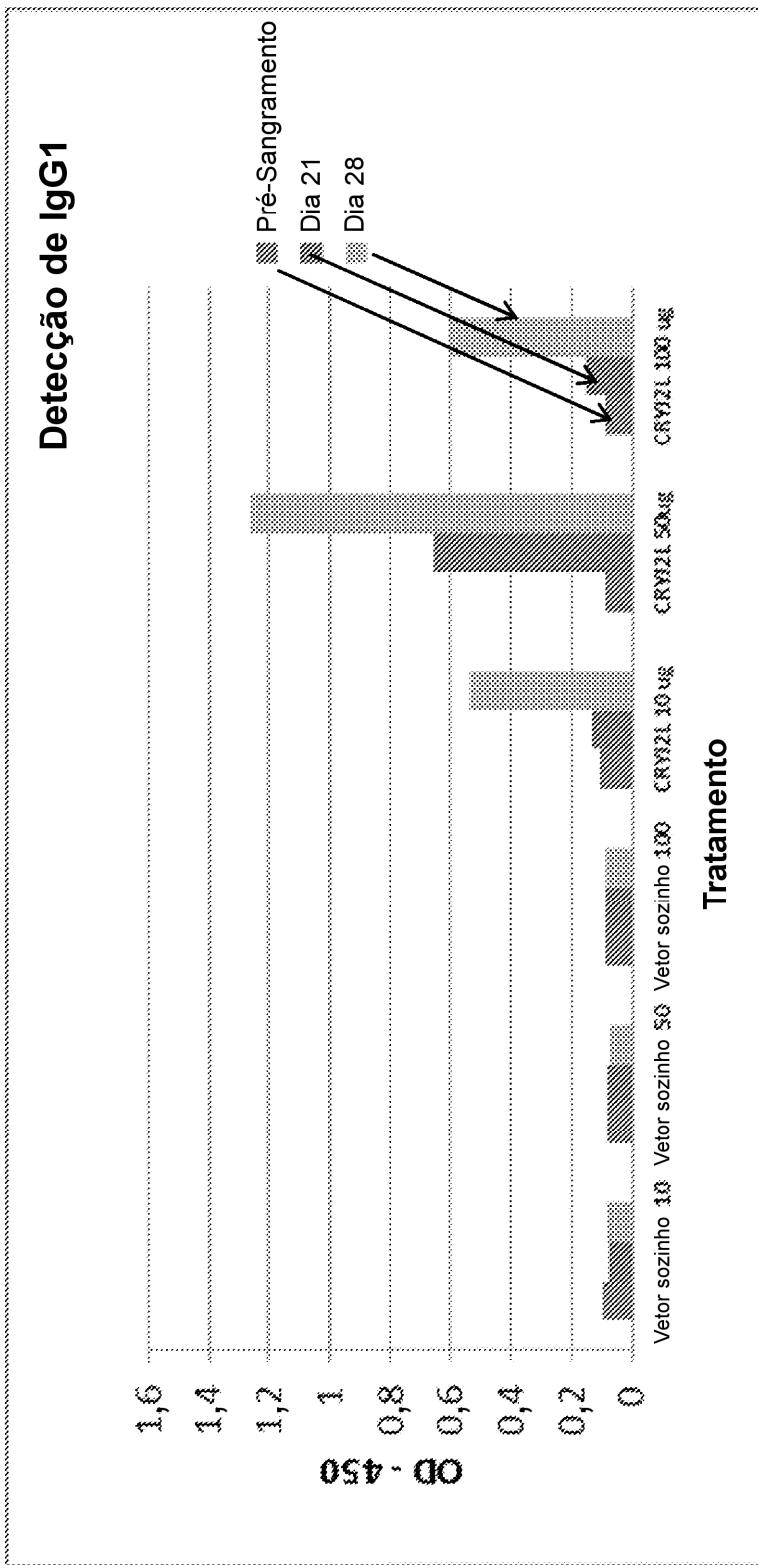
Fig. 11B

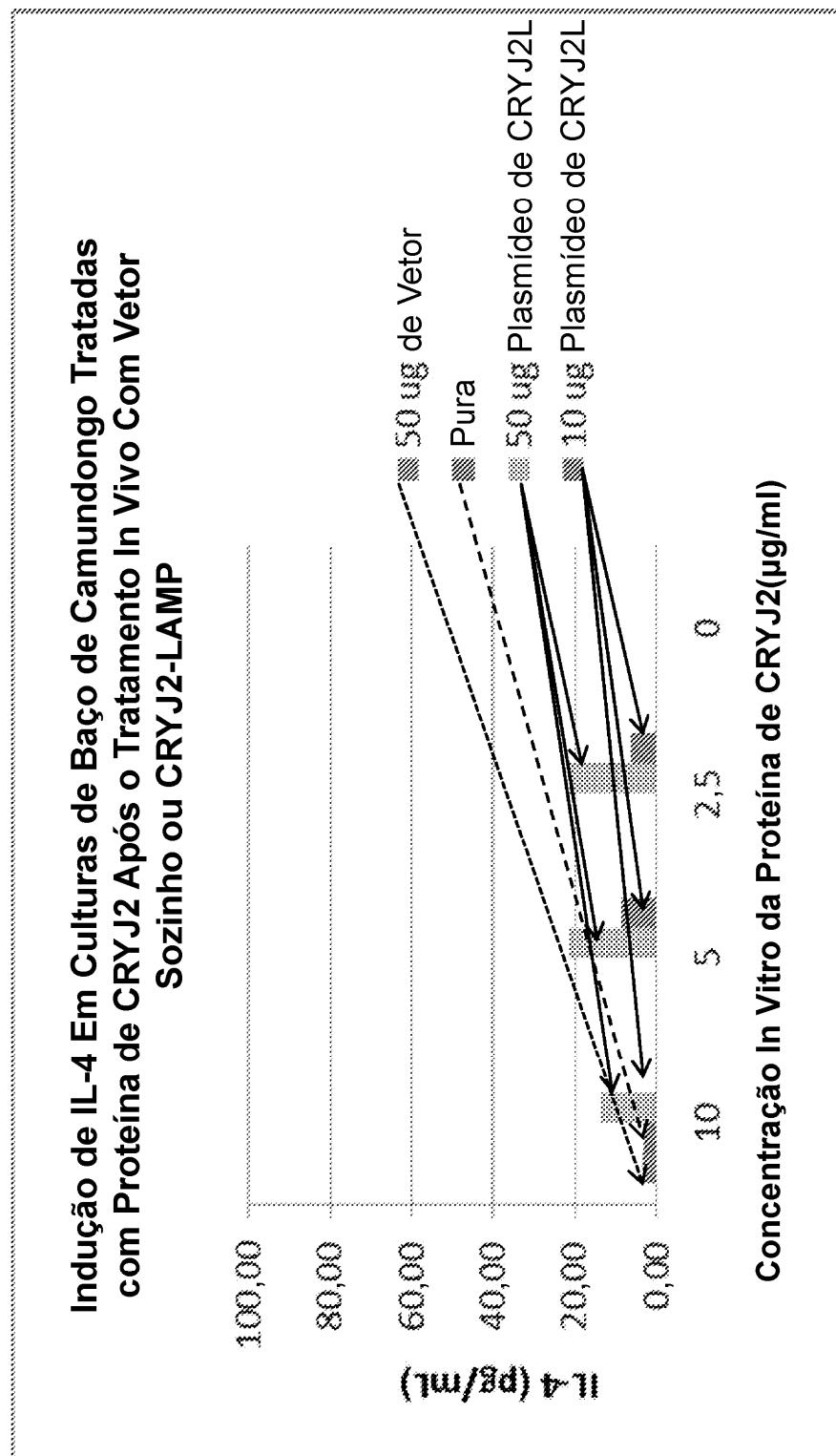
Fig. 12A

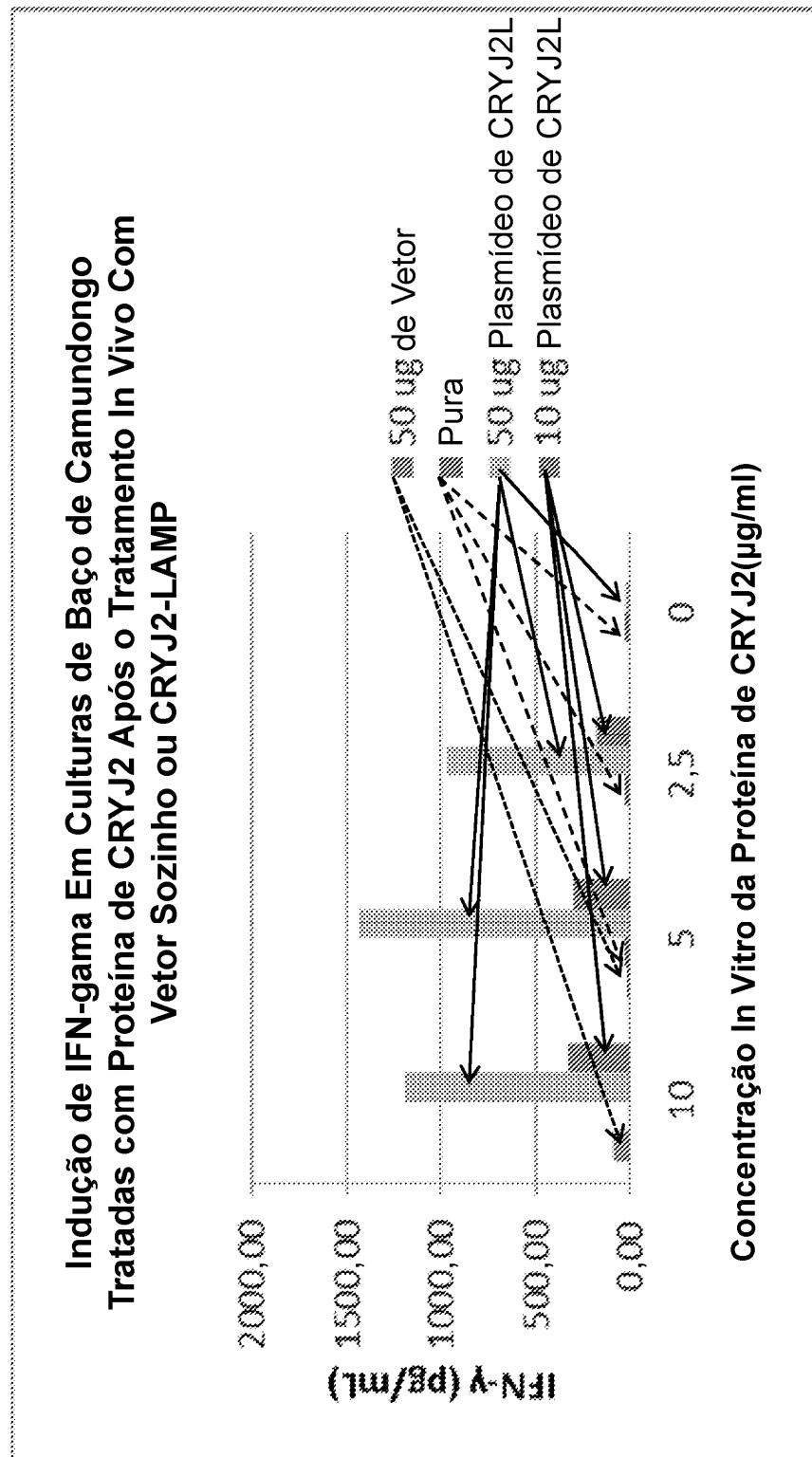
Fig. 12B

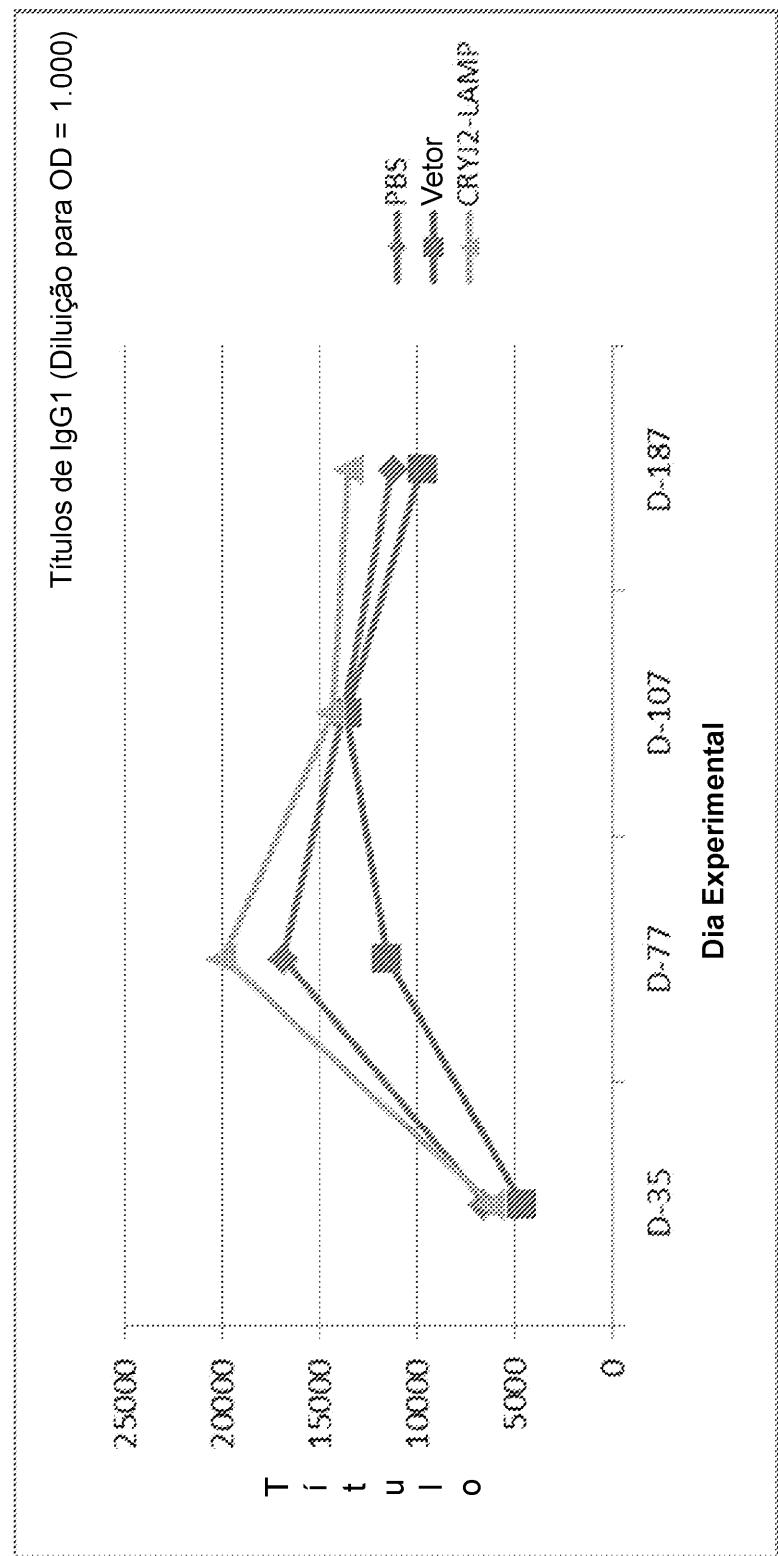
Fig. 13A

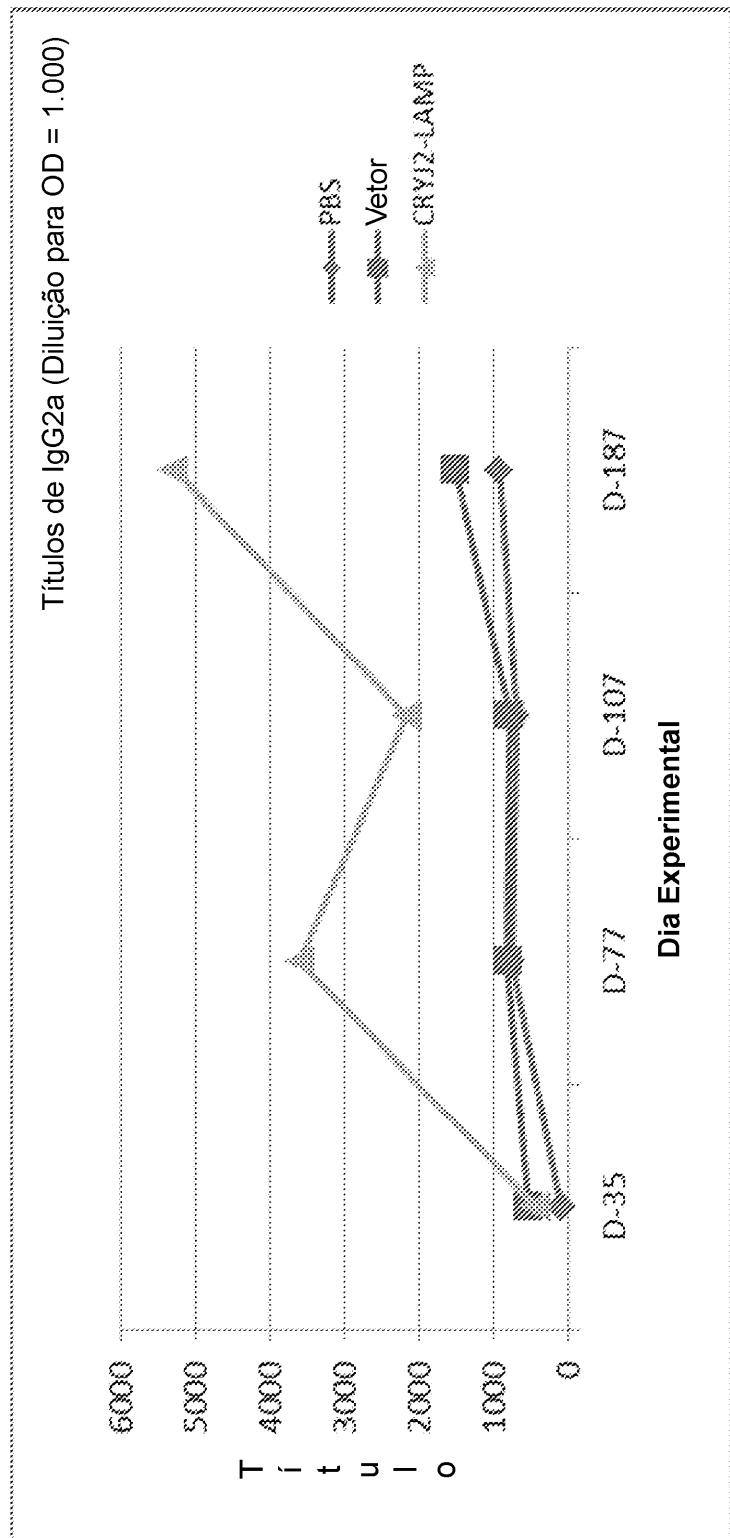
Fig. 13B

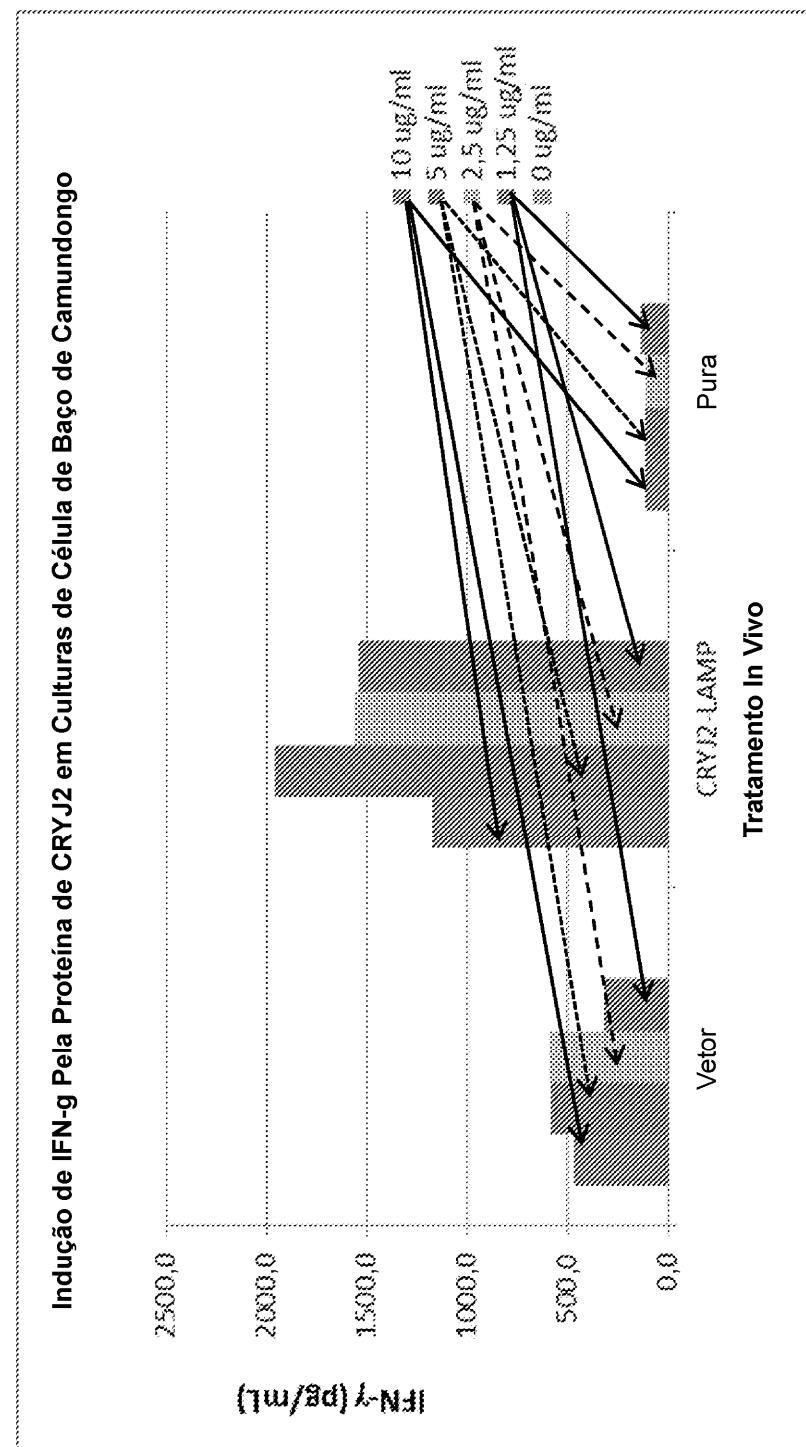
Fig. 14A

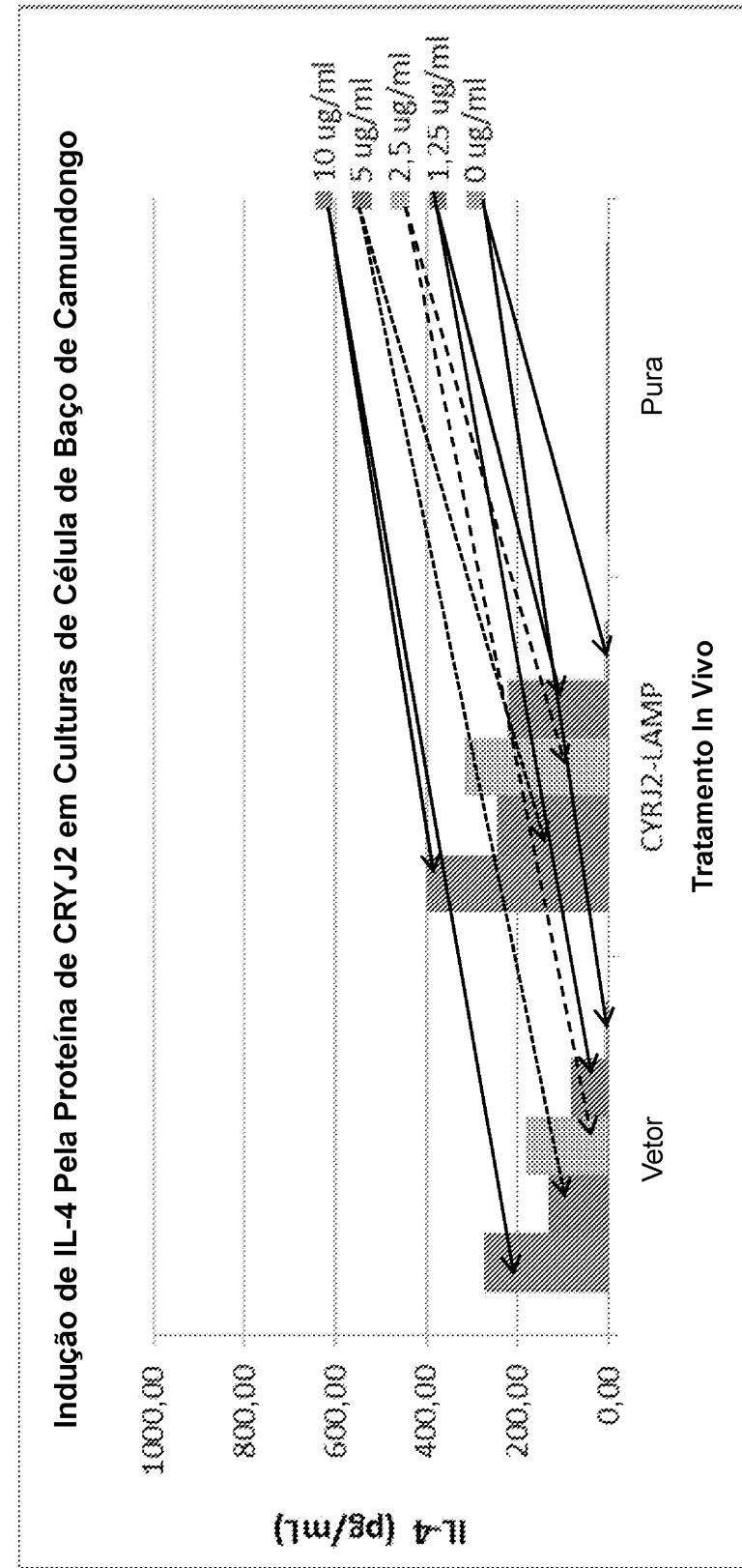
Fig. 14B

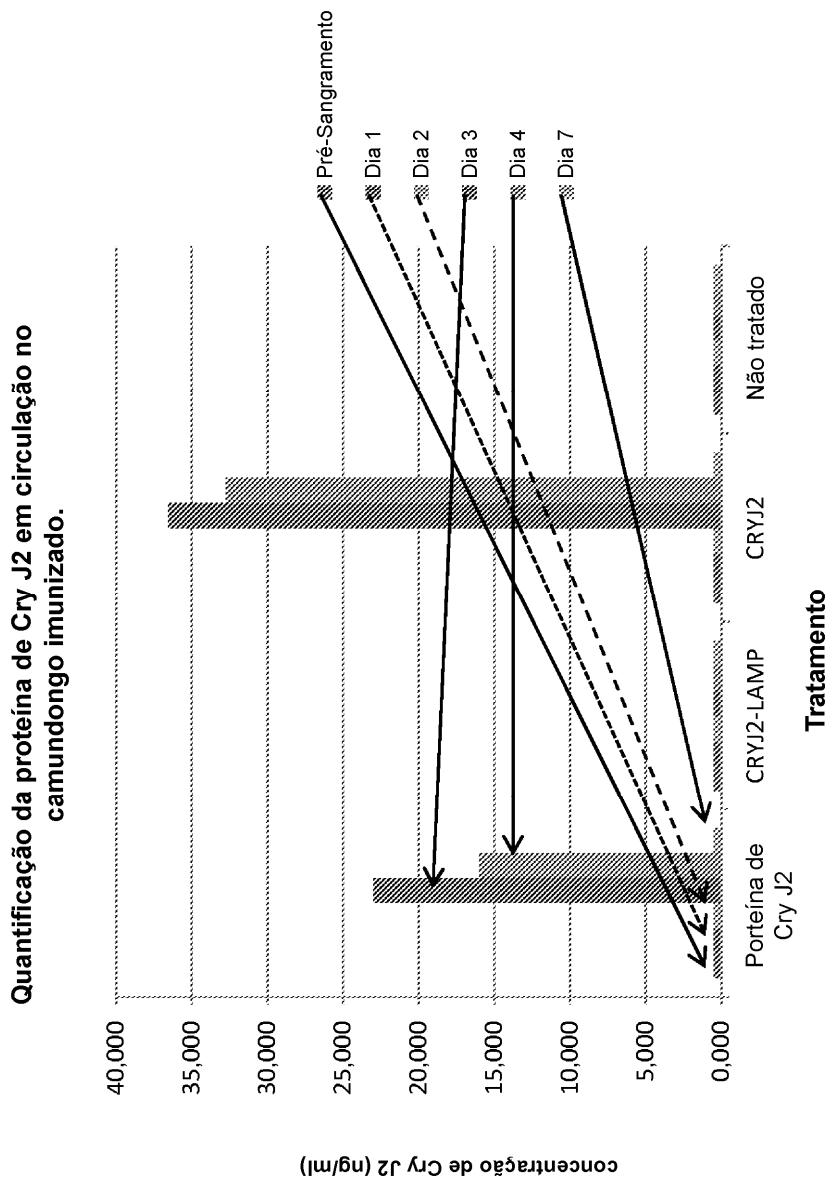
Fig. 15

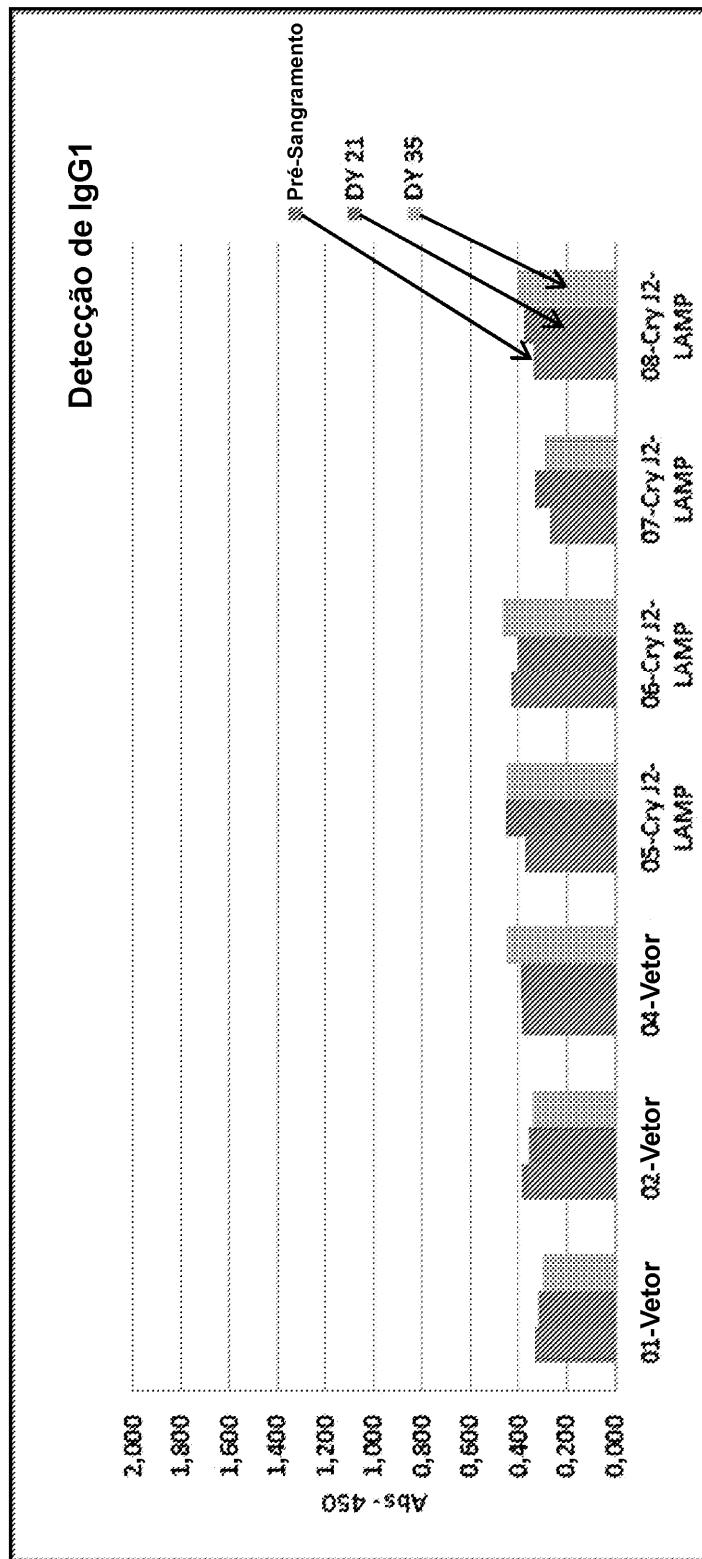
Fig. 16A

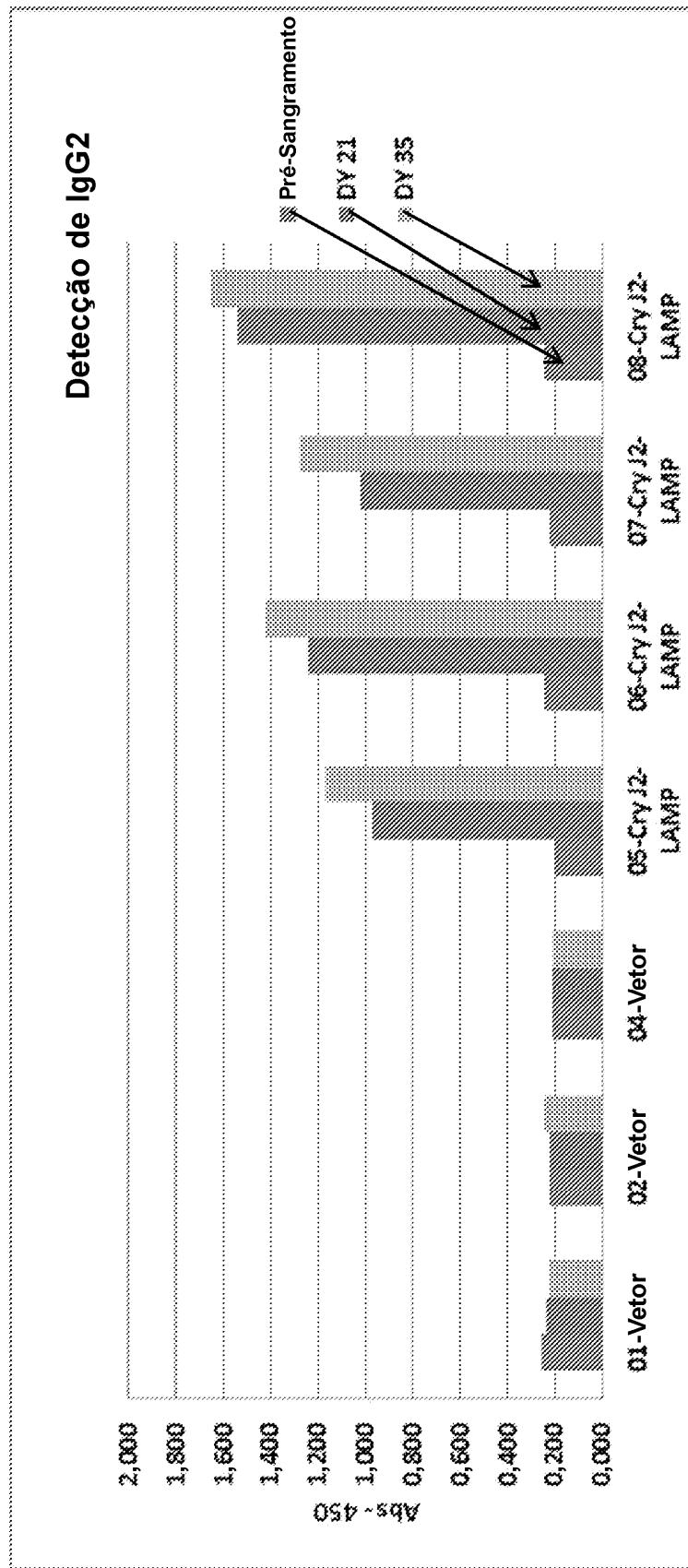
Fig. 16B

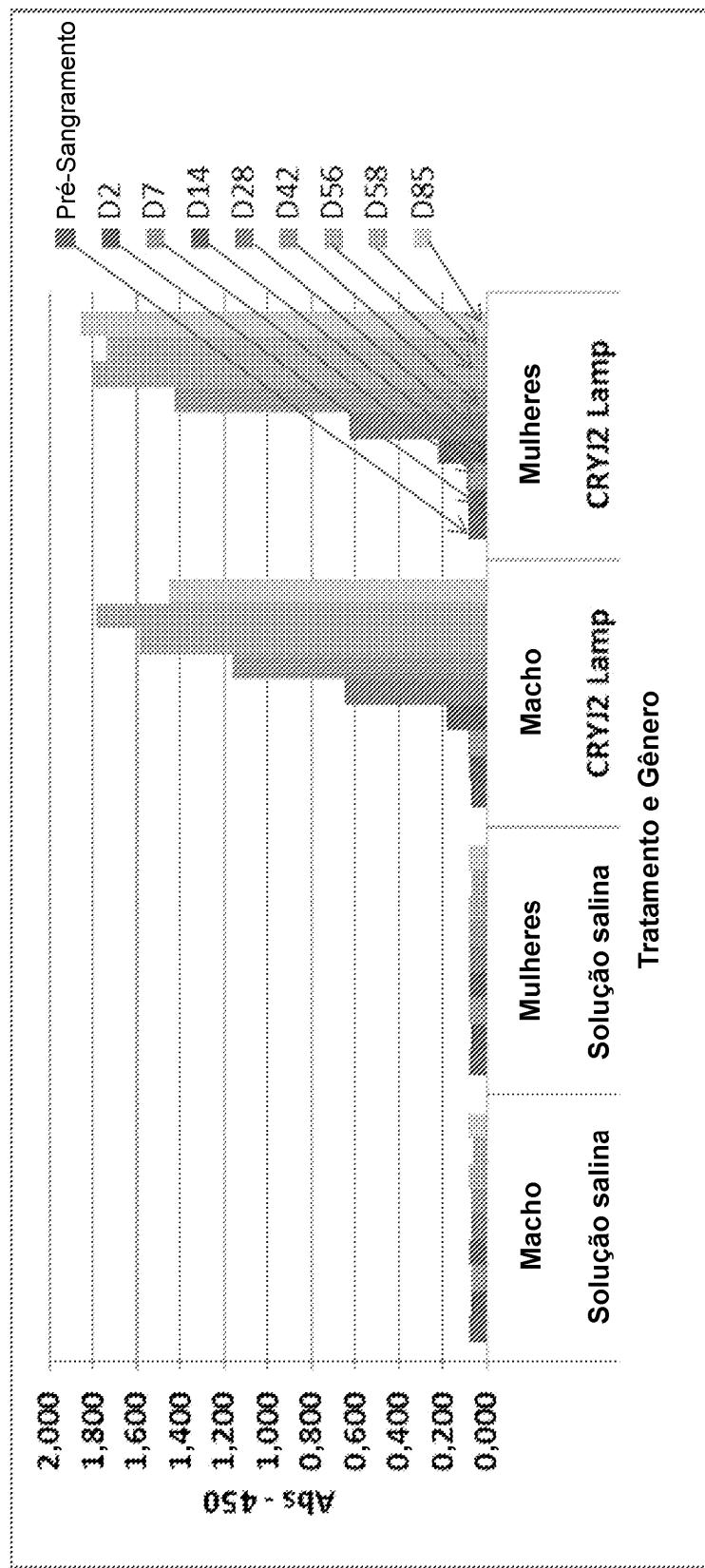
Fig. 17

Fig. 18