

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

(21) PI 0807617-0 A2



* B R P I 0 8 0 7 6 1 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 22/02/2008

(43) Data da Publicação: 22/07/2014
(RPI 2272)

(51) Int.Cl.:

C12N 5/0784

(54) Título: APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DE
ATIVAÇÃO DE ANTÍGENO HUMANO PRESENTE EM
CÉLULAS ATRAVÉS DE DECTIN-1.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 23/02/2007 US 60/891,425

(73) Titular(es): Baylor Research Institute

(72) Inventor(es): Gerard Zurawski, Jacques F. Banchereau, Ling
Ni, Sandra Zurawski, Sangkon Oh

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2008054798 de
22/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/118587 de
02/10/2008

**APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS
APRESENTADORAS DE ANTÍGENO HUMANAS POR MEIO DE DECTINA-1**

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada em geral ao campo da apresentação de antígeno e da ativação de células imunológicas e, mais particularmente, às composições e aos métodos para a ativação de células imunológicas por meio de Dectina-1.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Sem limitar o escopo da invenção, seus fundamentos são descritos em conexão com células dendríticas. As células dendríticas têm uma participação crucial no controle da interface de imunidade inata e adquirida ao fornecerem sinais solúveis e intercelulares, seguidos por reconhecimento de patógenos. Essas funções de DCs são em grande parte dependentes da expressão de receptores de superfície especializados, "receptores de reconhecimento de padrão" (PRRs), representados, principalmente, por receptores toll-like (TLRs) e lectinas do Tipo C ou receptores lectina-like (LLRs) (1-3).

No paradigma atual, um papel importante dos TLRs é alertar as DCs para produzir interleucina 12 (IL-12) e outras citocinas inflamatórias para a iniciação de respostas imunológicas. LLRs do tipo C operam como constituintes do mecanismo de captura e captação de antígeno poderoso de macrófagos e DCs (1). Comparados com os TLRs, no entanto, os LLRs podem ter uma gama mais ampla de funções biológicas que incluem migrações de células (4), interações intercelulares (5). Essas múltiplas funções dos LLRs podem ser decorrentes do fato de que os LLRs,

diferentemente dos TLRs, podem reconhecer tanto *self* quanto *nonself*. No entanto, a complexidade dos LLRs, incluindo a redundância de vários dos LLRs expressos em células imunológicas, tem sido um dos principais obstáculos para a compreensão das funções detalhadas de LLRs individuais. Além disso, ligantes naturais para a maioria desses receptores permanecem não identificados. Não obstante, evidências de estudos recentes sugerem que os LLRs, em colaboração com TLRs, podem contribuir para a ativação de células imunológicas durante infecções microbianas (6-14). Comparada com outros LLRs, Dectina-1 comprovadamente possui um motivo de ITAM que libera sinais para ativar células que expressam Dectina-1. No entanto, a maioria dos estudos foi realizada no modelo em camundongo, e a função biológica de Dectina-1 expressa em células apresentadoras de antígeno humanas, incluindo DCs, monócitos e células B, ainda não foi bem caracterizada. Isso é particularmente importante na medida em que não há uma concordância absoluta entre camundongos e seres humanos para muitos dos LLRs.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção inclui composições e métodos para a produção e utilização de vacinas que direcionam especificamente (liberam) antígenos às células apresentadoras de antígeno a fim de despertar respostas imunológicas potentes e amplas dirigidas contra o antígeno. O objetivo é primariamente despertar respostas imunológicas protetoras ou terapêuticas contra o agente (patógeno ou câncer) do qual o antígeno foi derivado. Além disso, a invenção inclui agentes que são, diretamente ou em associação a outros agentes, terapêuticos por meio de sua

ligação específica de um receptor denominado Dectina-1 que é expresso em células apresentadoras de antígeno.

Os presentes inventores mostram que a expressão de Dectina-1 em células humanas é restrita às células
5 apresentadoras de antígeno, incluindo DCs, monócitos e células B. Sabe-se que a Dectina-1 expressa em células de camundongo (macrófagos) é infra-regulada pelo ligante de TLR4 e IL-10, e aqui demonstramos que apenas o ligante de TLR4 pode infra-regular a expressão de Dectina-1 em DCs
10 humanas e que IL-10 produz uma expressão ligeiramente aumentada de Dectina-1. Curiosamente, a Dectina-1 expressa em DCs humanas apresenta sinergia com TLR4 bem mais eficazmente do que com TLR2, e a sinergia entre Dectina-1 e TLR4 resulta na produção dramaticamente aumentada de
15 citocinas e quimiocinas, particularmente IL-12, o que não foi observado previamente em modelos em camundongo. As células B humanas da amígdala podem ser divididas em dois grupos: CD19⁺Dectina-1⁺ e CD19⁺Dectina-1⁻. Esses achados também podem ser usados em reagentes terapêuticos e
20 preventivos com base em agentes anti-Dectina-1.

Portanto, verificou-se aqui que a sinalização por meio de Dectina-1 humana é única e funcional, tanto isoladamente quanto em colaboração com outros sinais celulares, em termos de ativação de células (incluindo DCs). A ativação
25 celular mediada por Dectina-1 é induzida por mAbs anti-Dectina-1 específicos e, portanto, esses mAbs anti-Dectina-1 humana serão úteis para o desenvolvimento de reagentes contra doenças.

A presente invenção inclui composições e métodos para
30 o aumento da eficácia de apresentação de antígeno por uma

célula apresentadora de antígeno que expressa Dectina-1 por contato da célula apresentadora de antígeno com um anticorpo anti-Dectina-1-específico, ou fragmento deste, capaz de ativar a célula apresentadora de antígeno, em que a célula apresentadora de antígeno é ativada. Exemplos de células apresentadoras de antígeno incluem células dendríticas, células mononucleares do sangue periférico, monócitos, células B, células dendríticas mielóides e combinações destes. A célula apresentadora de antígeno pode ser cultivada *in vitro* com GM-CSF e IL-4, interferon alfa, antígeno e combinações destes. Com a ativação das células apresentadoras de antígeno que tiveram contato com GM-CSF e IL-4 e um anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste, é obtido um aumento na expressão de superfície de CD86, CD80 e HLA-DR na célula apresentadora de antígeno. Quando se faz a ativação das células apresentadoras de antígeno com Interferon alfa e com o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste, as células aumentam a expressão de superfície de CD86, CD83, CD80 e HLA-DR.

Ainda outro método da presente invenção inclui o contato da célula dendrítica que foi colocada em contato com GM-CSF e IL-4 ou Interferon alfa para ativar a célula dendrítica, em que as células dendríticas ativadas aumentam a expressão de superfície de CD86, CD80 e HLA-DR. Para células dendríticas que não foram colocadas em contato com o anticorpo anti-Dectina-1 ou fragmentos deste e GM-CSF e IL-4 ou Interferon alfa para ativar a célula dendrítica, as células dendríticas ativadas aumentam a secreção de IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IP-10 e MIP-1^a e combinações destes.

Ainda outro método de ativação de células dendríticas

inclui o contato com GM-CSF e IL-4 ou Interferon alfa e o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste, o que aumenta a ativação em conjunto com a sinalização por meio de CD40. Verificou-se que a célula dendrítica que entrou em
5 contato com GM-CSF e IL-4 ou Interferon alfa e o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste possui atividade co-estimuladora aumentada por células dendríticas de células B e células T.

Ainda outro método inclui o contato de uma célula
10 apresentadora de antígeno com o anticorpo anti-Dectina-1 e a co-ativação da célula apresentadora de antígeno por meio do receptor TLR4, em que as células aumentam a produção de citocina e quimiocina. A co-ativação da célula apresentadora de antígeno por ativação por meio do receptor
15 TLR4 faz com que as células aumentem secreção de IL-10, IL-1b, TNF α , IL-12p40 e combinações destes.

O método ainda compreende a etapa de co-ativação da célula apresentadora de antígeno por ativação por meio do receptor TLR4 usando pelo menos um de um ligante de TLR4,
20 um anticorpo anti-TLR4 ou fragmentos deste, um anticorpo híbrido anti-TLR4-anti-Dectina-1 ou fragmento deste, um conjugado de ligante anti-TLR4-anti-Dectina-1. O anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste pode ser um ou mais dos clones selecionados de 15E2.5, 11B6.4, 15F4.7, 14D6.3 e
25 9H7.6 e combinações destes. As células dendríticas podem ser ativadas por meio do receptor Dectina-1 com o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste para a ativação de monócitos, células dendríticas, células mononucleares do sangue periférico, células B e combinações destes. O
30 anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste pode ser

ligado a uma metade de um par de coesina/doquerina. Quando o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste está ligado a uma metade de um par de coesina/doquerina, a outra metade do par pode estar ligada a um ou mais antígenos, citocinas selecionadas de interleucinas, fatores de transformação do crescimento (TGFs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento epidérmicos (EGFs), peptídeos ativados por tecido conjuntivo (CTAPs), fatores osteogênicos, e análogos, fragmentos e derivados biologicamente ativos desses fatores de crescimento, fatores de diferenciação de células B/T, fatores de crescimento de células B/T, citocinas mitogênicas, citocinas e quimiocinas quimiotáticas, fatores de estimulação de colônias, fatores de angiogênese, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18 etc., leptina, miostatina, proteína de estimulação de macrófagos, fator de crescimento derivado de plaquetas, TNF- α , TNF- β , NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, linfotoxina- β humana, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF, IL-1 α , IL1- β , IP-10, PF4, GRO, 9E3, eritropoietina, endostatina, angiostatina, VEGF, família do supergene do fator de transformação do crescimento (TGF) incluem os fatores de transformação do crescimento beta (por exemplo, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3); proteínas morfogênicas ósseas (por exemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); fatores de crescimento de ligação de heparina (fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de

crescimento insulina-like (IGF)); Inibinas (por exemplo, Inibina A, Inibina B); fatores de diferenciação do crescimento (por exemplo, GDF-1); e Activinas (por exemplo, Activina A, Activina B, Activina AB).

5 A presente invenção inclui um hibridoma e anticorpos isolados deste que expressam um anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste, em que o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste ativa uma célula apresentadora de antígeno para expressar novos marcadores
10 de superfície, secretar uma ou mais citocinas, ou ambos. O hibridoma pode ser selecionado de clone PAB1, PAB4, PAB5, PAB8, PAB10 e combinações destes.

Um método para o aumento de respostas imunológicas de células B que inclui o acionamento de um receptor Dectina-1
15 em uma célula dendrítica com um anticorpo específico para Dectina-1 ou fragmento deste na presença de antígeno e um ativador de TLR9, em que uma célula B que é colocada em contato com a célula dendrítica ativada por Dectina-1/TLR9 aumenta a produção de anticorpo, secreta citocinas, aumenta
20 a expressão de marcador de superfície da ativação de células B e combinações destes. As células B ativadas com o uso dessas células dendríticas secretam IL-8, MIP-1 α , IL-6, TNF α e combinações destes. Exemplos de células B incluem células plasmáticas, que também podem expressar Dectina-1
25 e/ou aumentar a produção de IgM.

A presente invenção também inclui um método para o aumento de respostas imunológicas de células B que compreende o acionamento de um receptor Dectina-1 em uma célula B com um anticorpo específico para Dectina-1 ou
30 fragmento deste, em que a célula B aumenta a produção de

anticorpo. As células B ativadas usando a presente invenção aumentam a produção de IL-8, MIP-1 α , IL-6, TNF α secretados e combinações destes, e/ou aumentam a produção de IgG, IgM, IgA e combinações destas.

5 A presente invenção também inclui um método para o aumento da ativação de células T por acionamento de um receptor Dectina-1 em uma célula dendrítica com um anticorpo específico para Dectina-1 ou fragmento deste e receptor TLR4 e o contato de uma célula T com a célula
10 dendrítica ativada por Dectina-1/TLR4, em que a ativação de células T é aumentada. As células dendríticas usadas para a ativação podem ser colocadas em contato com GM-CSF e IL-4, interferon alfa, antígeno e combinações destes. O anticorpo específico para Dectina-1 ou fragmento deste aumenta a
15 secreção de IL-10, IL-15 e combinações destas pelas células T. As células T ativadas pelas células dendríticas podem aumentar a expressão de superfície de 4-1BBL e/ou proliferar.

A presente invenção também inclui uma imunoglobulina
20 anti-Dectina-1 ou porção desta que é secretada por células de mamíferos e um antígeno ligado à imunoglobulina, em que a imunoglobulina direciona o antígeno às células apresentadoras de antígeno. O domínio antígeno-específico inclui um anticorpo de comprimento total, um domínio da
25 região variável de anticorpo, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab)₂ e fragmento Fv, e fragmento Fabc e/ou um fragmento Fab com porções do domínio Fc.

Ainda outra modalidade da presente invenção inclui uma
30 vacina que inclui uma célula dendrítica ativada com um

anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste. A presente invenção também inclui células B, células T ou outras células imunológicas que são ativadas diretamente pelo anticorpo Dectina-1-específico ou fragmentos deste e/ou por células apresentadoras de antígeno, por exemplo, células dendríticas, que foram ativadas com o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmentos deste isoladamente ou em combinação com as outras células imunológicas. Por exemplo, uma terapia combinada pode incluir células apresentadoras de antígeno carregáveis com antígeno (por exemplo, uma célula dendrítica) que foram ativadas com o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmentos deste, uma célula B e/ou uma célula T que, em conjunto, formam a vacina.

A presente invenção também inclui o uso de agentes que ligam o receptor Dectina-1 em células imunológicas, isoladamente ou com agentes de co-ativação, a combinação ativando células apresentadoras de antígeno para aplicações terapêuticas; o uso de um agente de ligação de Dectina-1 ligado a um ou mais antígenos, com ou sem agentes de ativação, em células imunológicas para fazer uma vacina; o uso de agentes anti-Dectina-1 como agentes de co-ativação de células imunológicas para o aumento de respostas imunológicas dirigidas por meio de um receptor da superfície celular diferente da Dectina-1 expressa em células imunológicas; o uso de seqüências da região V do anticorpo anti-Dectina-1 capazes de se ligar e ativar células imunológicas por meio do receptor Dectina-1 e/ou o uso de agentes de ligação de Dectina-1 ligados a um ou mais agentes tóxicos para fins terapêuticos no contexto de doenças que sabidamente ou com suspeita de resultarem da

ativação inadequada de células imunológicas por meio de Dectina-1 ou no contexto de células patogênicas ou tecidos que expressam Dectina-1.

Ainda outra modalidade da presente invenção inclui um
5 carreador modular de rAb que inclui um domínio de ligação do anticorpo específico para Dectina-1 ligado a um ou mais domínios de veículo de antígeno que compreendem metade de um par de ligação de coesina-doquerina. O domínio de ligação antígeno-específico pode ser pelo menos uma porção
10 de um anticorpo e/ou pelo menos uma porção de um anticorpo em uma proteína de fusão com a metade do par de ligação de coesina-doquerina. O rAb também pode ser uma metade complementar do par de ligação de coesina-doquerina ligada a um antígeno que forma um complexo com o carreador modular
15 de rAb e/ou uma metade complementar do par de ligação de coesina-doquerina que é uma proteína de fusão com um antígeno. O domínio antígeno-específico pode ser um anticorpo de comprimento total, um domínio da região variável de anticorpo, um fragmento Fab, um fragmento Fab',
20 um fragmento F(ab)₂ e fragmento Fv, e fragmento Fabc e/ou um fragmento Fab com porções do domínio Fc.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Para uma compreensão mais completa das características e vantagens da presente invenção, será feita referência
25 agora à descrição detalhada da invenção, juntamente com as figuras que a acompanham, e nas quais:

As Figuras 1A e 1B mostram os níveis de expressão de Dectina-1 em PBMCs de doadores normais;

A Figura 2 mostra os resultados de IL-4DCs cultivadas
30 *in vitro* que foram cultivadas na presença de CD40L (50

ng/ml), ligante de TLR2 (100 ng/ml), ligante de TLR3 (100 nM), ligante de TLR4 (20 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml), IL-15 (100 ng/ml), IFN α (500 U/ml) e IL-4 (50 ng/ml) por 24 horas;

5 A Figura 3 demonstra que mAbs anti-Dectina-1 ativam DCs;

As Figuras 4A e 4B mostram que a sinalização por meio de Dectina-1 pode resultar na ativação tanto de IL-4DCs quanto de IFNDCs. mAbs anti-Dectina-1 ativam DCs. IFNDCs
10 (Figura 4A) e IL-4DCs (Figura 4B) foram estimuladas com anti-Dectina-1 por 24 horas, e depois as células foram coradas com anti-CD86, 80, 40, 83, CCR7 e HLA-DR;

A Figura 5 mostra que Dectina-1 e TLRs apresentam sinergia para ativar DCs. IL-4DCs (2 x 10⁵/200 μ l/poço)
15 foram cultivadas em placas de 96 poços revestidas com anti-Dectina-1 na presença ou ausência de ligante de TLR4 solúvel (1,5 ng/ml) ou ligante de TLR2 (30 ng/ml) por 18 horas. mAbs de controle também foram testados. Após 18 horas, os sobrenadantes da cultura foram analisados para
20 medir citocinas e quimiocinas por Luminex;

As Figuras 6A e 6B mostram os resultados para IFNDCs (5.000 DCs/poço/200 μ l) carregadas com 10 μ M de peptídeo Mart-1 e ativadas com mAbs anti-Dectina-1, ligante de TLR4 ou mAbs anti-Dectina-1 e ligante de TLR4 por 18 horas
25 (Figura 6A). Células T CD8 autólogas purificadas (2 x 10⁵ células/poço/200 μ l) foram co-cultivadas na presença de 20 U/ml de IL-2 e 10 ng/ml de IL-7 por 10 dias. As células foram coradas com anti-CD8 e Mart-1-HLA-A2-tetrâmero. A Figura 6B mostra os resultados para IFNDCs (5.000
30 DCs/poço/200 μ l) que foram carregadas com 10 μ M de peptídeo

Mart-1 e ativadas com mAbs anti-Dectina-1, ligante de TLR2, ou mAbs anti-Dectina-1 e ligante de TLR2 por 18 horas. Células T CD8 autólogas purificadas (2×10^5 células/poço/200 μ l) foram co-cultivadas na presença de 20 U/ml de IL-2 e 10 ng/ml de IL-7 por 10 dias. As células foram coradas com anti-CD8 e Mart-1-HLA-A2-tetrâmero;

A Figura 7 mostra os resultados para IFNDCs (5.000 DCs/poço/200 μ l) carregadas com 10 μ M de peptídeo Mart-1 e ativadas com mAbs anti-Dectina-1, ligante de TLR4, ou mAbs anti-Dectina-1 e ligante de TLR4, Zymosan por 18 horas. Anticorpo neutralizante anti-IL-10 (5 μ g/ml) foi adicionado nas DCs estimuladas com anti-Dectina-1 e ligante de TLR4 e Zymosan. Anticorpo de controle para anti-IL-10 também foi testado, mas não foram observadas diferenças significantes (dados não mostrados). Células T CD8 autólogas purificadas (2×10^5 células/poço/200 μ l) foram co-cultivadas na presença de 20 U/ml de IL-2 e 10 ng/ml de IL-7 por 10 dias. As células foram coradas com anti-CD8 e Mart-1-HLA-A2-tetrâmero;

A Figura 8 mostra que DCs ativadas com mAbs anti-Dectina-1 expressam níveis aumentados de IL-15 e 4-1BBL. IFNDCs (2×10^5 /200 μ l/poço) foram cultivadas nas placas de 96 poços revestidas com anti-Dectina-1 ou Ig de controle por 18 horas. Após 18 horas, as células foram coradas com anti-IL-15 e anti-4-1BBL;

As Figuras 9A e 9B mostram que Dectina-1 expressa em DCs contribui para respostas imunológicas humorais aumentadas. IL-4 DCs de seis dias, 5×10^3 /poço, foram incubadas em placas de 96 poços revestidas com anti-Dectina-1 ou mAbs de controle por 16-18 horas, e depois $2 \times$

10e4 células B CD19+ autólogas coradas com CFSE foram co-cultivadas na presença de 20 U/ml de IL-2 e 50 ng/ml de CD40L (Figura 9A) ou 50 nM de CpG (Figura 9B). No 6° dia, as células foram coradas com anticorpo anti-CD38 marcado de
5 forma fluorescente. Os sobrenadantes da cultura no 13° dia foram analisados quanto às imunoglobulinas totais por ELISA em sanduíche;

As Figuras 10A e 10B mostram que Dectina-1 expressa em células B contribui para a ativação de células B e para a
10 produção de imunoglobulina. Figura 10A. Células B CD19+ purificadas (20.000 células/poço/200 µl) foram cultivadas em placas revestidas com os mAbs, anti-Dectina-1 ou Ig de controle, na presença de 50 nM de CpG e 20 U/ml de IL-2 por 6 dias. As células foram coradas com anti-CD38 e a
15 proliferação celular foi medida por diluição de CFSE. Figura 10B. No 13° dia da cultura, os sobrenadantes da cultura foram analisados pela medida de imunoglobulinas totais produzidas por ELISA;

As Figuras 11A a 11C mostram que Dectina-1 expressa em
20 DCs contribui para respostas imunológicas celulares aumentadas. Figura 11A. 5×10^3 de IFNDCs foram cultivadas em placas revestidas com anti-Dectina-1 ou mAbs de controle na presença de 100 nM de proteína Flu M1 recombinante por 16-18 horas, e depois células T CD8 autólogas purificadas
25 foram co-cultivadas na presença de 20 U/ml de IL-2 e 10 ng/ml de IL-7 por 7 dias. As células foram coradas com anti-CD8 e tetrâmero para o epítipo de peptídeo Flu M1 para HLA-A2. Figura 11B e Figura 11C. IFNDCs foram carregadas com 10 µM de peptídeo Mart-1 (Figura 11B) ou 100 nM de
30 proteína recombinante Coh-Mart-1, e depois estimuladas com

anticorpo anti-Dectina-1 ou anticorpos de controle, como descrito na Figura 11A. Após 10 dias de cultura, as células foram coradas com anti-CD8 e tetrâmero (HLA-A2-peptídeo mart-1). Cada linha representa dados gerados de um doador individual. Todas as células usadas neste estudo foram de doadores normais positivos para HLA-A201;

A Figura 12 mostra que mAbs anti-Dectina-1 em forma solúvel ativam DCs para aumentar a sensibilização de células T CD8 específicas para Mart-1. 5×10^3 de IFNDCs foram cultivadas na presença de 0,5 µg/ml de mAb anti-Dectina-1, mAb anti-CD40 ou mAb de controle por 16 horas. Antes de células T autólogas purificadas (2×10^5 /poço) serem adicionados na cultura, 20 µM de peptídeo Mart-1 foram adicionados. Após 10 dias, as células foram coradas com anti-CD8 e tetrâmero (HLA-A2-peptídeo mart-1). Todas as células usadas neste estudo foram de doadores normais positivos para HLA-A201;

Figura 13 mostra que foram adquiridas amídalas de doadores normais e foi preparada uma suspensão de células com o uso de Colagenase do tipo III sem DNase. As células foram lavadas vigorosamente com PBS contendo FCS 5%, e depois coradas com anti-CD3 ou anti-CD19 com mAbs anti-Dectina-1. Foram usados mAbs de controle com isótipo compatível;

As Figuras 14A e 14B mostram que cortes de tecido de pele (Figura 14A) e linfonodos (Figura 14B) humanos de doadores normais foram preparados e corados com DAPI (Azul) e anti-Dectina-1 (Vermelho) preparados neste estudo;

A Figura 15 mostra que PBMC de primatas não humanos (Cynomolgus) foram coradas com mAb anti-Dectina-1 e

anticorpos para marcadores da superfície celular;

A Figura 16 mostra análise por SDS-PAGE reduzida de proteínas de fusão rAb.antígeno típicas, que abrigam muitos dos antígenos mostrados ou mencionados acima.

5 **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Embora a produção e a utilização de várias modalidades da presente invenção sejam discutidas com detalhe abaixo, deve ser observado que a presente invenção fornece muitos conceitos aplicáveis da invenção que podem ser exemplificados em diversos contextos específicos. As modalidades específicas aqui discutidas são meramente ilustrativas de formas e usos específicos da invenção, e não delimitam o escopo da invenção.

Para facilitar a compreensão desta invenção, diversos termos serão definidos abaixo. Os termos aqui definidos possuem os significados normalmente utilizados por aqueles habilitados nas áreas relevantes para a presente invenção. Termos como, por exemplo, "um", "uma", "o" e "a" não se referem apenas à forma no singular, mas incluem a classe geral da qual um exemplo específico pode ser usado para ilustração. A terminologia é aqui usada para descrever modalidades específicas da invenção, mas sua utilização não delimita a invenção, exceto como estabelecido nas reivindicações.

25 A presente invenção também inclui um mAb humanizado recombinante (direcionado ao receptor Dectina-1 específico da célula dendrítica humana) fundido por meio da cadeia pesada do Ab aos antígenos sabidamente ou suspeitos de codificarem antígenos protetores. Esses incluem, como
30 exemplos para vacinação contra vários agentes,

hemaglutininas de Influenza H5N1; gag de HIV de toxinas atenuadas de Ricina, toxina do antraz e enterotoxina de *Staphylococcus* B; "strings" de peptídeos antigênicos de antígenos de melanona etc. A presente invenção encontrará
5 utilidade na vacinação preventiva ou terapêutica de pessoas em risco ou infectadas. A invenção possui ampla aplicação para vacinação contra muitas doenças e cânceres, para uso tanto em serem humanos quanto em animais.

Como aqui usado, o termo "carreador modular de rAb" é
10 usado para descrever um sistema de anticorpo recombinante que foi criado geneticamente para permitir a adição modular controlada de diversos antígenos, proteínas de ativação ou outros anticorpos a um único anticorpo monoclonal recombinante (mAb), nesse caso, um anticorpo monoclonal
15 anti-Dectina-1. O rAb pode ser um anticorpo monoclonal feito com o uso de técnicas padronizadas de hibridoma, apresentação de anticorpo recombinante, anticorpos monoclonais humanizados, e semelhantes. O carreador modular de rAb pode ser usado, por exemplo, para direcionar (por
20 meio de um anticorpo recombinante primário contra um receptor de internalização, por exemplo, um receptor de célula dendrítica humana) múltiplos antígenos e/ou antígenos e uma citocina de ativação às células dendríticas (DC). O carreador modular de rAb também pode ser usado para
25 unir dois mAbs recombinantes diferentes de ponta a ponta de uma forma controlada e definida.

A porção de ligação de antígeno do "carreador modular de rAb" pode ser um ou mais domínios variáveis, um ou mais domínios variáveis e o primeiro domínio constante, um
30 fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab)₂, e um

fragmento Fv, e um fragmento Fabc e/ou um fragmento Fab com porções do domínio Fc ao qual as porções de ligação modulares cognatas são adicionadas à seqüência de aminoácidos e/ou ligadas. O anticorpo para uso no carreador modular de rAb pode ser de qualquer isótipo ou classe, subclasse ou de qualquer fonte (animal e/ou recombinante).

Em um exemplo não limitante, o carreador modular de rAb é criado geneticamente para ter um ou mais domínios modulares de proteína coesina-doquerina para a produção de complexos de proteína específicos e definidos no contexto de mAbs recombinantes criados geneticamente. O mAb é uma porção de uma proteína de fusão que inclui um ou mais carbóxis dos domínios modulares de proteína coesina-doquerina dos domínios de ligação de antígeno do mAb. Os domínios de proteína coesina-doquerina podem até mesmo ser anexados pós-tradução, por exemplo, com a utilização de vinculadores cruzados químicos e/ou pontes dissulfeto.

O termo "antígeno", como aqui usado, refere-se a uma molécula que pode iniciar uma resposta imunológica humoral e/ou celular em um receptor do antígeno. O termo "antígeno" pode ser usado em dois contextos diferentes com a presente invenção: como um alvo para o anticorpo ou outro domínio de reconhecimento de antígeno do rAb, ou como a molécula que é conduzida a e/ou para dentro de uma célula ou alvo pelo rAb como parte de um complemento da molécula de doquerina/coesina para o carreador modular de rAb. O antígeno é normalmente um agente que causa uma doença para a qual uma vacinação seria um tratamento vantajoso. Quando o antígeno é apresentado em MHC, o peptídeo freqüentemente possui um comprimento de cerca de 8 a cerca de 25

aminoácidos. Antígenos incluem qualquer tipo de molécula biológica, incluindo, por exemplo, metabólitos intermediários simples, açúcares, lipídeos e hormônios, além de macromoléculas como, por exemplo, carboidratos complexos, fosfolipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. 5 Categorias comuns de antígenos incluem, sem limitação, antígenos virais, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoários e de outros parasitas, antígenos tumorais, antígenos envolvidos em doença autoimune, alergia e rejeição de enxertos, e outros 10 antígenos diversos.

O carreador modular de rAb é capaz de conduzir qualquer número de agentes ativos, por exemplo, antibióticos, agentes anti-infecciosos, agentes antivirais, 15 agentes antitumorais, antipiréticos, analgésicos, agentes anti-inflamatórios, agentes terapêuticos para osteoporose, enzimas, citocinas, anticoagulantes, polissacarídeos, colágeno, células, e combinações de dois ou mais dos agentes ativos citados anteriormente. Exemplos de 20 antibióticos para liberação com o uso da presente invenção incluem, sem limitação, tetraciclina, aminoglicosídeos, penicilinas, cefalosporinas, fármacos de sulfonamida, succinato sódico de cloranfenicol, eritromicina, vancomicina, lincomicina, clindamicina, nistatina, 25 anfotericina B, amantidina, idoxuridina, ácido p-amino salicílico, isoniazida, rifampina, antinomina D, mitramicina, daunomicina, adriamicina, bleomicina, vinblastina, vincristina, procarbazona, imidazol carboxamida, e semelhantes.

30 Exemplos de agentes antitumorais para liberação com o

uso da presente invenção incluem, sem limitação, doxorubicina, daunorrubicina, taxol, metotrexato, e semelhantes. Exemplos de antipiréticos e analgésicos incluem aspirina, Motrint, Ibuprofeno®, naprosin, acetaminofeno, e semelhantes.

Exemplos de agentes antiinflamatórios para liberação com o uso da presente invenção incluem, sem limitação, NSAIDS, aspirina, esteróides, dexametasona, hidrocortisona, prednisolona, diclofenaco sódio, e semelhantes.

Exemplos de agentes terapêuticos para o tratamento de osteoporose e outros fatores que atuam sobre os ossos e o esqueleto para liberação com o uso da presente invenção incluem, sem limitação, cálcio, alendronato, peptídeo ósseo GLa, hormônio da paratireóide e seus fragmentos ativos, peptídeo de formação e proliferação ósseas relacionado à histona H4, e mutações, derivados e análogos destes.

Exemplos de enzimas e co-fatores de enzima para liberação com o uso da presente invenção incluem, sem limitação, pancrease, L-asparaginase, hialuronidase, quimiotripsina, tripsina, tPA, estreptoquinase, uroquinase, pancreatina, colagenase, tripsinogênio, quimiotripsinogênio, plasminogênio, estreptoquinase, adenil ciclase, superóxido dismutase (SOD), e semelhantes.

Exemplos de citocinas para liberação com o uso da presente invenção incluem, sem limitação, interleucinas, fatores de transformação de crescimento (TGFs), fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento epidérmico (EGFs), peptídeos ativados por tecido conjuntivo (CTAPs), fatores osteogênicos, e análogos, fragmentos e

derivados biologicamente ativos desses fatores de crescimento. Citocinas podem ser fatores de diferenciação de células B/T, fatores de crescimento de células B/T, citocinas mitogênicas, citocinas quimiotáticas, fatores de
5 estimulação de colônias, fatores de angiogênese, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18 etc., leptina, miostatina, proteína de estimulação de macrófagos, fator de crescimento derivado de plaquetas, TNF- α , TNF- β ,
10 NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, linfoxina- β humana, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF, IL-1 α , IL1- β , IP-10, PF4, GRO, 9E3, eritropoietina, endostatina, angiostatina, VEGF ou quaisquer fragmentos ou combinações destes. Outras citocinas incluem membros da família do supergene de fator
15 de transformação de crescimento (TGF), que incluem os fatores de transformação de crescimento beta (por exemplo, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3); proteínas morfogenéticas ósseas (por exemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); fatores de crescimento de ligação de
20 heparina (por exemplo, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento insulina-like (IGF)); Inibinas (por exemplo, Inibina A, Inibina B); fatores de diferenciação do
25 crescimento (por exemplo, GDF-1); e Activinas (por exemplo, Activina A, Activina B, Activina AB).

Exemplos de fatores de crescimento para liberação com o uso da presente invenção incluem, sem limitação, fatores de crescimento que podem ser isolados de fontes nativas ou
30 naturais como, por exemplo, de células de mamíferos, ou que

podem ser preparados sinteticamente como, por exemplo, por técnicas de DNA recombinante ou por vários processos químicos. Além disso, análogos, fragmentos ou derivados desses fatores podem ser usados, desde que exibam pelo menos um pouco da atividade biológica da molécula nativa. Por exemplo, análogos podem ser preparados por expressão de genes alterados por mutagênese sítio-específica ou por outras técnicas de engenharia genética.

Exemplos de anticoagulantes para liberação com o uso da presente invenção incluem, sem limitação, warfarin, heparina, hirudina, e semelhantes. Exemplos de fatores que atuam sobre o sistema imunológico para liberação com o uso da presente invenção incluem, sem limitação, fatores que controlam a inflamação e neoplasias malignas, e fatores que atacam microorganismos infecciosos como, por exemplo, peptídeos quimiotáticos e bradisininas.

Exemplos de antígenos virais incluem, sem limitação, por exemplo, antígenos retrovirais, tais como antígenos retrovirais do vírus da imunodeficiência humana (HIV), tais como produtos gênicos dos genes gag, pol e env, a proteína Nef, transcriptase reversa, e outros componentes do HIV; antígenos virais da hepatite, tais como as proteínas S, M e L do vírus da hepatite B, o antígeno pré-S do vírus da hepatite B, e outros antígenos de hepatite, por exemplo, componentes virais da hepatite A, B e C como, por exemplo, RNA viral da hepatite C; antígenos do vírus influenza como, por exemplo, hemaglutinina e neuraminidase, e outros componentes do vírus influenza; antígenos do vírus do sarampo como, por exemplo, a proteína de fusão do vírus do sarampo e outros componentes do vírus do sarampo; antígenos

virais da rubéola como, por exemplo, as proteínas E1 e E2 e outros componentes do vírus da rubéola; antígenos do rotavírus como, por exemplo, VP7sc e outros componentes do rotavírus; antígenos do citomegalovírus como, por exemplo, a glicoproteína B do envelope e outros componentes antigênicos do citomegalovírus; antígenos do vírus sincicial respiratório como, por exemplo, a proteína de fusão do RSV, a proteína M2 e outros componentes antigênicos do vírus sincicial respiratório; antígenos do vírus do herpes simples como, por exemplo, proteínas iniciais imediatas, glicoproteína D e outros componentes antigênicos do vírus do herpes simples; antígenos do vírus varicela zoster como, por exemplo, gpI, gpII e outros componentes antigênicos do vírus varicela zoster; antígenos do vírus da encefalite japonesa como, por exemplo, as proteínas E, M-E, M-E-NS1, NS1, NS1-NS2A, E 80%, e outros componentes antigênicos do vírus da encefalite japonesa; antígenos do vírus da raiva como, por exemplo, glicoproteína da raiva, nucleoproteína da raiva e outros componentes antigênicos do vírus da raiva. Veja "Fundamental Virology", Segunda Edição, eds. Fields, B. N. e Knipe, D. M. (Raven Press, Nova York, 1991) para exemplos adicionais de antígenos virais.

Os alvos antigênicos que podem ser liberados com o uso das vacinas de rAb-DC/DC-antígeno da presente invenção incluem genes que codificam antígenos como, por exemplo, antígenos virais, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos ou antígenos parasíticos. Vírus incluem picornavírus, coronavírus, togavírus, flavivírus, rabdovírus, paramixovírus, ortomixovírus, bunivírus, arenavírus,

reovírus, retrovírus, papilomavírus, parvovírus, herpesvírus, poxvírus, hepadnavírus e vírus espongiforme. Outros alvos virais incluem o vírus influenza, vírus do herpes simples 1 e 2, vírus do sarampo, dengue, varíola, pólio ou HIV. Patógenos incluem tripanossomos, solitárias, ascárides, helmintos, malária. Marcadores tumorais, tais como antígeno fetal ou antígeno específico da próstata, podem ser direcionados dessa forma. Outros exemplos incluem: proteínas do env de HIV e antígeno de superfície da hepatite B. A administração de um vetor de acordo com a presente invenção para fins de vacinação necessitaria que os antígenos associados ao vetor fossem suficientemente não imunogênicos para permitir a expressão de longo prazo do transgene, para o qual uma forte resposta imunológica seria desejada. Em alguns casos, a vacinação de um indivíduo pode ser necessária apenas raramente, por exemplo, a cada ano ou a cada dois anos, e fornece proteção imunológica de longo prazo contra o agente infeccioso. Exemplos específicos de organismos, alérgenos e seqüências de ácidos nucleicos e de aminoácidos para uso em vetores e, em última análise, como antígenos com a presente invenção, podem ser encontrados na Patente U.S. N° 6.541.011, cujas porções relevantes são aqui incorporadas por referência, em particular, as tabelas que combinam organismos e seqüências específicas que podem ser usados com a presente invenção.

Os antígenos bacterianos para uso com a vacina de rAb aqui revelada incluem, sem limitação, por exemplo, antígenos bacterianos como, por exemplo, toxina de pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina, FIM2, FIM3, adenilato ciclase e outros componentes de antígenos

bacterianos de pertussis; antígenos bacterianos diftéricos como, por exemplo, toxina ou toxóide diftérico e outros componentes antigênicos bacterianos diftéricos; antígenos bacterianos tetânicos como, por exemplo, toxina ou toxóide tetânico e outros componentes antigênicos bacterianos tetânicos; antígenos bacterianos estreptocócicos como, por exemplo, proteínas M e outros componentes antigênicos bacterianos estreptocócicos; antígenos bacterianos de bacilos gram-negativos como, por exemplo, lipopolissacarídeos e outros componentes antigênicos bacterianos gram-negativos, antígenos bacterianos de *Mycobacterium tuberculosis* como, por exemplo, ácido micólico, proteína do choque térmico 65 (HSP65), a proteína secretada principal de 30 kDa, antígeno 85A e outros componentes antigênicos micobacterianos; componentes antigênicos bacterianos de *Helicobacter pylori*; antígenos bacterianos pneumocócicos como, por exemplo, pneumolisina, polissacarídeos capsulares pneumocócicos e outros componentes antigênicos bacterianos pneumocócicos; antígenos bacterianos de *Haemophilus influenza* como, por exemplo, polissacarídeos capsulares e outros componentes antigênicos bacterianos de *Haemophilus influenza*; antígenos bacterianos de antraz como, por exemplo, antígeno protetor de antraz e outros componentes antígenos bacterianos de antraz; antígenos bacterianos de riquetsias como, por exemplo, rompA e outros componentes antigênicos bacterianos de riquetsias. Também são incluídos com os antígenos bacterianos aqui descritos quaisquer outros antígenos bacterianos, micobacterianos, micoplasmáticos, de riquetsias ou de clamídias. Patógenos parciais ou inteiros

também podem ser: *Haemophilus influenza*; *Plasmodium falciparum*; *Neisseria meningitidis*; *Streptococcus pneumoniae*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Salmonella* sorotipo typhi; *Shigella*; *Vibrio cholerae*; febre da Dengue; Encefalites; Encefalite Japonesa; doença de Lyme; *Yersinia pestis*; vírus do Nilo Ocidental; febre amarela; tularemia; hepatite (viral; bacteriana); RSV (vírus sincicial respiratório); HPIV 1 e HPIV 3; adenovírus; catapora; alergias e cânceres.

Os antígenos fúngicos para uso com composições e métodos da invenção incluem, sem limitação, por exemplo, componentes antigênicos fúngicos de *Candida*; antígenos fúngicos de histoplasma como, por exemplo, proteína do choque térmico 60 (HSP60) e outros componentes antigênicos fúngicos de histoplasma; antígenos fúngicos criptocócicos como, por exemplo, polissacarídeos capsulares e outros componentes antigênicos fúngicos criptocócicos; antígenos fúngicos de coccídeos como, por exemplo, antígenos da esférula e outros componentes antigênicos fúngicos de coccídeos; e antígenos fúngicos de *Trichosporon* como, por exemplo, tricofitina e outros componentes antigênicos fúngicos coccídeos.

Exemplos de antígenos de protozoários e de outros parasitas incluem, sem limitação, por exemplo, antígenos de *Plasmodium falciparum* como, por exemplo, antígeno de superfícies de merozoíto, antígenos de superfície de esporozoíto, antígenos de circunsporozoíto, antígenos de superfície de gametócito/gameta, antígeno do estágio sangüíneo pf 155/RESA e outros componentes antigênicos de plasmódios; antígenos de toxoplasma como, por exemplo, SAG-

1, p30 e outros componentes antigênicos de toxoplasmas; antígenos de esquistossomos como, por exemplo, glutational-S-transferase, paramiosina e outros componentes de antígeno de esquistossomos; antígenos de *Leishmania major* e de
 5 outras leishmânias como, por exemplo, gp63, lipofosfoglicano e sua proteína associada e outros componentes antigênicos de leishmânias; e antígenos de *Trypanosoma cruzi* como, por exemplo, o antígeno de 75-77 kDa, o antígeno de 56 kDa e outros componentes antigênicos
 10 de tripanossomos.

O antígeno que pode ser direcionado com o uso do rAb da presente invenção geralmente será selecionado com base em diversos fatores, incluindo: probabilidade de internalização, nível de especificidade da célula
 15 imunológica, tipo de célula imunológica visada, nível de amadurecimento e/ou ativação da célula imunológica, e semelhantes. Exemplos de marcadores da superfície celular para células dendríticas incluem, sem limitação, MHC Classe I, MHC Classe II, B7-2, CD18, CD29, CD31, CD43, CD44, CD45, CD54, CD58, CD83, CD86, CMRF-44, CMRF-56, DCIR e/ou ASPGR,
 20 e semelhantes; embora, em alguns casos, também possuam a ausência de CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 e/ou CD57. Exemplos de marcadores da superfície celular para células apresentadoras de antígeno incluem,
 25 sem limitação, MHC Classe I, MHC Classe II, CD40, CD45, B7-1, B7-2, receptor de IFN- γ e receptor de IL-2, ICAM-1 e/ou receptor Fc γ . Exemplos de marcadores da superfície celular para células T incluem, sem limitação, CD3, CD4, CD8, CD14, CD20, CD11b, CD16, CD45 e HLA-DR.

30 Antígenos-alvo em superfícies celulares para liberação

incluem aqueles característicos de antígenos tumorais que tipicamente serão derivados da superfície celular, citoplasma, núcleo, organelas, e semelhantes, de células do tecido tumoral. Exemplos de alvos tumorais para a porção de anticorpo da presente invenção incluem, sem limitação, cânceres hematológicos, tais como leucemias e linfomas, tumores neurológicos, tais como astrocitomas ou glioblastomas, melanoma, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer da cabeça e pescoço, tumores gastrintestinais, tais como câncer gástrico ou do cólon, câncer hepático, câncer pancreático, tumores geniturinários, tais como câncer do cérvix, do útero, câncer ovariano, câncer vaginal, câncer testicular, câncer da próstata ou câncer do pênis, tumores ósseos, tumores vasculares ou cânceres dos lábios, da nasofaringe, da faringe e da cavidade oral, do esôfago, do reto, da vesícula biliar, da árvore biliar, da laringe, pulmão e brônquios, da bexiga, do rim, do cérebro e de outras partes do sistema nervoso, da tireóide, doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, mieloma múltiplo e leucemia.

Exemplos de antígenos que podem ser liberados, isoladamente ou em combinação, às células imunológicas para apresentação de antígeno com o uso da presente invenção incluem proteínas tumorais, por exemplo, oncogenes mutados; proteínas virais associadas a tumores; e mucinas e glicolipídeos tumorais. Os antígenos podem ser proteínas virais associadas a tumores, que seriam daquelas classes de vírus observadas acima. Certos antígenos podem ser característicos de tumores (um subconjunto sendo formado por proteínas não expressas normalmente por uma célula precursora do tumor), ou podem ser uma proteína que é

normalmente expressa em uma célula precursora do tumor, mas que possui uma mutação característica de um tumor. Outros antígenos incluem variantes mutantes da proteína normal que possuem uma atividade alterada ou uma distribuição subcelular, por exemplo, mutações de genes que dão origem aos antígenos tumorais.

Exemplos não limitantes específicos de antígenos tumorais incluem: CEA, antígeno específico da próstata (PSA), HER-2/neu, BAGE, GAGE, MAGE 1-4, 6 e 12, MUC (Mucina) (por exemplo, MUC-1, MUC-2 etc.), gangliosídeos GM2 e GD2, ras, myc, tirosinase, MART (antígeno de melanoma), Pmel 17 (gp100), sequência V do íntron GnT-V (sequência V do íntron de N-acetilglucoaminiltransferase V), Ca psm da Próstata, PRAME (antígeno de melanoma), β -catenina, MUM-1-B (produto gênico mutado ubíquo do melanoma), GAGE (antígeno de melanoma) 1, BAGE (antígeno de melanoma) 2-10, c-ERB2 (Her2/neu), EBNA (antígeno nuclear do vírus de Epstein-Barr) 1-6, gp75, vírus do papiloma humano (HPV) E6 e E7, p53, proteína de resistência do pulmão (LRP), Bcl-2 e Ki-67. Além disso, a molécula imunogênica pode ser um auto-antígeno envolvido na iniciação e/ou propagação de uma doença autoimune, cuja patologia é, em grande parte, causada pela atividade de anticorpos específicos para uma molécula expressa pelo órgão-alvo, tecido ou células relevantes, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou miastenia grave (MG). Nessas doenças, pode ser desejável direcionar uma resposta imunológica mediada por anticorpo contínua (ou seja, uma do tipo Th2) ao auto-antígeno relevante em direção a uma resposta imunológica celular (ou seja, uma do tipo Th1).

Alternativamente, pode ser desejável evitar o surgimento ou diminuir o nível de uma resposta Th2 ao auto-antígeno em um indivíduo que não possui, mas com suspeita de ser suscetível à doença autoimune relevante por indução profilática de uma resposta Th1 ao auto-antígeno apropriado. Auto-antígenos de interesse incluem, sem limitação: (a) com relação ao LES, a proteína de Smith, ribonucleoproteína RNP e as proteínas SS-A e SS-B; e (b) com relação à MG, o receptor de acetilcolina. Exemplos de outros antígenos diversos envolvidos em um ou mais tipos de resposta autoimune incluem, por exemplo, hormônios endógenos, tais como hormônio luteinizante, hormônio de estimulação folicular, testosterona, hormônio do crescimento, prolactina, e outros hormônios.

Antígenos envolvidos em doenças autoimunes, alergia e rejeição de enxertos podem ser usados nas composições e nos métodos da invenção. Por exemplo, um antígeno envolvido em uma ou mais das seguintes doenças ou distúrbios autoimunes pode ser usado na presente invenção: diabetes, diabetes melito, artrite (incluindo artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, osteoartrite, artrite psoriática), esclerose múltipla, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, tireoidite autoimune, dermatite (incluindo dermatite atópica e dermatite eczematosa), psoríase, síndrome de Sjögren, incluindo ceratoconjuntivite seca secundária à síndrome de Sjögren, alopecia areata, respostas alérgicas causadas por reações à picada de artrópodes, doença de Crohn, úlcera aftosa, irite, conjuntivite, ceratoconjuntivite, colite ulcerativa, asma, asma alérgica, lúpus eritematoso cutâneo, esclerodermia,

vaginite, proctite, erupções farmacológicas, reações de reversão de lepra, eritema nodoso da lepra, uveíte autoimune, encefalomielite alérgica, encefalopatia hemorrágica necrotizante aguda, perda auditiva neurossensorial idiopática bilateral progressiva, anemia aplásica, anemia pura de células vermelhas, trombocitopenia idiopática, policondrite, granulomatose de Wegener, hepatite crônica ativa, síndrome de Stevens-Johnson, espru idiopático, líquen plano, doença de Crohn, oftalmopatia de Graves, sarcoidose, cirrose biliar primária, uveíte posterior e fibrose pulmonar intersticial. Exemplos de antígenos envolvidos em doenças autoimunes incluem ácido glutâmico descarboxilase 65 (GAD 65), DNA nativo, proteína básica da mielina, proteína proteolipídica da mielina, componentes do receptor de acetilcolina, tireoglobulina e o receptor do hormônio estimulante da tireóide (TSH). Exemplos de antígenos envolvidos em alergia incluem antígenos do pólen como, por exemplo, antígenos do pólen do cedro japonês, antígenos do pólen da ambrósia, antígenos do pólen do azevém, antígenos derivados de animais, tais como antígenos de ácaros e antígenos felinos, antígenos de histocompatibilidade e penicilina, e outros fármacos terapêuticos. Exemplos de antígenos envolvidos em rejeição de enxertos incluem componentes antigênicos do enxerto a serem transplantados no receptor do enxerto como, por exemplo, componentes de enxerto cardíaco, pulmonar, hepático, pancreático, renal e neural. O antígeno pode ser um ligante peptídico alterado útil no tratamento de uma doença autoimune.

Como aqui usado, o termo "epitopo(s)" refere-se a um

antígeno peptídico ou protéico que inclui uma estrutura primária, secundária ou terciária similar a um epitopo localizado dentro de qualquer um entre diversos polipeptídeos do patógeno codificados pelo DNA ou RNA do patógeno. O nível de similaridade geralmente será em um grau tal que anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos contra esses polipeptídeos se ligarão, reagirão ou de algum outro modo reconhecerão o antígeno peptídico ou protéico. Podem ser empregados vários métodos de imunoensaio em conjunto com esses anticorpos, tais como, por exemplo, *Western blotting*, ELISA, RIA, e semelhantes, todos os quais são conhecidos por aqueles habilitados na técnica. A identificação de epitopos do patógeno e/ou de seus equivalentes funcionais adequados para uso em vacinas é parte da presente invenção. Uma vez isolados e identificados, os equivalentes funcionais podem ser facilmente obtidos. Por exemplo, pode-se empregar os métodos de Hopp, como ensinado na Patente U.S. N° 4.554.101, aqui incorporada por referência, que ensina a identificação e preparação de epitopos a partir de seqüências de aminoácidos com base na hidrofiliabilidade. Os métodos descritos em vários outros trabalhos, e programas de computador neles baseados, também podem ser usados para identificar seqüências epitópicas centrais (veja, por exemplo, Jameson e Wolf, 1988; Wolf e cols., 1988; Patente U.S. N° 4.554.101). A seqüência de aminoácidos dessas "seqüências epitópicas centrais" pode então ser facilmente incorporada em peptídeos, por meio da aplicação de síntese peptídica ou por tecnologia recombinante.

A preparação de composições de vacina que incluem os

ácidos nucleicos que codificam antígenos da invenção como o ingrediente ativo pode ser feita como injetáveis, como soluções ou suspensões líquidas; formas sólidas adequadas à solução ou suspensão em um líquido antes da infecção também
5 podem ser preparadas. A preparação pode ser emulsificada, encapsulada em lipossomos. Os ingredientes imunogênicos ativos são freqüentemente misturados com veículos que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo.

10 O termo "veículo farmacologicamente aceitável" refere-se a um veículo que não causa uma reação alérgica ou outro efeito indesejável nos indivíduos aos quais é administrado. Veículos farmacologicamente aceitáveis adequados incluem, por exemplo, um ou mais de água, solução salina, solução
15 salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol, etanol, ou semelhantes, e combinações destes. Além disso, se desejado, a vacina pode conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares, tais como agentes umidificantes e emulsificantes, agentes de tamponamento do pH e/ou
20 adjuvantes que aumentam a eficácia da vacina. Exemplos de adjuvantes que podem ser eficazes incluem, sem limitação: hidróxido de alumínio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, MTP-PE e RIBI, que contém três componentes
25 extraídos de bactérias, monofosforil lipídeo A, trehalose dimicolato e esqueleto da parede celular (MPL + TDM + CWS) em uma emulsão 2% de esqualeno/Tween 80. Outros exemplos de adjuvantes incluem DDA (brometo de dimetildioctadecilamônio), adjuvantes completo e incompleto
30 de Freund e QuilA. Além disso, substâncias de modulação

imune como, por exemplo, linfocinas (por exemplo, IFN- γ , IL-2 e IL-12) ou indutores sintéticos de IFN- γ , tais como poli I:C, podem ser usados em combinação com os adjuvantes aqui descritos.

5 Os produtos farmacêuticos podem incluir um polinucleotídeo *naked* com uma única cópia ou com múltiplas cópias das seqüências de nucleotídeos específicas que se ligam a sítios de ligação de DNA específicos das apolipoproteínas presentes em lipoproteínas plasmáticas
10 como descrito na presente invenção. O polinucleotídeo pode codificar um peptídeo biologicamente ativo, RNA anti-senso, ou ribozima, e será fornecido em uma forma administrável fisiologicamente aceitável. Outro produto farmacêutico que pode surgir da presente invenção pode incluir uma fração de
15 lipoproteína plasmática altamente purificada, isolada de acordo com a metodologia aqui descrita do sangue dos pacientes ou de outra fonte, e um polinucleotídeo que contém uma única cópia ou múltiplas cópias das seqüências de nucleotídeos específicas que se ligam aos sítios de
20 ligação de DNA específicos das apolipoproteínas presentes em lipoproteínas plasmáticas, pré-ligado à fração de lipoproteína purificada em uma forma administrável fisiologicamente aceitável.

Ainda outro produto farmacêutico pode incluir uma
25 fração de lipoproteína plasmática altamente purificada que contém fragmentos de apolipoproteína recombinante que contém uma única cópia ou múltiplas cópias de motivos de ligação de DNA específicos, pré-ligados a um polinucleotídeo que contém uma única cópia ou múltiplas
30 cópias das seqüências de nucleotídeos específicas, em uma

forma administrável fisiologicamente aceitável. Ainda outro produto farmacêutico pode incluir uma fração de lipoproteína plasmática altamente purificada que contém fragmentos de apolipoproteína recombinante que contém uma
5 única cópia ou múltiplas cópias de motivos de ligação de DNA específicos, pré-ligados a um polinucleotídeo que contém uma única cópia ou múltiplas cópias das seqüências de nucleotídeos específicas, em uma forma administrável fisiologicamente aceitável.

10 A dosagem a ser administrada depende, em grande parte, do peso corporal e da condição física do indivíduo que está sendo tratado, bem como da via de administração e da frequência de tratamento. Uma composição farmacêutica que inclui o polinucleotídeo *naked* pré-ligado a uma fração de
15 lipoproteína altamente purificada pode ser administrada em quantidades que variam de 1 µg a 1 mg de polinucleotídeo e 1 µg a 100 mg de proteína.

A administração de um rAb e de complexos de rAb a um paciente irá seguir protocolos gerais para a administração
20 de quimioterápicos, levando-se em conta a toxicidade, se houver, do vetor. Antecipa-se que os ciclos de tratamento seriam repetidos, se necessário. Contempla-se também que várias terapias padronizadas, bem como intervenções cirúrgicas, podem ser aplicadas em combinação com a terapia
25 gênica descrita.

Quando a aplicação clínica de uma terapia gênica é contemplada, será necessário preparar o complexo como uma composição farmacêutica adequada à aplicação desejada. Geralmente, isso engloba o preparo de uma composição
30 farmacêutica que é basicamente livre de pirógenos, assim

como de outras impurezas que poderiam ser danosas a seres humanos ou animais. Geralmente, também será desejável empregar sais e tampões apropriados para tornar o complexo estável e permitir a captação do complexo pelas células-alvo.

As composições aquosas da presente invenção podem incluir uma quantidade eficaz do composto, dissolvida ou dispersa em um veículo ou meio aquoso farmacêuticamente aceitável. Essas composições também podem ser denominadas inóculos. O uso desses meios e agentes para substâncias farmacêuticas ativas é bem conhecido na técnica. Exceto se quaisquer meios ou agentes convencionais forem incompatíveis com o ingrediente ativo, seu uso nas composições terapêuticas será contemplado. Ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições. As composições da presente invenção podem incluir preparações farmacêuticas clássicas. Dispersões também podem ser preparadas em glicerol, polietileno glicóis líquidos, e misturas destes, e em óleos. Sob condições normais de armazenamento e uso, essas preparações contêm um conservante para evitar o crescimento de microorganismos.

Estados de doença. Dependendo da doença em particular a ser tratada, a administração de composições terapêuticas de acordo com a presente invenção será feita através de qualquer via comum, desde que o tecido-alvo esteja disponível através daquela via a fim de maximizar a liberação de antígeno a um local para uma resposta imunológica máxima (ou, em alguns casos, mínima). A administração geralmente será por injeção ortotópica,

intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa. Outras áreas para liberação incluem: via oral, nasal, bucal, retal, vaginal ou tópica. A administração tópica seria particularmente vantajosa para o tratamento de cânceres da pele. Tais composições normalmente seriam administradas como composições farmacêuticamente aceitáveis que incluem veículos, tampões ou outros excipientes fisiologicamente aceitáveis.

As composições de vacina ou de tratamento da invenção podem ser administradas parenteralmente, por injeção, por exemplo, por via subcutânea ou intramuscular. Formulações adicionais que são adequadas a outros modos de administração incluem supositórios e, em alguns casos, formulações orais ou formulações adequadas à distribuição como aerossóis. No caso das formulações orais, a manipulação de subconjuntos de células T que emprega adjuvantes, envolvimento de antígeno ou a adição de citocinas individuais a várias formulações resulta em vacinas orais aprimoradas com respostas imunológicas otimizadas. Para supositórios, aglutinantes e veículos tradicionais podem incluir, por exemplo, polialquileno glicóis ou triglicerídeos; esses supositórios podem ser formados por misturas que contêm o ingrediente ativo na faixa de 0,5% a 10%, preferivelmente 1%-2%. Formulações orais incluem excipientes normalmente empregados como, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, estearato de magnésio de amido, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, e semelhantes. Essas composições assumem a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações ou pós de liberação sustentada, e

contêm 10%-95% de ingrediente ativo, preferivelmente 25-70%.

Os ácidos nucleicos que codificam o antígeno da invenção podem ser formulados nas composições de vacina ou
5 tratamento como formas neutras ou de sal. Sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais de adição ácida (formados com grupos amino livres do peptídeo) e que são formados com ácidos inorgânicos como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou com ácidos orgânicos
10 como, por exemplo, ácido acético, oxálico, tartárico, maléico, e semelhantes. Sais formados com os grupos carboxil livres também podem ser derivados de bases inorgânicas como, por exemplo, hidróxido de sódio, potássio, amônio, cálcio ou férrico, e bases orgânicas como
15 isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, e semelhantes.

As composições de vacina ou tratamento são administradas de uma forma compatível com a formulação da dosagem, e em tal quantidade que será profilática e/ou
20 terapeuticamente eficaz. A quantidade a ser administrada depende do indivíduo a ser tratado, incluindo, por exemplo, a capacidade do sistema imunológico do indivíduo para sintetizar anticorpos, e do grau de proteção ou tratamento desejado. Faixas de dosagem adequadas são da ordem de
25 várias centenas de microgramas de ingrediente ativo por vacinação com uma faixa de cerca de 0,1 mg a 1.000 mg, por exemplo, na faixa de cerca de 1 mg a 300 mg e, preferivelmente, na faixa de cerca de 10 mg a 50 mg. Os regimes adequados para administração inicial e injeções de
30 reforço também são variáveis, mas são tipificados por uma

administração inicial, seguida por inoculações ou outras administrações subseqüentes. As quantidades precisas de ingrediente ativo que precisam ser administradas dependem da avaliação do profissional, e podem ser específicas para cada pessoa. Ficará claro para aqueles habilitados na técnica que a quantidade terapeuticamente eficaz de molécula de ácido nucléico ou de polipeptídeos de fusão desta invenção dependerá, *inter alia*, da posologia de administração, da dose unitária de antígeno administrada, de se a molécula de ácido nucléico ou o polipeptídeo de fusão é administrado em combinação com outros agentes terapêuticos, do estado imunológico e da saúde do receptor, e da atividade terapêutica da molécula de ácido nucléico ou do polipeptídeo de fusão em particular.

As composições podem ser dadas em uma posologia de dose única ou de doses múltiplas. Uma posologia de doses múltiplas é aquela na qual um esquema primário de vacinação pode incluir, por exemplo, 1-10 doses separadas, seguidas por outras doses dadas em intervalos de tempo subseqüentes necessários para manter e/ou reforçar a resposta imunológica, por exemplo, em 1-4 meses para uma segunda dose e, se necessário, uma dose(s) subseqüente(s) após vários meses. Reforços periódicos em intervalos de 1-5 anos, normalmente 3 anos, são desejáveis para manter os níveis desejáveis de imunidade protetora. A evolução da imunização pode ser acompanhada por ensaios de proliferação *in vitro* de linfócitos do sangue periférico (PBLs) co-cultivados com ESAT6 ou ST-CF, e pela medida dos níveis de IFN- γ liberados pelos linfócitos sensibilizados. Os ensaios podem ser realizados com a utilização de marcadores

convencionais, tais como radionucleotídeos, enzimas, marcadores fluorescentes, e semelhantes. Essas técnicas são conhecidas por aqueles habilitados na técnica e podem ser encontradas nas Patentes U.S. Nºs 3.791.932, 4.174.384 e 3.949.064, cujas porções relevantes são aqui incorporadas por referência.

O carreador modular de rAb e/ou complexo conjugado veículo de rAb-(coesina/doquerina e/ou doquerina-coesina)-antígeno (vacina de rAb-DC/DC-antígeno) pode ser fornecido em uma ou mais "doses unitárias", dependendo de se os vetores de ácido nucléico são usados, das proteínas purificadas finais ou da forma de vacina final usada. A dose unitária é definida como contendo uma quantidade predeterminada da composição terapêutica calculada para produzir as respostas desejadas em associação com sua administração, ou seja, a via e o regime de tratamento apropriados. A quantidade a ser administrada, e a via e formulação em particular, estão dentro dos conhecimentos daqueles habilitados nas técnicas clínicas. O indivíduo a ser tratado também pode ser avaliado, em particular o estado do sistema imunológico do indivíduo e a proteção desejada. Uma dose unitária não precisa ser administrada como uma injeção única, mas pode incluir a infusão contínua ao longo de um período de tempo definido. A dose unitária da presente invenção pode convenientemente ser descrita em termos de DNA/kg (ou proteína/kg) de peso corporal, com faixas entre cerca de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,5, 1, 10, 50, 100, 1.000 ou mais mg/DNA ou proteína/kg de peso corporal sendo administradas. Da mesma forma, a quantidade de vacina de rAb-DC/DC-antígeno liberada pode variar de

cerca de 0,2 a cerca de 8,0 mg/kg de peso corporal. Dessa forma, em modalidades particulares, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,8 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 4,0 mg, 5,0 mg, 5,5 mg, 6,0 mg, 6,5 mg, 7,0 mg e 7,5 mg da vacina podem ser liberados a um indivíduo *in vivo*. A dosagem de vacina de rAb-DC/DC-antígeno a ser administrada depende, em grande parte, do peso e da condição física do indivíduo que está sendo tratado, bem como da via de administração e da frequência de tratamento. Uma composição farmacêutica que inclui um polinucleotídeo *naked* pré-ligado a um vetor de liberação lipossômica ou viral pode ser administrada em quantidades que variam de 1 µg a 1 mg de polinucleotídeo até 1 µg a 100 mg de proteína. Dessa forma, composições particulares podem incluir entre cerca de 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg ou 1.000 µg de polinucleotídeo ou proteína que estejam ligados independentemente a 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 1 mg, 1,5 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg ou 100 mg de vetor.

A presente invenção foi testada em um sistema celular *in vitro* que mede a estimulação imune de células T humanas Flu-específicas por células dendríticas às quais o antígeno de Flu foi dirigido. Os resultados aqui apresentados demonstram a expansão específica dessas células antígeno-específicas em doses do antígeno que são, por elas próprias, ineficazes nesse sistema.

A presente invenção também pode ser usada para

produzir um carreador modular de rAb, ou seja, por exemplo, um mAb recombinante humanizado (dirigido a um receptor de célula dendrítica humana específico) em complexo com antígenos protetores de Ricina, toxina de Antraz e enterotoxina de estafilococo B. O mercado potencial para esse produto é a vacinação de todo o pessoal militar e a vacina armazenada mantida em reserva para ser administrada em grandes centros populacionais em resposta a qualquer ameaça biológica relacionada a esses agentes. A invenção possui uma aplicação ampla para o design de vacinas em geral, para uso tanto em seres humanos quanto em animais. As indústrias de interesse incluem as indústrias farmacêuticas e de biotecnologia.

A presente invenção inclui composições e métodos, incluindo vacinas, que direcionam especificamente (liberam) antígenos às células apresentadoras de antígeno (APCs) com a finalidade de despertar respostas imunológicas potentes e amplas dirigidas contra o antígeno. Essas composições despertam respostas imunológicas protetoras ou terapêuticas contra o agente (patógeno ou câncer) do qual o antígeno foi derivado. Além disso, a invenção cria agentes que são diretamente (ou associados a outros agentes) terapêuticos por meio de sua ligação específica a um receptor denominado DC-ASGPR que é expresso em células apresentadoras de antígeno.

Dectina-1 (CLEC7A; G.D. Brown, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006), páginas 33-43.) foi relatada originalmente como uma molécula específica da célula dendrítica (DC) com uma capacidade co-estimuladora de células T (N. Kanazawa e cols., *J. Biol. Chem.* 278 (2003), páginas 32.645-32.652),

mas mais tarde sua expressão foi encontrada mais fortemente em monócitos, macrófagos e neutrófilos, e fracamente em um subconjunto de células T e, em seres humanos, células B e eosinófilos. Mais importante, foi determinado que Dectina-1 reconhece β -glucano fúngico como o principal receptor não opsônico e é crucial para os efeitos biológicos de β -glucano (G.D. Brown, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006), páginas 33-43.). A expressão de Dectina-1 em macrófagos é supra-regulada por IL-4 e IL-13, e infra-regulada por LPS, bem como por IL-10 e dexametasona. Dectina-1 contém exclusivamente ITAM em sua região citoplasmática e, na verdade, funciona como um receptor de ativação na ausência de qualquer molécula adaptadora. A estrutura de seu ITAM também é única. Comparada com a sequência de consenso que contém duas repetições de YxxL/I (tirosina-qualquer-qualquer-leucina ou isoleucina) (S.J. van Vliet e cols., *Int Immunol* 17 (2005), páginas 661-669, três resíduos de aminoácido são inseridos entre a primeira tirosina e a leucina ou isoleucina seguinte (YxxxL/I) na Dectina-1 de camundongo ou humana, respectivamente. Na verdade, a fosforilação apenas da segunda tirosina foi supostamente suficiente para o recrutamento de Syk e vários efeitos ativadores de Dectina-1 como, por exemplo, indução de fagocitose, produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e produção de citocina mediada por ativação de fator nuclear (NF)- κ B. No entanto, Syk só era necessário para alguns desses efeitos em certos tipos de células (macrófago ou DCs). Além disso, alguns desses efeitos necessitavam da cooperação com sinalização de TLR mediada por MyD88. Notavelmente, o sinal de Dectina-1 em DCs também induziu a

produção de IL-10 de uma forma Syk-dependente. Curiosamente, β -glucano é exposto na superfície de células de levedura apenas sob algumas condições específicas, e a perda do sinal de Dectina-1 pode explicar por que alguns
5 fungos escapem da vigilância imunológica do hospedeiro (S.E. Heinsbroek e cols., *Trends Immunol.* **26** (2005), páginas 352-354). Além disso, há relatos de que o sinal mediado por Dectina-1 promove a indução de artrite autoimune no camundongo SKG geneticamente predisposto (ZAP-
10 70-mutado) (H. Yoshitomi e cols., *J. Exp. Med.* **201** (2005), páginas 949-960). Considerando que antígenos de *Candida* têm sido usados amplamente para a indução de vários modelos de doença autoimune (E.C. Keystone e cols., *Arthritis Rheum* **20** (1977), páginas 1396-1401), Dectina-1 pode participar da
15 quebra a auto-tolerância. Sua possível associação com células T reguladoras, similar àquela da Dectina-2 (E.P. McGreal, M. Rosas, G.D. Brown, S. Zamze, S.Y. Wong e S. Gordon e cols., *Glycobiology* **16** (2006), páginas 422-430), no entanto, permanece a ser elucidada.

20 As DCs podem apresentar de forma cruzada antígenos protéicos (Rock K.L., *Immunol. Rev.*, outubro de 2005; **207**: 166-83). *In vivo*, DCs recolhem antígenos por meio de diversos receptores e apresentam peptídeos antigênicos tanto na classe I quanto na classe II. Nesse contexto,
25 Lectinas de DC, como receptores de reconhecimento de padrão, contribuem para a captação eficiente de antígenos, assim como para a apresentação cruzada de antígenos.

A presente invenção inclui o desenvolvimento, caracterização e uso de anticorpos monoclonais (mAbs) anti-
30 Dectina-1 humana e a caracterização de suas funções

biológicas que levam à descoberta de aplicações terapêuticas prováveis de mAbs anti-Dectina-1 e seus substitutos. A revelação da invenção apresenta meios para o desenvolvimento de agentes únicos capazes de ativar células que abrigam Dectina-1, bem como o efeito das alterações resultantes em células que recebem esses sinais em relação à ação sobre outras células no sistema imunológico. Esses efeitos [tanto isoladamente, quanto em relação a outros sinais (ou seja, co-estimulação)] são altamente preditivos dos resultados terapêuticos para certos estados de doença ou para o aumento dos resultados protetores no contexto de vacinação.

Materiais e métodos

Anticorpos e tetrâmeros - Anticorpos (Abs) para a coloração de superfície de DCs e células B, incluindo Abs de controle de isótipo, foram adquiridos de BD Biosciences (CA). Abs para ELISA foram adquiridos de Bethyl (TX). Anti-BLyS e anti-APRIL foram adquiridos de PeproTech (NJ). Tetrâmeros, HLA-A*0201-GILGFVFTL (Flu M1) e HLA-A*0201-ELAGIGILTV (Mart-1) foram adquiridos de Beckman Coulter (CA).

Células e culturas - Monócitos ($1 \times 10^6/\text{ml}$) de doadores normais foram cultivados em meio Cellgenics (França) contendo GM-CSF (100 ng/ml) e IL-4 (50 ng/ml) (R&D, CA). Para o 3° dia e 6° dia, DCs, nas mesmas quantidades de citocinas, foram suplementadas no meio no 1° dia e no 3° dia, respectivamente. As células B foram purificadas com um kit de isolamento negativo (BD). Células T CD4 e CD8 foram purificadas com glóbulos magnéticos revestidos com anti-CD4 ou CD8 (Milteniy, CA). As PBMCs

foram isoladas de camadas de células brancas usando gradientes Percoll™ (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) por centrifugação por gradiente de densidade. Para ativação de DC, 1×10^5 DCs foram cultivadas na placa de 96 poços revestida com mAb por 16-18 horas. mAbs (1-2 µg/poço) em tampão de carbonato, pH 9,4, foram incubados por pelo menos 3 horas a 37°C. Os sobrenadantes da cultura foram coletados e as citocinas / quimiocinas foram medidas por Luminex (Biorad, CA). Para análise gênica, as DCs foram cultivadas nas placas revestidas com mAbs por 8 horas. Em alguns estudos, 50 ng/ml de CD40L solúvel (R&D, CA) ou 50 nM de CpG (Invivogen, CA) foram adicionados nas culturas. Nas co-culturas de DCs e de células B, 5×10^3 DCs ressuspensas em RPMI 1640 com FCS 10% e antibióticos (Biosource, CA) foram inicialmente cultivadas nas placas revestidas com mAbs por pelo menos 6 horas, e depois 1×10^5 de células B autólogas purificadas marcadas com CFSE (Molecular Probes, OR) foram adicionadas. Em alguns estudos, as DCs foram pulsadas com 5 moi (multiplicidade de infecção) de vírus influenza inativado pelo calor (A/PR/8 H1N1) por 2 horas, e depois misturadas com células B. Para as co-culturas de DCs e células T, 5×10^3 DCs foram cultivadas com 1×10^5 células T CD8 autólogas purificadas ou células T alogênicas mistas. As células T alogênicas foram pulsadas com 1 µCi/poço de $^3\text{[H]}$ -timidina pelas 18 horas finais de incubação, e depois as cpm foram medidas por um contador beta (Wallac, MN). 5×10^5 PBMCs /poço foram cultivadas nas placas revestidas com mAbs. A frequência de células T CD8 específicas para Mart-1 e Flu M1 foi medida por coloração das células com anti-CD8 e

tetrâmeros no 10º dia e no 7º dia das culturas, respectivamente. Dez µM de peptídeo Mart-1 (ELAGIGILTV) e 20 nM de proteína recombinante contendo peptídeos Mart-1 (veja abaixo) foram adicionados às culturas de DCs e células T CD8. Vinte nM de proteína Flu M1 recombinante purificada (veja abaixo) foram adicionados às culturas de PBMCs.

Anticorpos monoclonais - Foram gerados mAbs de camundongo por tecnologia convencional. Resumidamente, camundongos BALB/c com seis semanas de idade foram imunizados i.p. com 20 µg de proteína de fusão de ectodomínio de receptor.hIgGFc com adjuvante Ribi, e depois com reforços com 20 µg de antígeno dez e quinze dias mais tarde. Após três meses, os camundongos receberam reforços novamente três dias antes da retirada dos baços. Alternativamente, os camundongos foram injetados no coxim da pata com 1-10 µg de antígeno em adjuvante Ribi a cada três a quatro dias ao longo de um período de trinta a quarenta dias. Três a quatro dias após um reforço final, os linfonodos de drenagem foram coletados. Células B do baço ou células de linfonodos foram fundidas com células SP2/O-Ag 14. Os sobrenadantes do hibridoma foram avaliados para analisar Abs para a proteína de fusão do ectodomínio de receptor comparada com o parceiro de fusão isoladamente, ou com o ectodomínio de receptor fundido à fosfatase alcalina (15). Os poços positivos foram então avaliados em FACS usando células 293F transfectadas transitoriamente com plasmídeos de expressão que codificam cDNAs do receptor de comprimento total. Os hibridomas selecionados foram clonados e expandidos por célula única em frascos CELLline

(Integra, CA). Os sobrenadantes do hibridoma foram misturados com um volume igual de glicina 1,5 M, NaCl 3 M, 1x PBS, pH 7,8 e precipitados com resina MabSelect. A resina foi lavada com tampão de ligação e eluída com glicina 0,1 M, pH 2,7. Após neutralização com Tris 2 M, os mAbs foram dialisados versus PBS.

ELISA - ELISA em sanduíche foi realizada para medir IgM, IgG e IgA totais, bem como imunoglobulinas (Igs) flu-específicas. Soro humano padronizado (Bethyl) contendo quantidades conhecidas de Igs e soro humano AB foram usados como padrão para Igs totais e Igs flu-específicas, respectivamente. As titulações de Ab Flu-específico nas amostras, em unidades, foram definidas como o fator de diluição de soro AB que mostra uma densidade óptica idêntica. As quantidades de BAFF e BLyS foram medidas por kits de ELISA (Bender MedSystem, CA).

Purificação e análise gênica de RNA - O RNA total foi extraído com colunas RNeasy (Qiagen) e analisado com o Bioanalisador 2100 (Agilent). Foram preparados alvos de cRNA marcado com biotina usando o kit de marcação "Illumina totalprep" (Ambion) e hibridizados para "Sentrix Human6 BeadChips" (transcritos de 46 K). Esses microarranjos consistem em sondas de oligonucleotídeos de 50mer anexadas a glóbulos de 3 µm que são alojados em micropoços entalhados na superfície de um wafer de silício. Após coloração com Estreptavidina-Cy3, é feita uma imagem da superfície do arranjo usando um escâner de resolução submícron fabricado por Illumina (Beadstation 500X). Um software de análise de expressão gênica, GeneSpring, Versão 7.1 (Agilent), foi usado para realizar a análise dos dados.

Expressão e purificação de proteínas Flu M1 e MART-1 recombinantes - PCR foi usada para amplificar o ORF (*open readig frame* - quadro de leitura aberta) do gene M1 de Influenza A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai (H1N1), incorporando um sítio de Nhe I distal ao códon iniciador e um sítio de Not I distal ao códon de parada. O fragmento digerido foi clonado em pET-28b(+) (Novagen), colocando o ORF de M1 *in frame* com um tag de His6, codificando, dessa forma, His.proteína Flu M1. Um derivado pET28b (+) que codifica um domínio de coesina do terminal N de 169 resíduos de *C. thermocellum* (não publicado) inserido entre os sítios de Nco I e Nhe I expressou Coh.His. Para expressão de Coesina-Flex-hMART-1-PeptideA-His, a sequência

GACACCACCGAGGCCCGCCACCCCCACCCCCCGTGACCACCCCCACCACCACCGACCG
 GAAGGGCACCACCGCCGAGGAGCTGGCCGGCATCGGCATCCTGACCGTGATCCTGGGCG
 GCAAGCGGACCAACAACAGCACCCCCACCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACAC
 TGGCGGCCG (ID. DE SEQ. N°: 1) (que codifica
 DTTEARHPHPVTTPTTDRKGTTAEELAGIGILTVILGGKRTNNSTPTKGEFCRYPSHW
 RP (ID. DE SEQ. N°: 2) - os resíduos sombreados são o
 peptídeo imunodominante HLA-A2-restrito e os resíduos
 sublinhados que circundam o peptídeo são de MART-1) - foi inserida entre os sítios de Nhe I e Xho I do vetor acima. As proteínas foram expressas em *E. coli* cepa BL21 (DE3) (Novagen) ou T7 Express (NEB), desenvolvidas em LB a 37°C com seleção para resistência à canamicina (40 µg/ml) e agitação a 200 rodadas/min até crescimento em fase *mid log*, quando 120 mg/l de IPTG foram adicionados. Após três horas, as células foram coletadas por centrifugação e armazenadas a -80°C. As células de *E. coli* de cada litro de fermentação foram ressuspensas em 30 ml de Tris 50 mM gelado, EDTA 1 mM

pH 8,0 (tampão B) com 0,1 ml de coquetel de inibidor de protease II (Calbiochem, CA). As células foram sonificadas no gelo 2 x 5 min no ajuste 18 (Fisher Sonic Dismembrator 60) com um período de repouso de 5 min, e depois
5 centrifugadas a 17.000 r.p.m. (Sorvall SA-600) por 20 min a 4°C. Para purificação de His.Flu M1, a fração de 50 ml do sobrenadante do lisado de células foi passada através de glóbulos de Q Sefarose de 5 ml e 6,25 ml de Tris 160 mM, imidazol de 40 mM, NaCl 4 M pH 7,9 foram adicionados ao
10 fluxo de Q Sefarose. Essa foi carregada a 4 ml/min em uma coluna HP quelante 5 ml HiTrap carregada com Ni⁺⁺. A proteína ligada à coluna foi lavada com NaPO₄ 20 mM, NaCl 300 mM pH 7,6 (tampão D), seguida por outra lavagem com H₃COONa 100 mM pH 4,0. A proteína ligada foi eluída com
15 H₃COONa 100 mM pH 4,0. As frações de pico foram reunidas em pool e carregadas a 4 ml/min em uma coluna HiTrap S de 5 ml equilibrada com H₃COONa 100 mM pH 5,5, e lavadas com o tampão de equilíbrio, seguida por eluição com um gradiente de 0 - 1 M de NaCl em NaPO₄ 50 mM pH 5,5. As frações de
20 pico que eluem em cerca de 500 mM de NaCl foram reunidas em um pool. Para purificação de Coh.Flu M1.His, células de 2 litros de cultura foram lisadas da forma acima. Após centrifugação, 2,5 ml de Triton X114 foram adicionados ao sobrenadante com incubação no gelo por 5 minutos. Após
25 incubação adicional a 25°C por 5 min, o sobrenadante foi separado do Triton X114 após centrifugação a 25°C. A extração foi repetida e o sobrenadante foi passado através de glóbulos de Q Sefarose de 5 ml e 6,25 ml de Tris 160 mM, imidazol 40 mM, NaCl 4 M pH 7,9 foram adicionados ao fluxo
30 de Q Sefarose. A proteína foi então purificada por

cromatografia quelante de Ni^{++} , como descrito acima, e eluída com 0-500 mM de imidazol em tampão D.

mAbs anti-Dectina-1 - A invenção engloba seqüências de aminoácidos específicas mostradas abaixo que correspondem
 5 aos anticorpos monoclonais anti-LOX-1 que são componentes desejáveis (no contexto, por exemplo, de anticorpos recombinantes humanizados) de produtos terapêuticos ou protetores. A seguir, serão apresentadas seqüências desse tipo no contexto de anticorpos recombinantes com região V
 10 quimérica de camundongo (sublinhada) - região C humana (negrito). Essas regiões V de camundongo podem ser facilmente "humanizadas", ou seja, as regiões que combinam LOX-1 enxertadas em seqüências estruturais da região V humana, por aqueles habilitados na técnica. Além disso, as
 15 seqüências também podem ser expressas no contexto de proteínas de fusão que preservam a funcionalidade do anticorpo, mas adicionam, por exemplo, antígeno, citocina, ou toxina para as aplicações terapêuticas desejadas.

rAB-pIRES2[manti-Dectina_1_11B6.4_H-V-hIgG4H-C]
 20 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCSVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGMWTTGGANY
NSAFMSRLSINKDNSKSQVFLKMNNLQTD DTAIYYCVRDAVRYWNFDVWGAGTTVTVSS
AKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSVVTVPSSSLGT KTYTCNV DHKPSNTKV DKRVESKYGP PCPPCPAPEFEGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
 25 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGKAS (ID. DE SEQ. N°: 3).

rAB-pIRES2[manti-Dectina_1_11B6.4_K-V-hIgGK-C]
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWHYQQKPGSSPKPWIYATSHLASGVPA
 30 RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDTATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
LTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. DE SEQ. N°: 4).

rAB-pIRES2 [manti-Dectina_1_15E2.5_H-V-hIgG4H-C]

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSGYTN

5 YNQKFQKDKATLTADKSSSTASMQLSSLTSEDSAVYYCARERAVLVPIYAMDYWGQGTSTV

VSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV

LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFE

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

10 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV

DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAS (ID. DE SEQ. N°: 5).

rAB-pIRES2 [manti-Dectina_1_15E2.5_K-V-hIgGK-C]

QIVLTQSPAVMSASPGEKVTITCTASSSLSYMHWFQOKPGTSPKLWLYSTISILASGVPT

RFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSSPFTFGSGTKLEIKRTVAAPS VFIFP

15 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST

LTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. DE SEQ. N°: 6).

rAB-pIRES2 [mAnti-Dectina_1_2D8.2D4H-V-hIgG4H-C]

EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNQKSLEWIGNIDPYYGDTN

YNQKFQKDKATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCARPYGSEAYFAYWGQGTLLVTVS

20 AAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ

SSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ

EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK

25 SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKAS (ID. DE SEQ. N°: 7).

rAB-pIRES2 [mAnti-Dectina_1_2D8.2D4K-V-hIgGK-C]

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYAAQSIGIP

SRFSGSGSGSDFTLSINGVEPEDVGVYYCQNGHSFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFP

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS

30 TLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (ID. DE SEQ. N°: 8).

As seqüências da região V e seqüências relacionadas podem ser modificadas por aqueles habilitados na técnica para, por exemplo, aumentar a afinidade por Dectina-1 e/ou integrar em seqüências estruturais da região V humana para serem projetadas geneticamente em vetores de expressão para 5 dirigir a expressão de formas de proteína que podem se ligar à Dectina-1 em células apresentadoras de antígeno. Além disso, os outros mAbs revelados na invenção (ou derivados usando métodos e avaliações similares para a biologia única aqui revelada) podem ser transformados 10 através de meios similares (inicialmente por meio de clonagem e seqüenciamento por PCR de regiões V de hibridoma de camundongo) em construções de expressão que codificam anticorpos recombinantes (rAbs) similares. Essas regiões V anti-Dectina-1 podem, além disso, ser humanizadas (ou seja, seqüências de combinação camundongo-específicas enxertadas em seqüências estruturais da região V humana) por aqueles habilitados na técnica, de modo a minimizar a reatividade imunológica potencial do rAb terapêutico.

20 *Proteínas de fusão recombinantes de anticorpo anti-Dectina-1 recombinante - antígeno (rAb.antígeno) são vacinas prototípicas eficazes in vitro criadas por engenharia genética - Podem ser construídos vetores de expressão com seqüências codificadoras de proteína*
25 *diversas, por exemplo, fundidas in-frame à seqüência codificadora da cadeia H. Por exemplo, antígenos como, por exemplo, HA5 de Influenza, M1 de Influenza, gag do HIV ou peptídeos imunodominante de antígenos de câncer, ou citocinas, podem ser expressos subseqüentemente como*
30 *proteínas de fusão de rAb.antígeno ou rAb.citocina, as*

quais, no contexto desta invenção, podem ter utilidade derivada da utilização da sequência da região V anti-Dectina-1 para levar o antígeno ou citocina (ou toxina) diretamente até a superfície da célula apresentadora de antígeno que abriga Dectina-1. Isso permite a internalização, por exemplo, de antígeno - algumas vezes associada à ativação do receptor e assegurando a iniciação da ação terapêutica ou protetora (por exemplo, por meio da iniciação de uma resposta imunológica potente, ou por meio de morte da célula-alvo. Uma vacina prototípica exemplar baseada nesse conceito poderia usar um vetor da cadeia H como, por exemplo, rAB-pIRES2[manti-Dectina_1_11B6.4_H-LV-hIgG4H-C-Flex-FluHA1-1-6xHis], que dirige a síntese de uma proteína de fusão da região V da cadeia H do mAb de camundongo (sublinhada)-região C de IgG4 humana (em negrito)-Flu HA1-1 (em itálico). Co-expressa com o plasmídeo de expressão da cadeia leve análogo (que codifica a sequência mostrada acima), isso produz um anticorpo recombinante (rAb) multifuncional que se liga à Dectina-1 e libera o antígeno Flu HA1-1 à superfície celular para ativação de DC, internalização de antígeno, processamento de antígeno, apresentação de antígeno e educação e expansão de anti-Flu HA1-1 B e células T específicas. Construções da cadeia H similares com fusões a FluHA5-1, HIV Viralgag p24, e PSA (antígeno específico da próstata) também são mostradas abaixo.

rAB-pIRES2[manti-Dectina_1_11B6.4_H-LV-hIgG4H-C-Flex-FluHA1-1-6xHis]

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCSVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGVMTGGGANY
NSAFMSRLSINKDNSKSQVFLKMNNLQTD TAIYYCVRDAVRYWNFDVWGAGTTVTVSS

AKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE
5 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASDTTEPATPTTPVTTDTICIGYHANN
STDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED SHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWLLGNPECDPL
LPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNNHTN
GVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKSYVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQ
10 NLYQENENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQAGRMNYYWTLLKPGDTIIFEANGNL
IAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGECLKYV
RSAKLRMVHHHHHH (ID. DE SEQ. N°: 9).

rAB-pIRES2 [manti-Dectina_1_11B6.4_H-LV-hIgG4H-C-Flex-FluHA5-1-6xHis]

15 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCSVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGMWMTGGANY
NSAFMSRLSINKDNSKSQVFLKMNNLQTD DTAIYYCVRDAVRYWNFDVWGAGTTVTVSS
AKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
20 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASDTTEPATPTTPVTTDQICIGYHANN
STEQVD TIMEKNVTVTTHAQDILEKKHNGKLCDL DGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEF
INVPEWSYIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASL
25 GVSSACPYQGKSSFFRN VVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQT
KLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATR SKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNF
IAPEYAYKIVKKGDSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYV
KSNRLVLAHHHHHH (ID. DE SEQ. N°: 10).

rAB-pIRES2 [mAnti-Dectina_1_2D8.2D4H-LV-hIgG4H-Viralgag]

30

EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNNGKSLEWIGNIDPYYGDTN
 YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCARPYGSEAYFAYWGQGLTVTS
 AAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG
 5 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
 SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASDMAKKETVWRLEEFGRPIVQNIQG
 QMVHQAIAPRTLNAWVKVVEEKAFSPFVIMFSALESGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQ
 10 MLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPV
 GEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWM
 TETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVL (ID. DE SEQ.
 N°: 11) .

rAB-pIRES2 [mAnti-Dectina_1_2D8.2D4H-V-hIgG4H-C-hPSA]

15 EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNNGKSLEWIGNIDPYYGDTN
 YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCARPYGSEAYFAYWGQGLTVTS
 AAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
 20 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
 SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASDTTEPATPTTPVTTPTTTLLAPLI
 LSRIVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAH CIRNKS VILLGRHSL
 FHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHDLMLLRLSEPAELTDAVKVM
 25 DLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLC
 AGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTI
 VANP (ID. DE SEQ. N°: 12) .

Similarmente, rAB-pIRES2 [manti-Dectina_1_11B6.4_H-LV-
 hIgG4H-C-Doquerina] mostrado abaixo codifica uma cadeia H
 30 anti-Dectina-1 fundido à doquerina (seqüência mostrada

abaixo). A doquerina permite uma forte interação específica não covalente com proteínas de fusão de coesina-antígeno (coh.antígeno) que fornecem um meio alternativo de liberação de antígeno às DCs e outras células apresentadoras de antígeno.

rAB-pIRES2 [manti-Dectina_1_11B6.4_H-LV-hIgG4H-C-Doquerina]

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCSVSGFSLSNYDISWIRQPPGKGLEWLGVMWTGGGANY
NSAFMSRLSINKDNSKSQVFLKMNNLQTD TAIYYCVRDAVRYWNFDVWGAGTTVTVSS
 10 AKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSVSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKS
 15 RWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKASNSPQNEVLYGDVND DGKVNSTD LTL
 LKRYVLKAVSTLPSSKA EKNADVNRDGRVNSSDV TILSRYLIRVIEKLPI (ID. DE
 SEQ. N°: 13).

Métodos relacionados à clonagem e expressão de anticorpos recombinantes (rAbs) e rAb.antígenos

20 *Clonagem e expressão de cDNA mAbs quiméricos de camundongo/humanos* - RNA total foi preparado por células de hibridoma (RNeasy kit, Qiagen) e usado para síntese de cDNA e PCR (kit SMART RACE, BD Biosciences) usando os iniciadores 5' fornecidos e os iniciadores 3' gene-
 25 específicos:

mIgGκ,

5' ggatggtgggaagatggatacagttggtgcagcatc 3' (ID. DE
 SEQ. N°: 14);

mIgGλ,

30 5' ctaggaacagtcagcacgggacaaactcttctccacagtgtgaccttc 3'

(ID. DE SEQ. N°: 15);

mIgG1,

5' gtcactggctcagggaaatagcccttgaccaggcatc 3' (ID. DE
SEQ. N°: 16);

5 mIgG2a,

5' ccaggcatcctagagtcacccgaggagccagt 3' (ID. DE SEQ. N°:
17); e

mIgG2b,

5 'gggtgctggaggggacagtcactgagctgctcatagtgt 3' (ID. DE
10 SEQ. N°: 18).

Os produtos de PCR foram clonados (kit pCR2.1 TA,
Invitrogen) e caracterizados por seqüenciamento de DNA.
Usando as seqüências derivadas para os cDNAs da região V da
cadeia H e L de camundongo, foram usados iniciadores
15 específicos para amplificar por PCR o peptídeo sinalizador
e regiões V, incorporando, ao mesmo tempo, sítios de
restrição de flanqueamento para clonagem em vetores de
expressão que codificam regiões de IgGk ou IgG4H humanas
downstream. O vetor para a expressão de mVk-hIgk quimérico
20 foi construído por amplificação dos resíduos 401-731
(gi|63101937|) flanqueados por sítios de Xho I e Not I e
inserção destes no intervalo Xho I - Not I de pIRES2-DsRed2
(BD Biosciences). PCR foi usada para amplificar a região Vk
do mAb pelo códon iniciador, anexando um sítio de Nhe I ou
25 Spe I, e depois CACC, à região codificadora (por exemplo,
resíduo 126 de gi|76779294|), anexando um sítio de Xho I. O
fragmento de PCR foi então clonado no intervalo Nhe I - Not
I do vetor acima. O vetor para mVk-hIgk quimérico usando o
líder mSLAM foi construído por inserção da seqüência 5'
30 ctagttgctggcctaattggaccccaaaggctcccttttcttgagaataacttctgtttctc

tccctggccttttgagttgtcgtacggattaattaagggcccactcgag 3' (ID. DE
 SEQ. N°: 19) no intervalo Nhe I - Xho I do vetor acima. PCR
 foi usada para amplificar o intervalo entre o códon do
 terminal N códon maduro previsto (definido usando o SignalP
 5 3.0 Server) (16) e a extremidade da região mVκ (como
 definida acima), anexando, ao mesmo tempo, 5' tcgtacgga 3'.
 O fragmento digerido com Bsi WI e Xho I foi inserido nos
 sítios correspondentes do vetor acima. A sequência de
 controle de hIgκ corresponde aos resíduos 26-85 de
 10 gi|49257887| e aos resíduos 67-709 de gi|21669402|. O vetor
 de controle de hIgG4H corresponde aos resíduos 12-1.473 de
 gi|19684072| com as substituições S229P e L236E, que
 estabilizam uma ligação dissulfeto e interrompem a ligação
 de FcR residual (27), inseridos entre os sítios de Bgl II e
 15 Not I do vetor pIRES2-DsRed2, adicionando, ao mesmo tempo,
 a sequência 5' gctagctgattaattaa 3' (ID. DE SEQ. N°: 20) em
 vez do códon de parada. PCR foi usada para amplificar a
 região VH do mAb pelo códon iniciador, anexando CACC e, a
 seguir, um sítio de Bgl II à região que codifica o resíduo
 20 473 de gi|19684072|. O fragmento de PCR foi então clonado
 no intervalo Bgl II - Apa I do vetor acima. O vetor para a
 sequência quimérica de mVH-hIgG4 usando o líder mSLAM foi
 construído por inserção da sequência 5'
 ctagttgctggcctaattggaccccaaaggctcccttttcctggagaataactttctgtttctc
 25 tccctggccttttgagttgtcgtacggattaattaagggccc 3' (ID. DE SEQ.
 N°: 22) no intervalo Nhe I - Apa I do vetor acima. PCR foi
 usada para amplificar o intervalo entre o códon do terminal
 N códon maduro previsto e a extremidade da região mVH,
 anexando, ao mesmo tempo, 5' tcgtacgga 3'. O fragmento
 30 digerido com Bsi WI e Apa I foi inserido nos sítios

correspondentes do vetor acima. O Anexo 2 detalha as seqüências de nucleotídeos das várias regiões mVk e mVH usadas neste estudo.

Várias seqüências codificadoras de antígeno
 5 flanqueadas por um sítio de Nhe I proximal e um sítio de Not I distal após o códon de parada foram inseridas no intervalo Nhe I - Pac I - Not I dos vetores da cadeia H. Flu HA1-1 foi codificado pelos resíduos 82-1.025 de hemaglutinina gi|21693168| do vírus Influenza A (A/Puerto Rico/8/34(H1N1)) (com uma alteração C982T) com a seqüência
 10 proximal 5' gctagcgataacaacagaacctgcaacacctacaacacctgtaacaa 3' (ID. DE SEQ. N°: 23) (um sítio de Nhe I seguido pela seqüência que codifica resíduos vinculadores de coesina-coesina cipA) e a seqüência distal 5'
 15 caccatcaccatcaccattgagcggccgc 3' (ID. DE SEQ. N°: 24) (que codifica His6, um códon de parada e um sítio de Not I). Flu HA5-1 foi codificado pelos resíduos 49-990 de hemaglutinina de gi|50296052| do vírus Influenza A (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)) ligados pelas mesmas seqüências que
 20 Flu HA1-1. Doc foi codificado pelos resíduos 1.923-2.150 de gi|40671| celD com o sítio de Nhe I proximal e o sítio de Not I distal. PSA foi codificado pelos resíduos 101-832 de gi|34784812| do antígeno específico da próstata com a seqüência proximal 5'
 25 gctagcgataacaacagaacctgcaacacctacaacacctgtaacaacaccgacaacaac acttctagcgc 3' (ID. DE SEQ. N°: 25) (sítio de Nhe I e espaçador cipA) e um sítio de Not I distal. Flu M1-PEP foi codificado por 5'
 30 gctagccccattctgagccccctgaccaaaggcattctgggctttgtgtttaccctgac cgtgcccagcgaacgcaagggtatacttggattcggttttcacacttacttaagcggccg

c 3' (ID. DE SEQ. N°: 26). Essas e todas as outras seqüências peptídicas que codificam foram criadas por meio de misturas de fragmentos de DNA sintéticos complementares com extremidades compatíveis para clonagem em vetores da
5 cadeia H Nhe I e Not I-restritos, ou vetor de Coh.His Nhe I - Xho I-restritos. Sempre foram usados códons humanos preferidos, exceto quando sítios de restrição precisavam ser incorporados ou em seqüências espaçadores CipA.

Os níveis de produção de construções de expressão de
10 rAb foram testados em transfecções transitórias de 5 ml usando aproximadamente 2,5 µg de cada uma das construções de cadeia L e cadeia H e o protocolo descrito acima. Os sobrenadantes foram analisados por ELISA anti-hIgG (AffiniPure anti-IgG humana (H+L) de cabra, Jackson
15 ImmunoResearch). Em testes desse protocolo, a produção de rAb secretado foi independente da concentração dos vetores de cadeia H e cadeia L ao longo de uma faixa de aproximadamente 2 vezes de cada concentração de DNA (ou seja, o sistema era saturado de DNA).

20 Novos anticorpos monoclonais (mAbs) anti-Dectina-1 foram desenvolvidos e usados para descobrir uma biologia previamente desconhecida associada a esse receptor da superfície celular que é encontrado em células apresentadoras de antígeno. Essa nova biologia é altamente
25 preditiva da aplicação de agentes anti-Dectina-1 que ativam esse receptor para diversas aplicações terapêuticas e protetoras. Os dados apresentados abaixo apóiam fortemente as previsões iniciais e demonstram a via para a redução das descobertas aqui reveladas à aplicação clínica.

30 *Desenvolvimento de anticorpos monoclonais com alta*

afinidade contra Dectina-1 humana - Foram produzidas proteínas de fusão de ectodomínio de receptor.hIgG (IgG1Fc humano) e AP (fosfatase alcalina placentária humana) para imunização de camundongos e avaliação de mAbs, respectivamente. Uma construção de expressão para ectodomínio de DCIR.IgG foi descrita previamente (15) e usava o peptídeo sinalizador de camundongo SLAM (mSLAM) para direcionar a secreção (16). Um vetor de expressão para ectodomínio de DCIR.AP também foi gerado usando PCR para amplificar resíduos 133-1.581 de AP (gb|BC009647|), adicionando, ao mesmo tempo, um sítio de Xho I proximal *in-frame* e um códon de parada TGA e um sítio de Not I. Esse fragmento Xho I - Not I substituiu a sequência codificadora de IgG no ectodomínio de vetor de DCIR.IgG acima. As construções do ectodomínio de Dectina-1 na mesma série de vetor Ig e AP continham insertos que codificam bp 397-603, gi|88999591|. As proteínas de fusão de Dectina-1 foram produzidas usando o Sistema de Expressão FreeStyle™ 293 (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante (1 mg de DNA de plasmídeo total com 1,3 ml de reagente 293 Fectin /1 de transfecção). Para a produção de rAb, quantidades iguais de vetor que codifica as cadeias H e L foram co-transfectadas. As células transfectadas são cultivadas por 3 dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e meio fresco adicionado com incubação continuada por dois dias. Os sobrenadantes reunidos em pool foram clarificados por filtração. O ectodomínio de receptor.hIgG foi purificado por cromatografia por afinidade de proteína A HiTrap com eluição por glicina 0,1 M pH 2,7, e depois dialisado versus PBS. rAbs (anticorpos recombinantes aqui descritos) foram

purificados de modo similar, pela utilização de colunas HiTrap MabSelect™. mAbs de camundongos foram gerados por tecnologia convencional de fusão de células. Resumidamente, camundongos BALB/c de 6 semanas de idade foram imunizados por via intraperitoneal com 20 µg de proteína de fusão de ectodomínio de receptor.hIgGFc com adjuvante Ribi, e depois reforços com 20 µg de antígeno 10 dias e 15 dias mais tarde. Após 3 meses, os camundongos receberam reforços novamente três dias antes da retirada dos baços.

Alternativamente, os camundongos foram injetados no coxim da pata com 1-10 µg de antígeno em adjuvante Ribi a cada 3-4 dias ao longo de um período de 30-40 dias. Três a quatro dias após um reforço final, os linfonodos de drenagem foram coletados. Células B do baço ou células de linfonodos foram fundidas com células SP2/O-Ag 14 (17) usando técnicas convencionais. ELISA foi usada para avaliar os sobrenadantes de hibridoma contra a proteína de fusão do ectodomínio de receptor comparada com o parceiro de fusão isoladamente, ou versus o ectodomínio de receptor fundido à AP (15). Os poços positivos foram então avaliados em FACS usando células 293F transfectadas transitoriamente com plasmídeos de expressão que codificam cDNAs do receptor de comprimento total. Os hibridomas selecionados foram clonados por célula única, adaptados ao meio sem soro e expandidos em frascos CELLline (Intergra). Os sobrenadantes do hibridoma foram misturados com um volume igual de glicina 1,5 M, NaCl 3 M, 1x PBS, pH 7,8 e precipitados com resina MabSelect. A resina foi lavada com tampão de ligação e eluída com glicina 0,1 M, pH 2,7. Após neutralização com Tris 2 M, os mAbs foram dialisados versus PBS.

Caracterização de anticorpos monoclonais anti-Dectina-1 purificados por ELISA direto. As afinidades relativas de vários mAbs anti-Dectina-1 por ELISA (ou seja, proteína Dectina-1.Ig é imobilizada na superfície da placa de microtitulação e os anticorpos são testados em uma série de titulação de doses quanto à sua habilidade para se ligar à Dectina-1.Ig (como detectado por um reagente conjugado de anti-IgG de camundongo-HRP). Os painéis são (esquerda) reatividade de mAb para proteína Dectina-1.Ig; e (direita) reatividade de mAb para proteína hIgGFc. Os painéis mostram que os mAbs anti-Dectina-1 reagem especificamente com a Dectina-1. Foram observadas variações na ligação para os vários anticorpos.

Tanto DCs *in vivo* quanto DCs cultivadas *in vitro* expressam Dectina-1: as Figuras 1A e 1B mostram os níveis de expressão de Dectina-1 em PBMCs de doadores normais. Como mostrado na Fig. 1A abaixo, células apresentadoras de antígeno, incluindo DCs CD11c+, monócitos CD14+ e CD19+células B expressam Dectina-1. As células T CD3+ não expressam Dectina-1 detectável na superfície. Os níveis de expressão de Dectina-11 em DCs cultivadas *in vitro*, IFNDCs e IL-4DCs são mostrados na Fig. 1b. Tanto IL-4 quanto IFNDCs foram coradas com todos os três anti-Dectina-1 feitos neste estudo.

DCs cultivadas tanto *in vivo* quanto *in vitro* que expressam Dectina-1. Figura 1A. PBMCs de doadores normais foram coradas com anti-CD11c, CD14, CD19, e CD3 com mAb anti-Dectina-1. As células coradas com anticorpos individuais foram reunidas para medir os níveis de expressão de Dectina-1. Figura 1B. Monócitos de doadores

normais foram cultivadas na presença de GM-CSF com IL-4 (IL-4DCs) ou IFNa (IFNDCs), e as células foram coradas com mAb anti-Dectina-1. As células também foram coradas com anticorpos de controle e anticorpo de cabra anti-camundongo marcado com FITC.

Os níveis de expressão de Dectina-1 em DCs são modulados com ligantes de TLR e citocinas: os níveis de expressão de moléculas de superfície das DCs podem ser modulados com vários estimuladores. Para ver se a expressão de Dectina-1 é controlada pela ativação de DCs, IL-4DCs foram estimuladas com ligantes de TLR e citocinas. Os dados na Fig. 2 mostram que o ligante de TLR4 (LPS de *E. coli*) reduziu os níveis de expressão de Dectina-1, mas IL-10 aumentou ligeiramente a expressão de Dectina-1 em IL-4DCs. Em um estudo repetido, IL-15 infra-regulou ligeiramente Dectina-1. Outros estimuladores, incluindo IFNa e ligante de TLR3, não alteraram os níveis de expressão de Dectina-1 em IL-4DCs.

Figura 2. IL-4DCs cultivadas *in vitro* foram cultivadas na presença de CD40L (50 ng/ml), ligante de TLR2 (100 ng/ml), ligante de TLR3 (100 nM), ligante de TLR4 (20 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml), IL-15 (100 ng/ml), IFNa (500 U/ml) e IL-4 (50 ng/ml) por 24 horas. As células foram coradas com mAbs anti-Dectina-1 ou mAbs de controle. As linhas pontilhadas indicam as células coradas com anticorpo de controle de isótipo. Histogramas cinza e abertos representam células cultivadas nos meios sem nenhum estimulador e com estimuladores, respectivamente.

A sinalização por meio de Dectina-1 estimula DCs a produzirem citocinas e quimiocinas: as células dendríticas

são as células imunológicas primárias que determinam os resultados de respostas imunológicas, indução ou tolerância, dependendo de sua ativação (18). O papel da Dectina-1 na ativação de DCs humanas ainda não foi estudado detalhadamente. Geramos 8 clones diferentes de hibridoma que produzem mAbs anti-hDectina-1 de camundongo, e testamos se os mAbs individuais ativam DCs por medida das citocinas e quimiocinas secretadas por DCs. Os dados na Fig. 3 mostram que especialmente PAB47 e PAB49 podiam ativar DCs para a produção de quantidades significativas de IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IP-10 e MIP-1a. PAB187 é um mAb anti-CD40 que sabidamente ativa DCs. PAB85 é um anticorpo de controle.

A Figura 3 mostra que mAbs anti-Dectina-1 ativam DCs. 1 x 10⁵/200 µl de IFNDCs foram cultivadas nas placas revestidas com diferentes clones de mAbs por 18 horas. A. Os sobrenadantes da cultura foram analisados para medir citocinas e quimiocinas por Luminex.

A Figura 4 mostra que a sinalização por meio de Dectina-1 pode resultar na ativação tanto de IL-4DCs quanto de IFNDCs. Para IFNDCs, mAbs anti-Dectina-1 estimulam DCs a expressar níveis significativamente aumentados de CD86, CD83, CD80 e HLA-DR (Fig. 4A). O mAb anti-Dectina-1 também ativou IL-4DCs a expressar níveis aumentados de CD86, CD80 e HLA-DR (Fig. 4B).

A sinalização por meio de Dectina-1 aumenta a sinalização por meio de TLRs: sinais através de Dectina-1 podem apresentar sinergia com sinais através de TLRs para ativação aumentada de DCs (Fig. 5). Sabia-se que a Dectina-1 apresenta sinergia com TLR2. Neste estudo, no entanto,

demonstramos que a sinergia entre Dectina-1 e TLR4 é mais forte do que a sinergia entre Dectina-1 e TLR2 para a ativação de DCs. Essa sinergia, entre Dectina-1 e TLR4, resultou na produção dramaticamente aumentada de IL-10, IL-1b, TNF- α e IL-12p40 por DCs. Também coramos as células com anti-moléculas co-estimuladoras, incluindo CD86, CD80, CD83 e CD40; essa sinergia não resultou em expressão aumentada das moléculas co-estimuladoras testadas.

A sinergia entre Dectina-1 e TLR4 resultou nas respostas de células T CD8 antígeno-específicas aumentadas: para testar se a sinergia entre a sinalização mediada por Dectina-1 e por TLR resulta em respostas imunológicas aumentadas, foi testada a capacidade de DCs para sensibilizar células T CD8 específicas para Mart-1 (Fig. 6). Como mostrado na Fig. 6A, a sinergia entre Dectina-1 e TLR4L resultou em um número aumentado em mais de 5 vezes de respostas de células T CD8 específicas para Mart-1. Também podíamos observar que a sinergia entre Dectina-1 e TLR2 resultou na sensibilização aumentada de células T CD8 específicas para Mart-1. Os dados na Fig. 6 serão úteis para o desenvolvimento futuro de vacinas.

IL-10 produzida por DCs estimuladas por meio de Dectina-1 contribui para a sensibilização aumentada de células T CD8 específicas para Mart-1: como mostrado na Fig. 3 e na Fig. 5, a sinalização por meio de Dectina-1 resultou em quantidades significativas de IL-10, uma citocina inibidora para respostas de células T CD8, por DCs. As quantidades de IL-10 foram significativamente aumentadas quando Dectina-1 apresentou sinergia com ligantes de TLR. Independentemente da IL-10 produzida por

DCs, no entanto, as DCs estimuladas com anti-Dectina-1 isoladamente ou com anti-Dectina-1 e ligantes de TLR resultaram na sensibilização aumentada de células T CD8 específicas para Mart-1 (Fig. 6). Portanto, é provável que IL-10 durante a sensibilização possa contribuir para a sensibilização antígeno-específica de células T CD8. Para testar essa hipótese, adicionamos anticorpo anti-IL-10 na cultura, e os dados na Fig. 7 indicam que IL-10 de DCs estimuladas com anti-Dectina-1 e ligantes de TLR aumentam a sensibilização de células T CD8 específicas para Mart-1. Resultados similares foram observados quando as DCs foram estimuladas com Zymosan. Quando as mesmas DCs foram estimuladas com Zymosan, as DCs produziram uma quantidade significativa de IL-10 (mais de 1.000 pg/ml por 1×10^5 DCs) (dados não mostrados). Como as DCs estimuladas com mAbs anti-Dectina-1 produzem quantidades significativas de IL-10, essa sensibilização aumentada de células T CD8 antígeno-específicas mediada por IL-10 será útil para o desenvolvimento futuro de vacinas.

DCs ativadas com anti-Dectina-1 expressam níveis aumentados de IL-15 e 4-1BBL: para analisar ainda mais o papel de anti-Dectina-1 na ativação de DCs, IFN DCs foram estimuladas com anti-Dectina-1, e depois as células foram coradas com anti-IL-15 e 4-1BBL. Os dados na Fig. 8 mostram que a sinalização por meio de Dectina-1 induz a expressão aumentada tanto de IL-15 quanto de 4-1BBL, o que pode contribuir para respostas imunológicas humorais e celulares aumentadas. IL-15 sabidamente tem uma participação importante nas respostas de células T CD8 e na proliferação de células B e produção de anticorpo. 4-1-BBL é uma

molécula co-estimuladora que contribui para as respostas de células T CD8 mediadas por DCs - sinais de 4-1BBL humana por meio de CD137/4-1BB e por ela própria. Sua cauda citoplasmática participa na sinalização reversa que induz apoptose em células T e na secreção de citocina (IL-6; TNF- α) por monócitos. A ligação de 4-1BBL à CD137/4-1BB produz diversos efeitos e tem uma participação fundamental na resposta de células T de memória. Ela mantém os números de células T ao final de uma resposta primária, e induz células T CD4+ e CD8+ a proliferar e secretar citocinas como, por exemplo, IL-2 e IFN- γ em células CD4+, e IFN- γ em células CD8+.

DCs estimuladas por meio de Dectina-1 induzem respostas imunológicas humorais potentes: DCs têm uma participação importante nas respostas imunológicas humorais ao fornecerem sinais para respostas de células B tanto T-dependentes quanto T-independentes (19-22) e por transferência de antígenos às células B (23, 24). Além das DCs, a sinalização por meio de TLR9 como um terceiro sinal é necessária para respostas de células B eficientes (25, 26). A Dectina-1 pode afetar as respostas imunológicas humorais mediadas por DCs na presença de ligante de TLR9, CpG. IL-4 DCs de seis dias foram estimuladas com mAb anti-Dectina-1, e depois as células B purificadas foram co-cultivadas na presença de CD40L ou CpG. Como mostrado na Fig. 9a e 9b, DCs ativadas com mAb anti-Dectina-1 resultam na proliferação aumentada de células B (observada por meio de diluição de CFSE) e diferenciação de células plasmáticas (aumento de CD38⁺), comparadas com DCs estimuladas com mAb de controle.

As quantidades de imunoglobulinas totais (Igs) produzidas foram medidas por ELISA (Fig. 9a e b). Consistente com a proliferação de células B e diferenciação de células plasmáticas, células B cultivadas com DCs estimuladas com mAb anti-Dectina-1 resultam na produção aumentada significativamente de imunoglobulinas totais na presença de CD40L ou CpG.

A presente invenção pode ser usada para a aplicação terapêutica de agentes que ativam especificamente por meio de Dectina-1, por exemplo, como adjuvante na vacinação, ou como estimulantes do sistema imunológico para indivíduos imunologicamente comprometidos. Além disso, a descoberta prevê que o bloqueio da ativação natural ou anormalmente regulada por meio de Dectina-1 pode ter aplicações (por exemplo, para evocar tolerância em casos de transplante, ou atenuar doenças autoimunes).

mAbs anti-Dectina-1 ativam células B: células B CD19+ expressam Dectina-1 (Fig. 1) e isso prevê um possível papel para a Dectina-1 expressa em células B. Os dados na Fig. 10A mostram que o acionamento de Dectina-1 em células B resulta na proliferação aumentada de células B e na diferenciação de células plasmáticas na presença de CpG. Consistentemente, a Fig. 10B mostra que células B ativadas com mAb anti-Dectina-1 secretam quantidades aumentadas de IgM total, mas não de IgG e IgA.

A descoberta acima de efeitos diretos em células B por meio da ligação de Dectina-1 reforça o escopo da aplicação terapêutica ressaltada acima para agentes que atuam por meio de - ou contra - Dectina-1.

Papel da Dectina-1 em respostas de células T: DCs

estimuladas por meio de Dectina-1 expressam níveis aumentados de moléculas co-estimuladoras e produzem quantidades aumentadas de citocinas e quimiocinas (Fig. 3 e 4), sugerindo que a Dectina-1 contribui para respostas imunológicas celulares aumentadas, bem como para respostas imunológicas humorais. Isso foi testado por medida de respostas de células T CD8 antígeno-específicas (Fig. 11). Os dados na Fig. 11 mostram que DCs ativadas por meio de Dectina-1 resultam em respostas de memória de células T CD8 específicas para proteína Flu M1 aumentadas (Fig. 11a). Mais importante, a sinalização por meio de Dectina-1 permite que as DCs sensibilizem e sensibilizem de forma cruzada peptídeos Mart-1 às células T CD8 (Fig. 11b e c). Isso indica que a Dectina-1 tem uma participação importante no aumento da função das DCs, resultando em sensibilização e sensibilização cruzada aumentadas de antígenos às células T CD8. Portanto, proteínas de fusão de mAb anti-Dectina-1 e antígeno induzirão respostas de células T CD8 antígeno-específicas robustas, sugerindo que reagentes compostos por mAbs anti-Dectina-1 serão úteis para o desenvolvimento de vacina contra cânceres e infecções.

A forma solúvel de mAbs anti-Dectina-1 ativa DCs, resultando na sensibilização aumentada de células T CD8 específicas para Mart-1 de doadores normais. Demonstramos que mAbs anti-Dectina-1 solúveis podem ativar DCs e, portanto, testamos se as DCs estimuladas com anti-Dectina-1 solúvel poderiam aumentar respostas de células T CD8 antígeno-específicas. Os dados na Fig. 12 mostram que DCs ativadas com anti-Dectina-1 solúvel resultou na sensibilização aumentada de células T CD8 específicas para

Mart-1 de doadores normais. A forma solúvel de anti-CD40 feita neste estudo também resultou na sensibilização aumentada de células T CD8.

Células B da amígdala humana foram divididas em dois grupos com base na expressão de Dectina-1: células de amídalas humanas foram coradas com anti-Dectina-1 e outros anticorpos. Como mostrado na Fig. 13, células T CD3+ não expressam Dectina-1 (painel esquerdo). No entanto, havia dois grupos de células B CD19+; um não expressa Dectina-1 e o outro grupo de células B CD19+ expressa Dectina-1 similarmente às células B CD19+ de PBMCs de doadores normais. Isso provavelmente pode ter implicações para o desenvolvimento de novos reagentes terapêuticos baseados em anti-Dectina-1 para cânceres e vacinas.

Células na pele e linfonodos humanos expressam Dectina-1: células que expressam Dectina-1 são detectáveis na pele e em linfonodos humanos por IHC. Os cortes de tecido foram corados com o corante nuclear DAPI (Azul) e Anti-Dectina-1 (Vermelho). A Fig. 14 mostra que tanto a pele quanto os linfonodos humanos contêm células que expressam níveis significativos de Dectina-1. Essa é uma observação importante, na medida em que revela que células *in vivo* expressam Dectina-1 - na localização exata (pele) que seria um local preferido para administração, por exemplo, de anti-Dectina-1-antígeno visado.

DCs *in vivo* em primata não humano expressam Dectina-1 - DCs sangüíneas em primatas não humanos (*Cynomolgus*); as PBMCs de macacos foram coradas com mAbs anti-Dectina-1 e com anticorpos para outros marcadores celulares, CD3, CD14, CD11c, CD27, CD56 e CD16. Os dados na Fig. 15 mostram que

tanto células CD14 quanto células CD11c+ foram coradas com mAbs anti-Dectina-1 humana. Diferentemente das células CD14+ e CD11c+, as células CD3+, CD16+, CD27+ e CD56+ não expressaram Dectina-1 (dados não mostrados). Esses dados demonstram a reatividade cruzada de certos mAbs anti-Dectina-1 humana-1 contra células apresentadoras de antígeno de macacos. Isso facilita enormemente a redução das invenções aqui descritas à prática, na medida em que o macaco pode ser usado como um modelo válido para estudos de eficácia e segurança de terapias humanas previstas.

As descobertas mostradas acima aumentam e ampliam o escopo da aplicação terapêutica para agentes que atuam por meio de Dectina-1. A ativação de DCs por Dectina-1 influencia as células T vizinhas, dirigindo-as a aumentar a proliferação. Além disso, quando antígeno está presente durante essa interação, DCs ativadas por Dectina-1 resultam no aumento da expansão de células T antígeno-específicas. Isso mostra que a ativação por Dectina-1, por exemplo, no caso de uma vacina, pode dirigir a expansão seletiva de células T virgens antígeno-específicas - isso, junto com os efeitos diretos e indiretos acima da ativação por Dectina-1 em células B, prevê claramente a expansão de células B antígeno-específicas e, portanto, a produção de anticorpo antígeno-específico.

Contempla-se que qualquer modalidade discutida nesta especificação possa ser implementada com relação a qualquer método, kit, reagente ou composição da invenção, e vice-versa. Além disso, as composições da invenção podem ser usadas para se realizar os métodos da invenção.

Será subentendido que as modalidades particulares aqui

descritas são apresentadas como forma de ilustração, e não como limitações da invenção. As características principais desta invenção podem ser empregadas em várias modalidades, sem se afastar do escopo da invenção. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar usando não mais do que experimentação de rotina, numerosos equivalentes para os procedimentos específicos aqui descritos. Esses equivalentes são considerados como estando incluídos no escopo desta invenção e cobertos pelas reivindicações.

Todas as publicações e os pedidos de patentes mencionados na especificação são indicativos do nível de conhecimento daqueles habilitados na técnica à qual esta invenção pertence. Todas as publicações e os pedidos de patentes são aqui incorporados por referência no mesmo grau como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

O uso da palavra "um" ou "uma", quando usada em conjunto com o termo "que compreende" nas reivindicações e/ou na especificação, pode significar "um", mas também é consistente com o significado de "um ou mais", "pelo menos um" e "um ou mais do que um". O uso do termo "ou" nas reivindicações significa "e/ou", a menos que explicitamente indicado para se referir apenas às alternativas ou no caso de as alternativas serem mutuamente exclusivas, embora a revelação permita a definição de que se refere apenas às alternativas e "e/ou". Ao longo de todo este pedido, o termo "cerca de" é usado para indicar que um valor inclui a variação de erro inerente para o dispositivo, o método

sendo empregado para determinar o valor, ou a variação que existe entre os indivíduos do estudo.

Como usadas nesta especificação e nas reivindicações, as palavras "que compreende" (e qualquer forma de "que
5 compreende", por exemplo, "compreendem" e "compreende"), "que possui" (e qualquer forma de "que possui", por exemplo, "possuem" e "possui"), "incluindo" (e qualquer forma de incluindo, por exemplo, "inclui" e "incluem") ou "que contém" (e qualquer forma de "que contém", por
10 exemplo, "contém" e "contêm") são inclusivas ou abertas e não excluem elementos ou etapas de métodos adicionais não citados.

O termo "ou combinações destes", como aqui usado, refere-se a todas as permutações e combinações dos itens
15 listados que precedem o termo. Por exemplo, "A, B, C ou combinações destes" visa incluir pelo menos um de: A, B, C, AB, AC, BC ou ABC e, se a ordem for importante em um contexto em particular, também BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC ou CAB. Continuando com esse exemplo, são expressamente
20 incluídas combinações que contêm repetições de um ou mais itens ou termos, por exemplo, BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, e assim por diante. Aqueles habilitados na técnica compreenderão que tipicamente não há limite para o número de itens ou termos em qualquer combinação, a menos
25 que explicitamente indicado pelo contexto.

Todas as composições e/ou métodos aqui revelados e reivindicados podem ser feitos e executados sem
experimentação desnecessária à luz da presente revelação. Embora as composições e os métodos desta invenção tenham
30 sido descritos em termos de modalidades preferidas, ficará

evidente para aqueles habilitados na técnica que podem ser aplicadas variações às composições e/ou aos métodos e nas etapas ou na seqüência de etapas do método aqui descrito, se afastar do conceito, do espírito e do escopo da invenção. Todos esses substitutos e modificações similares evidentes para aqueles habilitados na técnica são considerados como estando incluídos no espírito, escopo e conceito da invenção, como definida pelas reivindicações em anexo.

REFERÊNCIAS

1. Figdor, C. G., Y. van Kooyk e G. J. Adema. 2002. "C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells". *Nat. Rev. Immunol.* 2: 77-84.

2. Pysz, E., A. S. Marshall, S. Gordon e G. D. Brown. 2006. "C-type lectin-like receptors on myeloid cells". *Ann. Med.* 38: 242-251.

3. Brown, G. D. 2006. "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor". *Nat. Rev. Immunol.* 6: 33-43.

4. Geijtenbeek, T. B., D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor e Y. van Kooyk. 2000. "DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking". *Nat. Immunol.* 1: 353-357.

5. Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk e C. G. Figdor. 2000. "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses". *Cell* 100: 575-585.

6. d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli

e L. Romani. 2000. "Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo". *J. Exp. Med.* 191: 1.661-1.674.

5 7. Fradin, C., D. Poulain e T. Jouault. 2000. "beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3". *Infect. Immun.* 68: 4.391-4.398.

10 8. Cambi, A., K. Gijzen, J. M. de Vries, R. Torensma, B. Joosten, G. J. Adema, M. G. Netea, B. J. Kullberg, L. Romani e C. G. Figdor. 2003. "The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells". *Eur. J. Immunol.* 33: 532-538.

15 9. Netea, M. G., J. W. Meer, I. Verschueren e B. J. Kullberg. 2002. "CD40/CD40 ligand interactions in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection: the role of macrophage-derived nitric oxide". *Eur. J. Immunol.* 32: 1.455-1.463.

20 10. Lee, S. J., S. Evers, D. Roeder, A. F. Parlow, J. Risteli, L. Risteli, Y. C. Lee, T. Feizi, H. Langen e M. C. Nussenzweig. 2002. "Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis". *Science* 295: 1.898-1.901.

25 11. Maeda, N., J. Nigou, J. L. Herrmann, M. Jackson, A. Amara, P. H. Lagrange, G. Puzo, B. Gicquel e O. Neyrolles. 2003. "The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan". *J. Biol. Chem.* 278: 5.513-5.516.

30 12. Tailleux, L., O. Schwartz, J. L. Herrmann, E.

Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel e O. Neyrolles. 2003. "DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells". *J. Exp. Med.* 197: 121-127.

13. Geijtenbeek, T. B., S. J. Van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk e Y. Van Kooyk. 2003. "Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function". *J. Exp. Med.* 197: 7-17.

14. Cooper, A. M., A. Kipnis, J. Turner, J. Magram, J. Ferrante e I. M. Orme. 2002. "Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present". *J. Immunol.* 168: 1.322-1.327.

15. Bates, E. E., N. Fournier, E. Garcia, J. Valladeau, I. Durand, J. J. Pin, S. M. Zurawski, S. Patel, J. S. Abrams, S. Lebecque, P. Garrone e S. Saeland. 1999. "APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif". *J. Immunol.* 163: 1.973-1.983.

16. Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne e S. Brunak. 2004. "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0". *J. Mol. Biol.* 340: 783-795.

17. Shulman, M., C. D. Wilde, G. Kohler, M. J. Shulman, N. S. Rees, D. Atefi, J. T. Horney, S. B. Eaton, W. Whaley, J. T. Galambos, H. Hengartner, L. R. Shapiro e L. Zemek. 1978. "A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies". *Nature* 276: 269-270.

18. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S.

Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran e K. Palucka. 2000. "Immunobiology of dendritic cells". *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811.

19. Wykes, M. e G. MacPherson. 2000. "Dendritic cell-
5 B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals". *Immunology* 100: 1-3.

20. Balazs, M., F. Martin, T. Zhou e J. Kearney. 2002. "Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone
10 B cells to initiate T-independent immune responses". *Immunity* 17: 341-352.

21. Kikuchi, T., S. Worgall, R. Singh, M. A. Moore e R. G. Crystal. 2000. "Dendritic cells genetically modified to express CD40 ligand and pulsed with antigen can initiate
15 antigen-specific humoral immunity independent of CD4+ T cells". *Nat. Med.* 6: 1.154-1.159.

22. Dubois, B., J. M. Bridon, J. Fayette, C. Barthelemy, J. Banchereau, C. Caux e F. Briere. 1999. "Dendritic cells directly modulate B cell growth and
20 differentiation". *J. Leukoc. Biol.* 66: 224-230.

23. Qi, H., J. G. Egen, A. Y. Huang e R. N. Germain. 2006. "Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells". *Science* 312: 1.672-1.676.

24. Bergtold, A., D. D. Desai, A. Gavhane e R. Clynes. 2005. "Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells". *Immunity* 23: 503-514.

25. Ruprecht, C. R. e A. Lanzavecchia. 2006. "Toll-like receptor stimulation as a third signal required for
30 activation of human naive B cells". *Eur. J. Immunol.* 36:

810-816.

26. Bernasconi, N. L., E. Traggiai e A. Lanzavecchia.
2002. "Maintenance of serological memory by polyclonal
activation of human memory B cells". *Science* 298: 2.199-
5 2.202.

27. Reddy, M. P., C. A. Kinney, M. A. Chaikin, A.
Payne, J. Fishman-Lobell, P. Tsui, P. R. Dal Monte, M. L.
Doyle, M. R. Brigham-Burke, D. Anderson, M. Reff, R.
Newman, N. Hanna, R. W. Sweet e A. Truneh. 2000.
10 "Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of
a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4". *J.*
Immunol. 164: 1.925-1.933.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o aumento da eficácia de apresentação de antígeno por uma célula apresentadora de antígeno que expressa Dectina-1 caracterizado por compreender o contato da célula apresentadora de antígeno com um anticorpo anti-Dectina-1-específico, ou fragmento deste, capaz de ativar a célula apresentadora de antígeno, em que a célula apresentadora de antígeno é ativada.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula apresentadora de antígeno compreende uma célula dendrítica isolada, uma célula mononuclear do sangue periférico, um monócito, uma célula B, uma célula dendrítica mielóide e combinações destas.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula apresentadora de antígeno compreende uma célula dendrítica isolada, uma célula mononuclear do sangue periférico, um monócito, uma célula B, uma célula dendrítica mielóide e combinações destas que foram cultivadas *in vitro* com GM-CSF e IL-4, interferon alfa, antígeno e combinações destes.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado ainda por compreender a etapa de ativação das células apresentadoras de antígeno que entraram em contato com GM-CSF e IL-4, em que o contato com o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste aumenta a expressão de superfície de CD86, CD80 e HLA-DR na célula apresentadora de antígeno.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado ainda por compreender a etapa de ativação das

células apresentadoras de antígeno que entraram em contato com Interferon alfa, em que o contato com o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste aumenta a expressão de superfície de CD86, CD83, CD80 e HLA-DR na célula
5 apresentadora de antígeno.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno compreendem uma célula dendrítica que foi colocada em contato com GM-CSF e IL-4 ou Interferon alfa para ativar
10 a célula dendrítica, em que as células dendríticas ativadas aumentam a expressão de superfície de CD86, CD80 e HLA-DR.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno compreendem uma célula dendrítica que foi colocada em contato com GM-CSF e IL-4 ou Interferon alfa para ativar
15 a célula dendrítica, em que as células dendríticas ativadas aumentam a secreção de IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IP-10 e MIP-1a e combinações destes.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno compreendem uma célula dendrítica que foi colocada em contato com GM-CSF e IL-4 ou Interferon alfa e o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste aumentam a ativação em conjunto com sinalização por meio de CD40.
20

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células apresentadoras de antígeno compreendem uma célula dendrítica que foi colocada em contato com GM-CSF e IL-4 ou Interferon alfa e o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste possui
25
30 atividade co-estimuladora aumentada de células dendríticas.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado ainda por compreender a etapa de co-ativação da célula apresentadora de antígeno pela ativação por meio do receptor TLR4, em que as células aumentam a produção de citocina e quimiocina.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado ainda por compreender a etapa de co-ativação da célula apresentadora de antígeno pela ativação por meio do receptor TLR4, em que as células aumentam secreção de IL-10, IL-1b, TNF α , IL-12p40 e combinações destes.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado ainda por compreender a etapa de co-ativação da célula apresentadora de antígeno pela ativação por meio do receptor TLR4 usando pelo menos um ligante de TLR4, um anticorpo anti-TLR4 ou fragmentos deste, um híbrido de anticorpo anti-TLR4 e anti-Dectina-1 ou fragmento deste, um conjugado de ligante de anti-TLR4-anti-Dectina-1.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste é selecionado de clone 15E2.5, 11B6.4, 15F4.7, 14D6.3 e 9H7.6 e combinações destes.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células dendríticas ativadas por meio do receptor Dectina-1 com o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste ativam monócitos, células dendríticas, células mononucleares do sangue periférico, células B e combinações destes.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo Dectina-1-

específico ou fragmento deste está ligado a uma metade de um par de coesina/doquerina.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo Dectina-1-
5 específico ou fragmento deste está ligado a uma metade de um par de coesina/doquerina e a outra metade do par está ligada a um ou mais antígenos, citocinas selecionadas de interleucinas, fatores de transformação do crescimento (TGFs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs),
10 fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento epidérmicos (EGFs), peptídeos ativados por tecido conjuntivo (CTAPs), fatores osteogênicos, e análogos, fragmentos e derivados biologicamente ativos desses fatores de crescimento,
15 fatores de diferenciação de células B/T, fatores de crescimento de células B/T, citocinas mitogênicas, citocinas e quimiocinas quimiotáticas, fatores de estimulação de colônias, fatores de angiogênese, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9,
20 IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18 etc., leptina, miostatina, proteína de estimulação de macrófagos, fator de crescimento derivado de plaquetas, TNF- α , TNF- β , NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, linfotoxina- β humana, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF, IL-1 α , IL1- β , IP-10, PF4, GRO, 9E3,
25 eritropoietina, endostatina, angiostatina, VEGF, família do supergene do fator de transformação do crescimento (TGF) incluem os fatores de transformação do crescimento beta (por exemplo, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3); proteínas morfogenéticas ósseas (por exemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); fatores de
30

crescimento de ligação de heparina (fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento insulina-like (IGF)); Inibinas (por exemplo, Inibina A, Inibina B); fatores de diferenciação do crescimento (por exemplo, GDF-1); e Activinas (por exemplo, Activina A, Activina B, Activina AB).

17. Hibridoma que expressou um anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste, caracterizado pelo fato de que o anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste ativa uma célula apresentadora de antígeno para expressar novos marcadores de superfície, secretar uma ou mais citocinas, ou ambos.

18. Hibridoma, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o hibridoma é selecionado de clone PAB1, PAB4, PAB5, PAB8, PAB10 e combinações destes.

19. Método para o aumento de respostas imunológicas de células B, caracterizado por compreender o acionamento de um receptor Dectina-1 em uma célula dendrítica com um anticorpo específico para Dectina-1 ou fragmento deste na presença de antígeno e um ativador de TLR9, em que uma célula B que é colocada em contato com a célula dendrítica ativada por Dectina-1/TLR9 aumenta a produção de anticorpo, secreta citocinas, aumenta a expressão de marcador de superfície da ativação de células B e combinações destes.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que as células B secretam IL-8, MIP-1a, IL-6, TNF- α e combinações destes.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que as células B compreendem

células plasmáticas.

22. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que as células B ativadas expressam Dectina-1.

5 23. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que as células B aumentam a produção de IgM.

24. Método para o aumento de respostas imunológicas de células B, caracterizado por compreender o acionamento de
10 um receptor Dectina-1 em uma célula B com um anticorpo específico para Dectina-1 ou fragmento deste, em que a célula B aumenta a produção de anticorpo.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a célula B aumenta a
15 produção de IL-8, MIP-1 α , IL-6, TNF- α secretados e combinações destes.

26. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a célula B aumenta a produção de IgG, IgM, IgA e combinações destas.

20 27. Método para o aumento da ativação de células T, caracterizado por compreender acionamento de um receptor Dectina-1 em uma célula dendrítica com um anticorpo específico para Dectina-1 ou fragmento deste e receptor TLR4 e o contato de uma célula T com a célula dendrítica
25 ativada por Dectina-1/TLR4, em que a ativação de células T é aumentada.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que as células dendríticas são ainda colocadas em contato com GM-CSF e IL-4, interferon
30 alfa, antígeno e combinações destes.

29. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo específico para Dectina-1 ou fragmento deste aumenta a secreção de IL-10, IL-15 e combinações destas.

5 30. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo específico para Dectina-1 ou fragmento deste aumenta a expressão de superfície de 4-1BBL.

10 31. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que as células T se proliferam mediante a exposição às células dendríticas ativadas com anti-Dectina-1 anticorpos ou fragmentos destes.

15 32. Imunoglobulina anti-Dectina-1 ou porção desta que é secretada por células de mamíferos e um antígeno ligado à imunoglobulina, caracterizada pelo fato de que a imunoglobulina direciona o antígeno às células apresentadoras de antígeno.

20 33. Imunoglobulina, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de que o domínio antígeno-específico compreende um anticorpo de comprimento total, um domínio da região variável de anticorpo, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab)₂ e fragmento Fv, e fragmento Fabc e/ou um fragmento Fab com porções do domínio Fc.

25 34. Vacina caracterizada por compreender uma célula dendrítica ativada com um anticorpo Dectina-1-específico ou fragmento deste.

30 35. Vacina, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de que a vacina compreende pelo menos um dos IDS. DE SEQ. N^{os} 1-13.

36. Carreador modular de rAb caracterizado por compreender um domínio de ligação do anticorpo específico para Dectina-1 ligado a um ou mais domínios de veículo de antígeno que compreendem metade de um par de ligação de coesina-doquerina.

37. rAb, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação antígeno-específico compreende pelo menos uma porção de um anticorpo.

38. rAb, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação antígeno-específico compreende pelo menos uma porção de um anticorpo em uma proteína de fusão com a metade do par de ligação de coesina-doquerina.

39. rAb, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado por ainda compreender uma metade complementar do par de ligação de coesina-doquerina ligada a um antígeno que forma um complexo com o carreador modular de rAb.

40. rAb, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado por ainda compreender uma metade complementar do par de ligação de coesina-doquerina que é uma proteína de fusão com um antígeno.

41. rAb, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o domínio antígeno-específico compreende um anticorpo de comprimento total, um domínio da região variável de anticorpo, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento F(ab)₂ e fragmento Fv, e fragmento Fabc e/ou um fragmento Fab com porções do domínio Fc.

42. Uso de agentes que se ligam ao receptor Dectina-1

em células imunológicas, isoladamente ou com agentes de co-ativação, a combinação ativando células apresentadoras de antígeno caracterizado por ser para aplicações terapêuticas.

5 43. Uso de agente de ligação de Dectina-1 ligado a um ou mais antígenos, com ou sem agentes de ativação, em células imunológicas caracterizado por ser para fazer uma vacina.

10 44. Uso de agentes anti-Dectina-1 caracterizados por serem usados como agentes de co-ativação de células imunológicas para o aumento de respostas imunológicas dirigidas por meio de um receptor da superfície celular diferente da Dectina-1 expressa em células imunológicas.

15 45. Uso de seqüências da região V do anticorpo anti-Dectina-1, caracterizadas por serem capazes de se ligar e ativar células imunológicas por meio do receptor Dectina-1.

20 46. Agentes de ligação de DC-Dectina-1 ligados a um ou mais agentes tóxicos, caracterizados por serem usados para fins terapêuticos no contexto de doenças que sabidamente ou com suspeita de resultarem da ativação inadequada de células imunológicas por meio de Dectina-1 ou no contexto de células patogênicas ou tecidos que expressam Dectina-1.

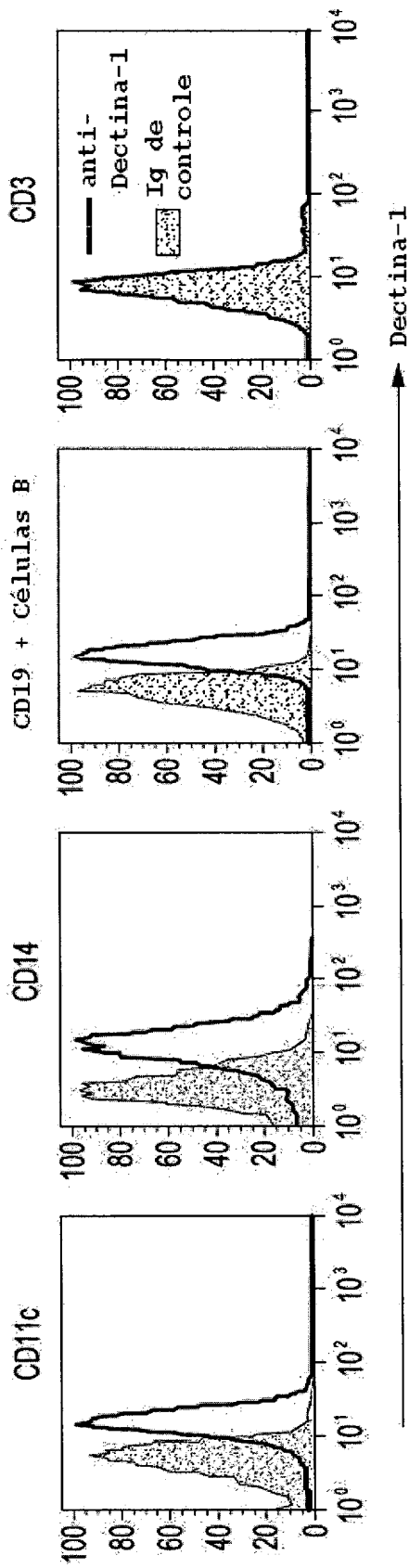


FIG. 1A

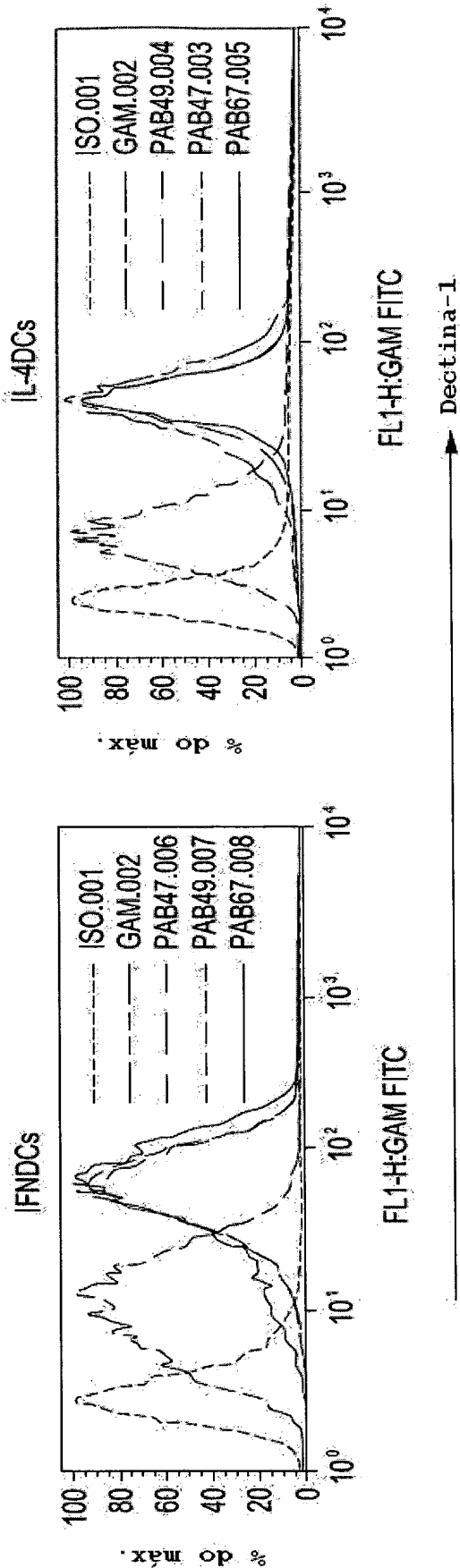


FIG. 1B

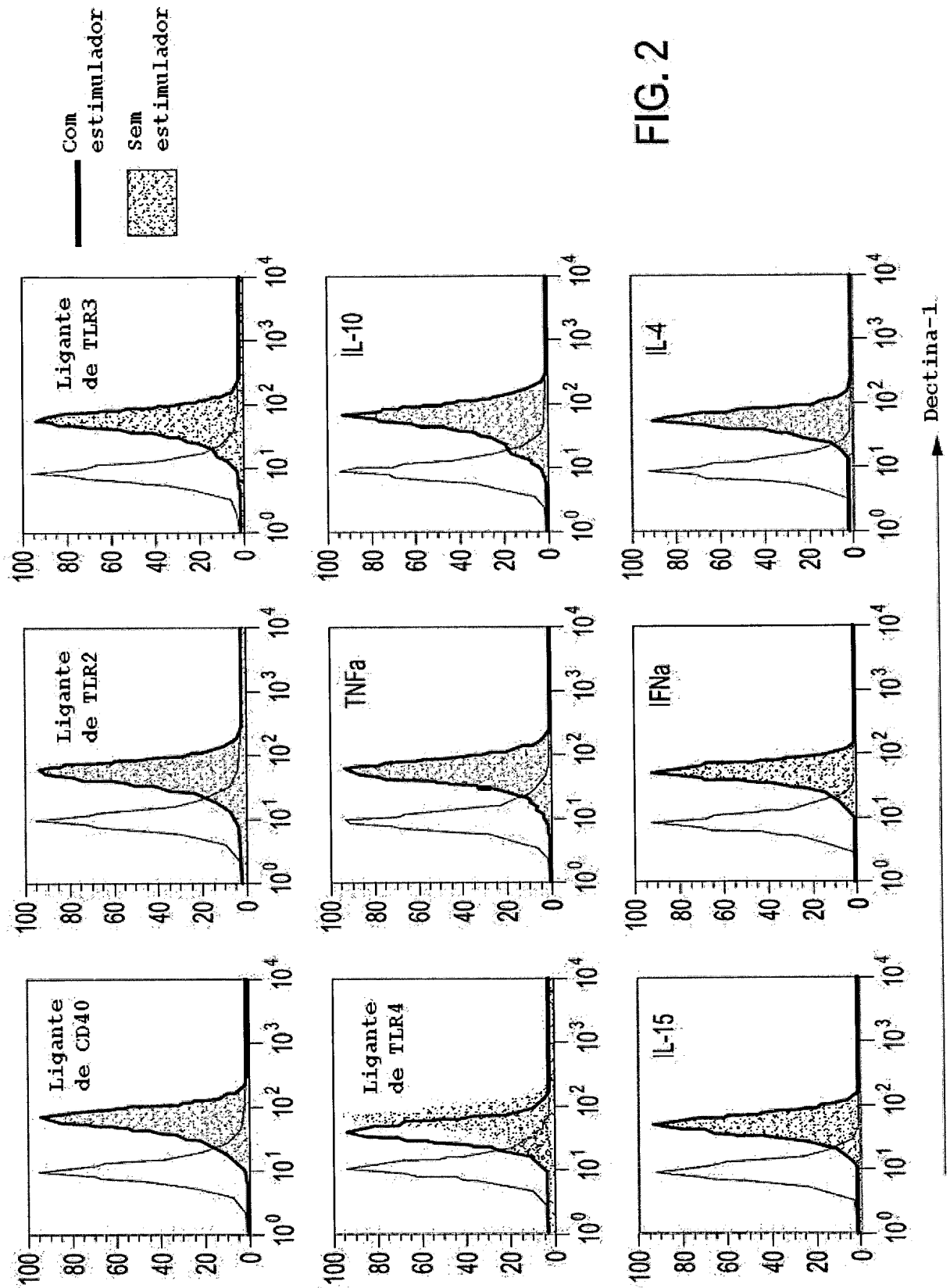


FIG. 2

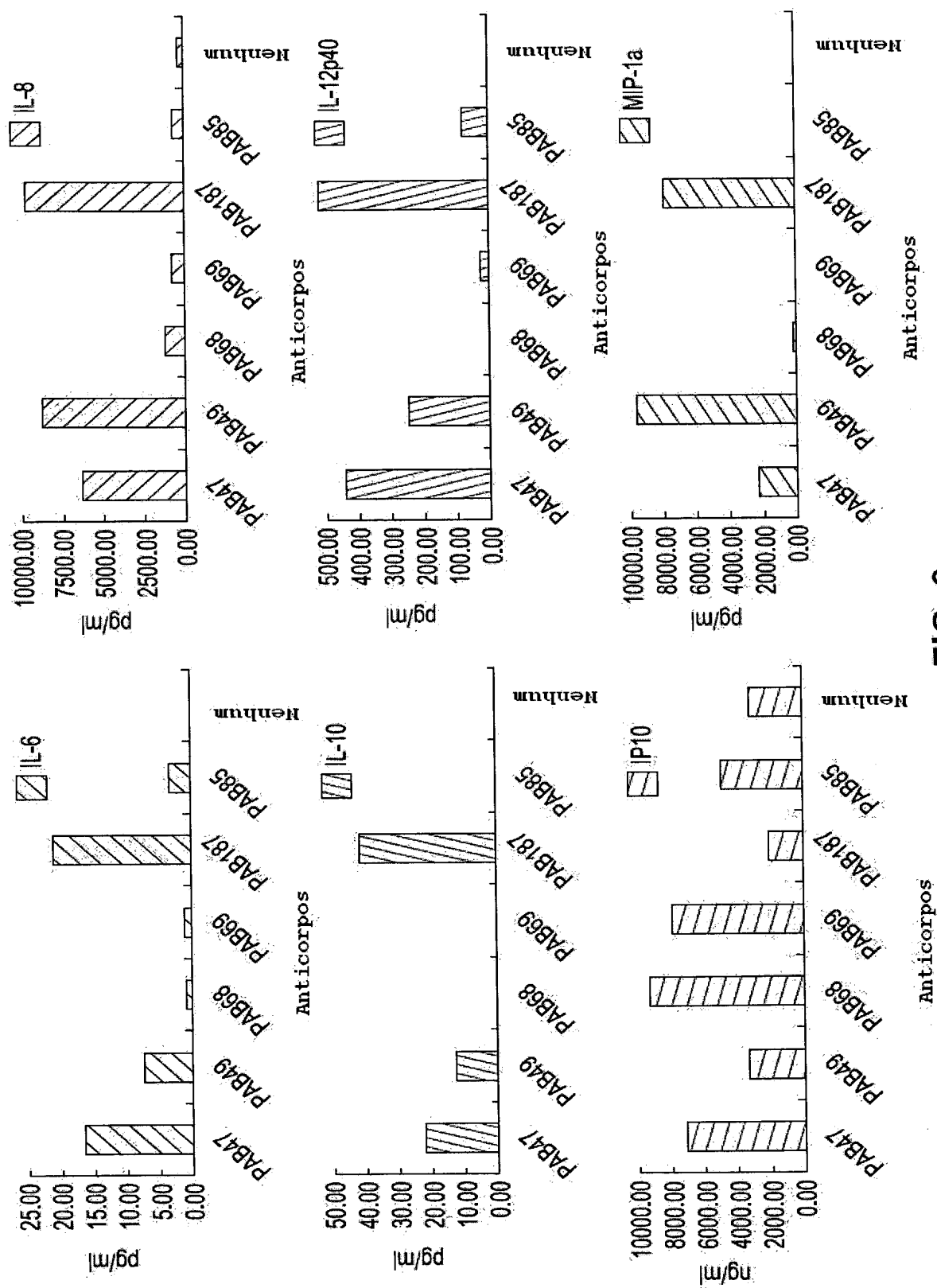
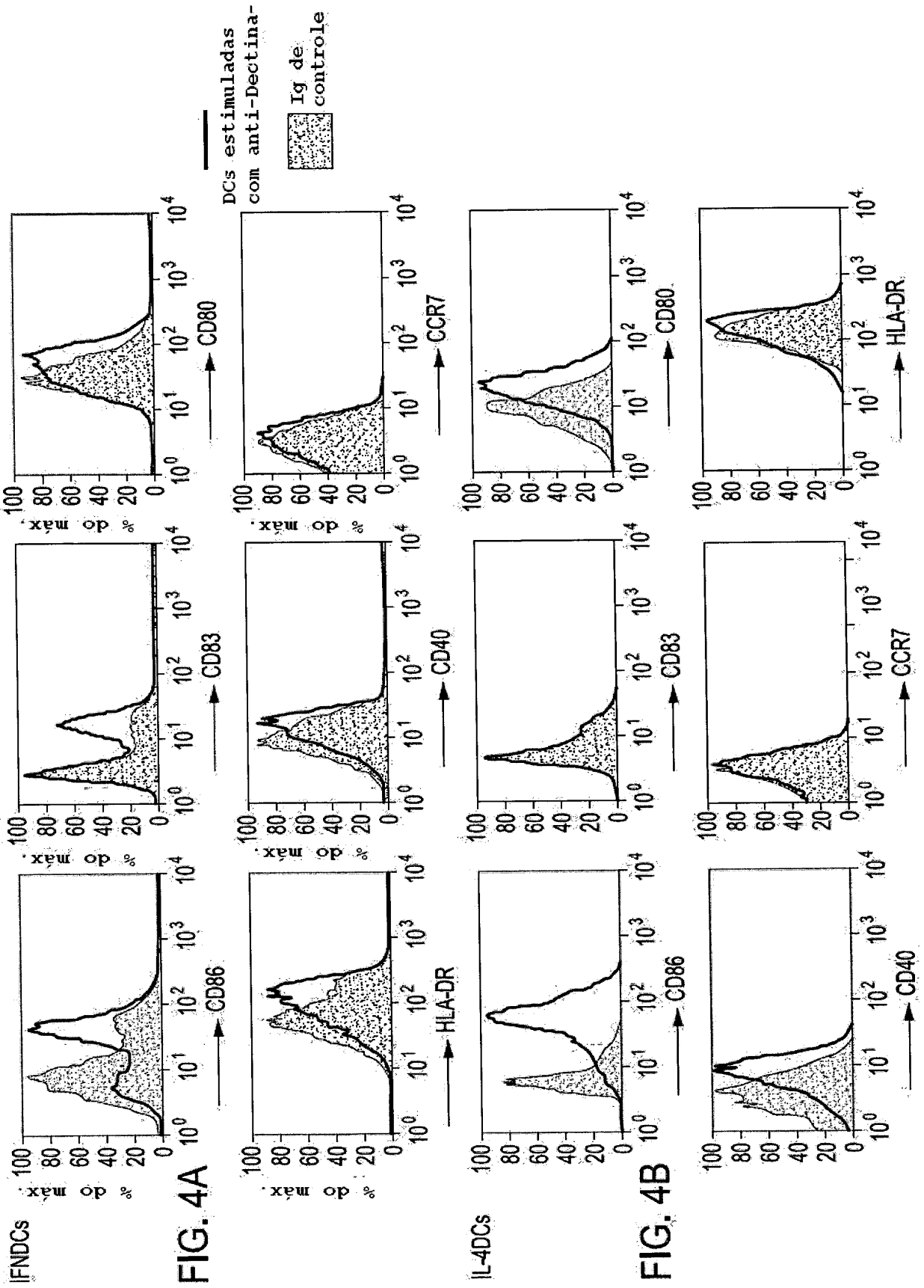


FIG. 3



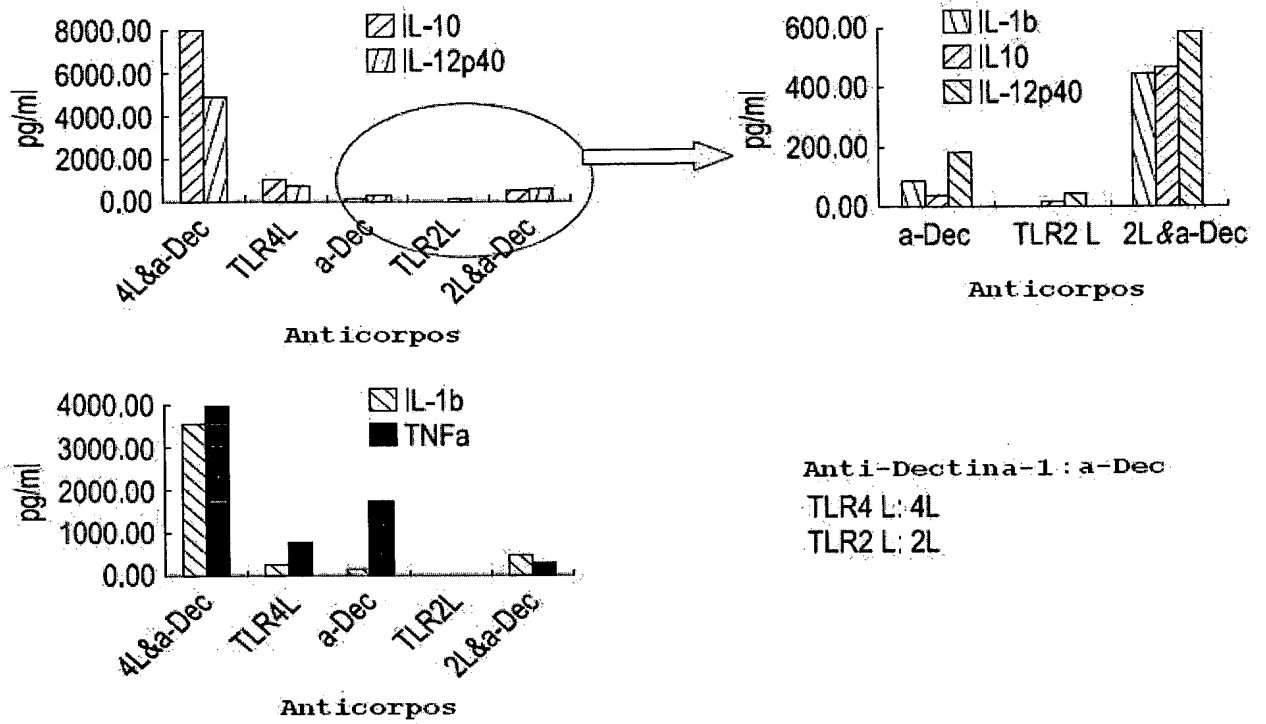


FIG. 5

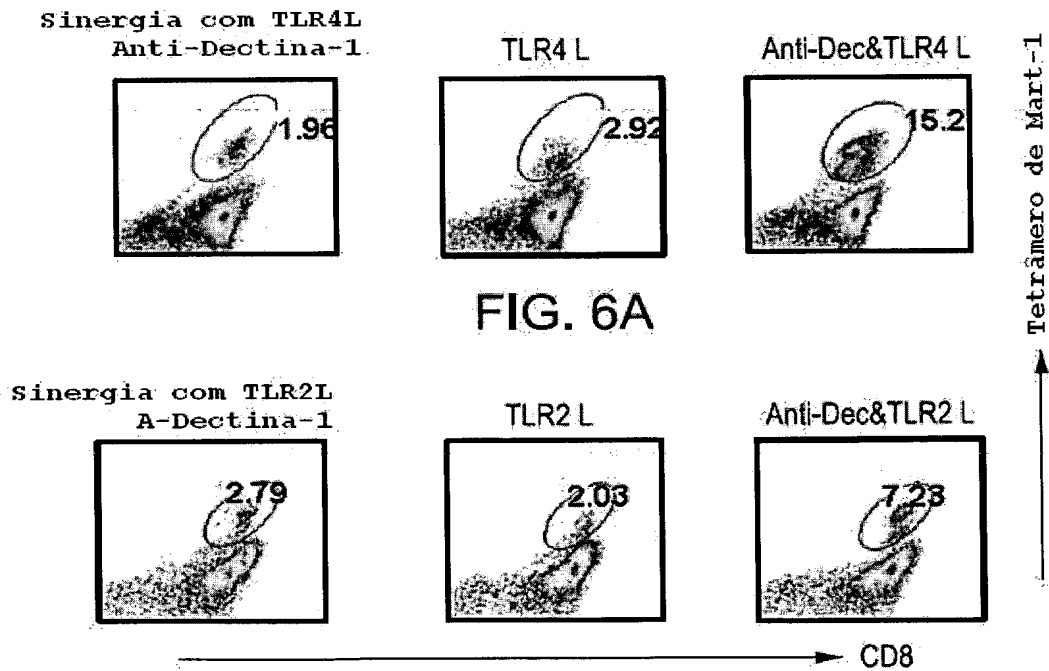


FIG. 6B

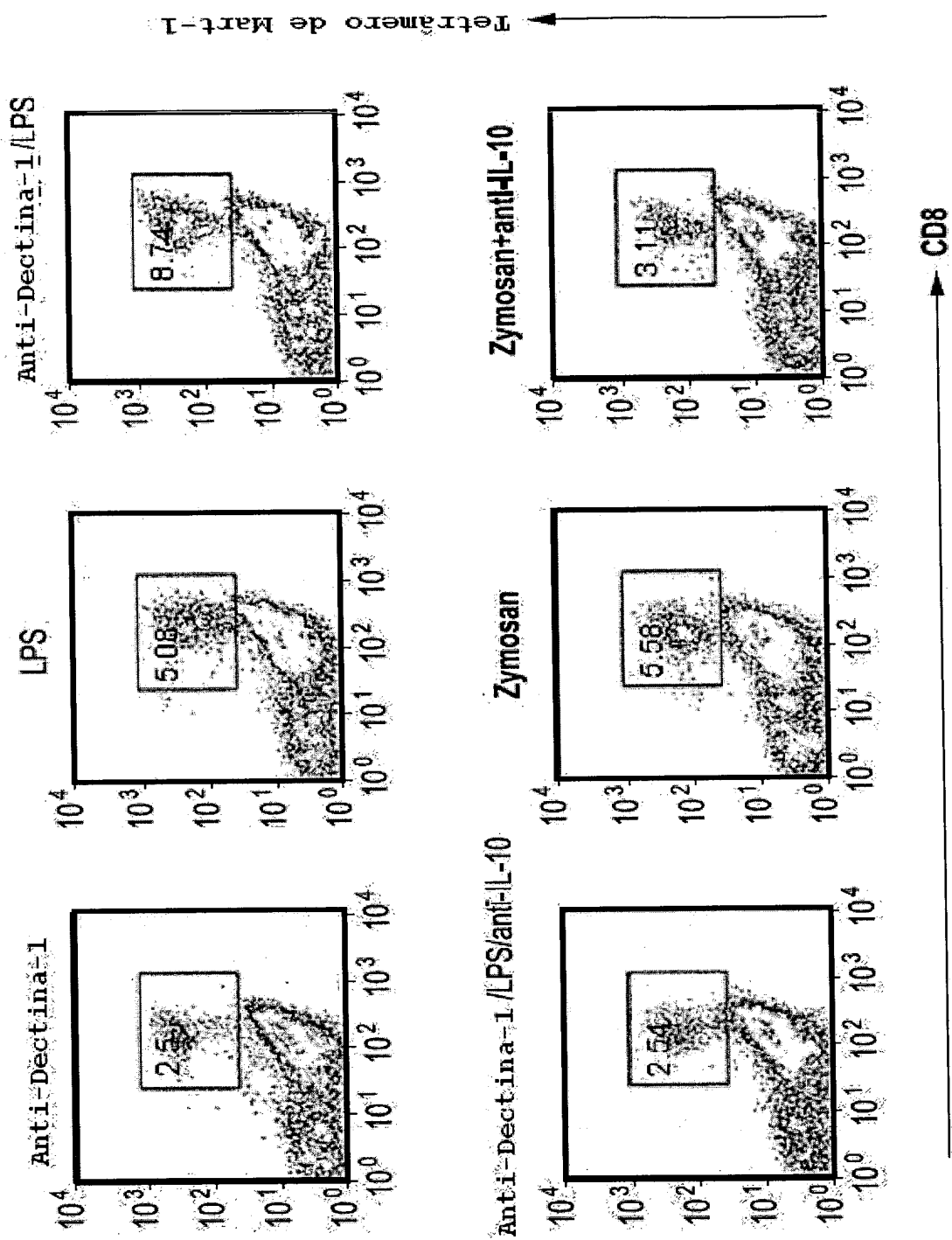


FIG. 7

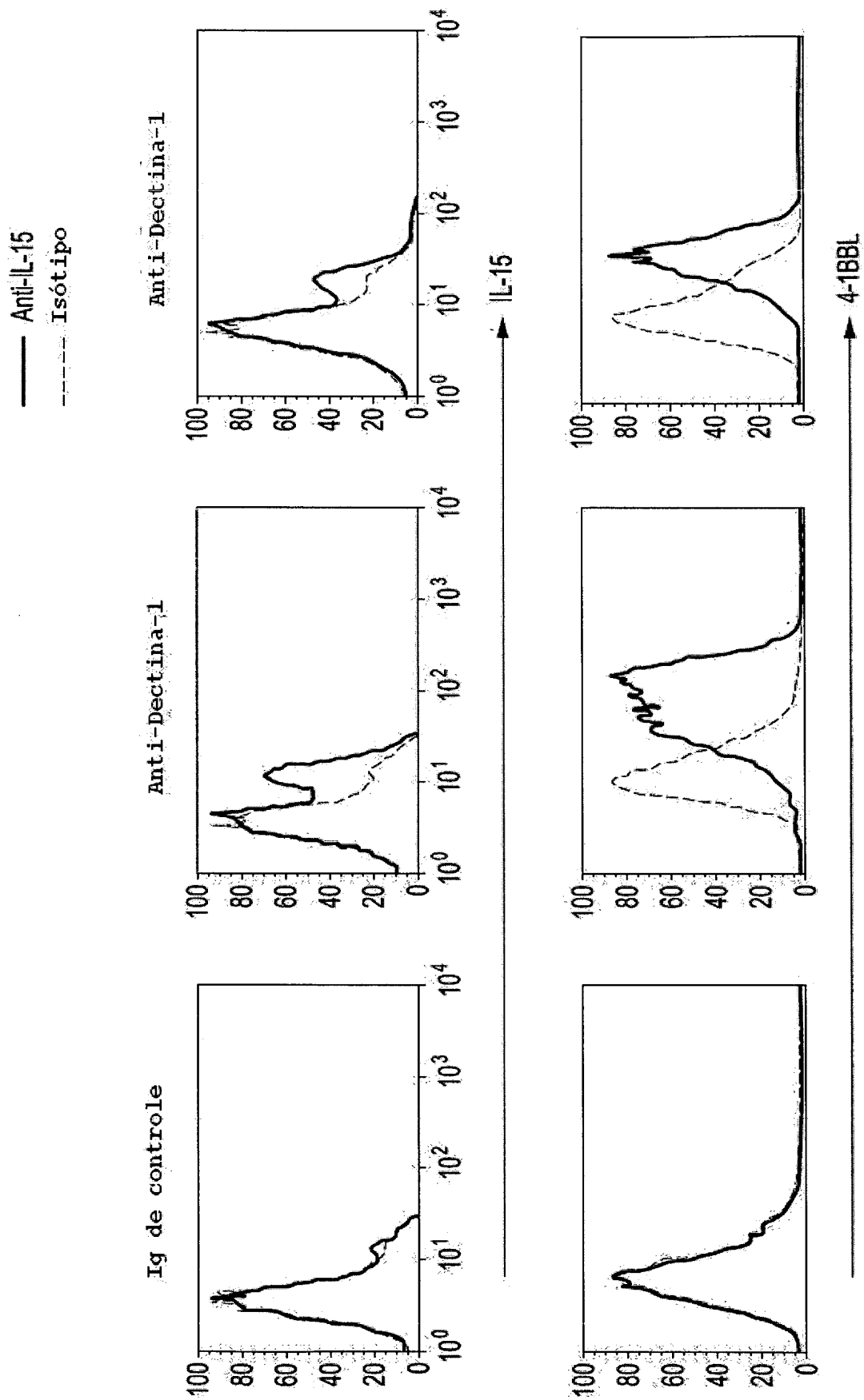


FIG. 8

Com CD40L (50 ng/ml)

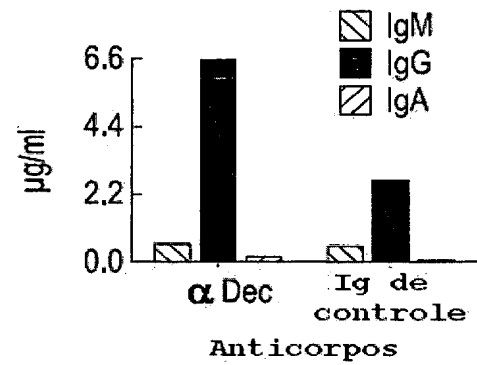
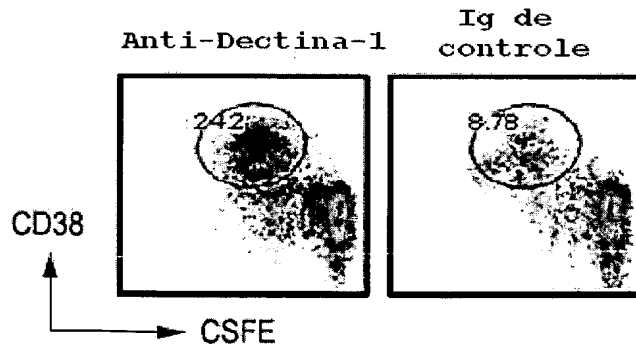


FIG. 9A

Com CpG (50 nM)

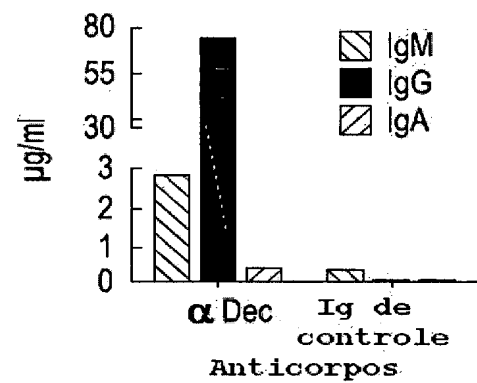
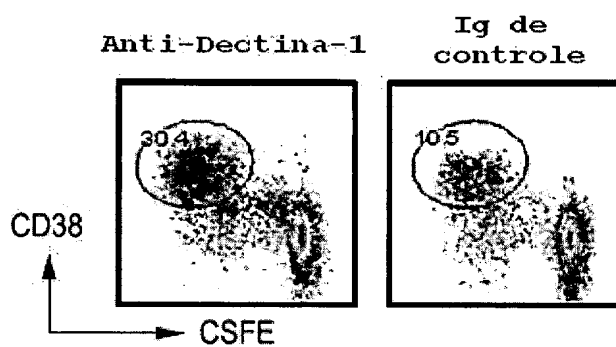


FIG. 9B

FIG. 10A

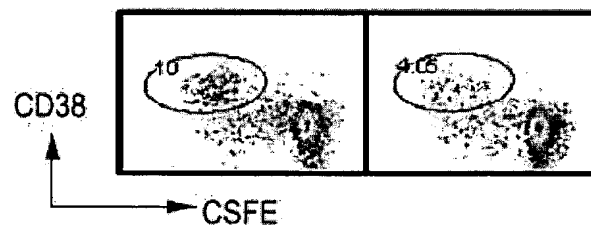
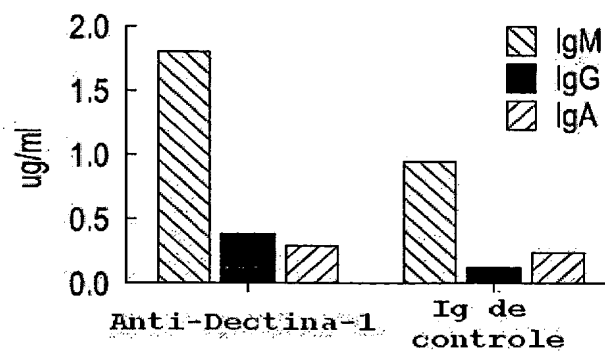


FIG. 10B



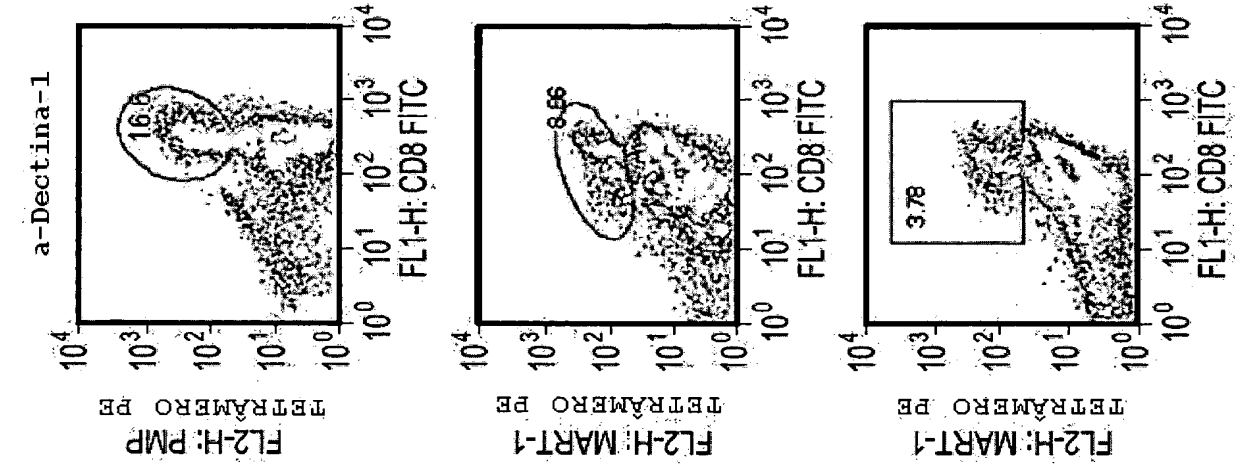
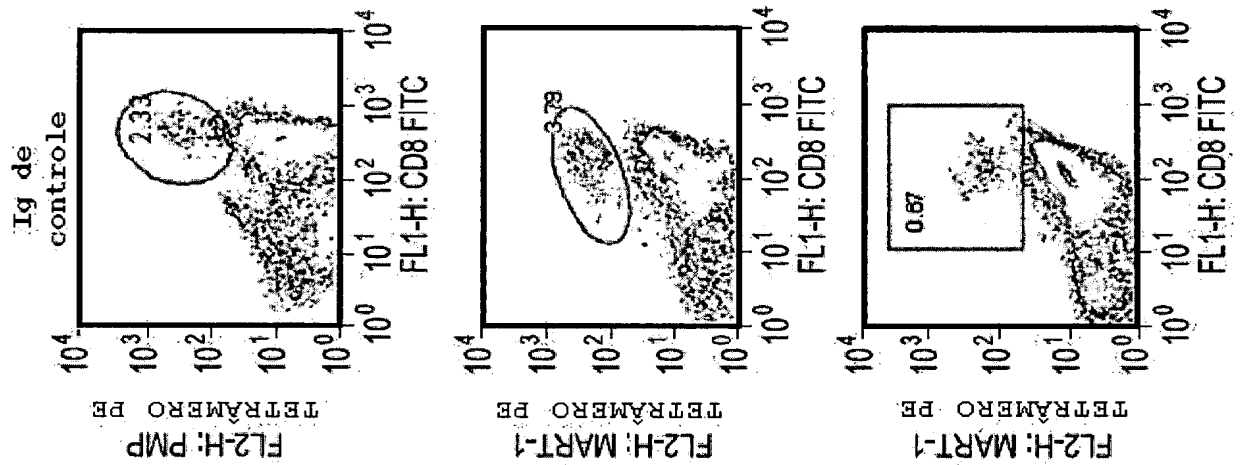
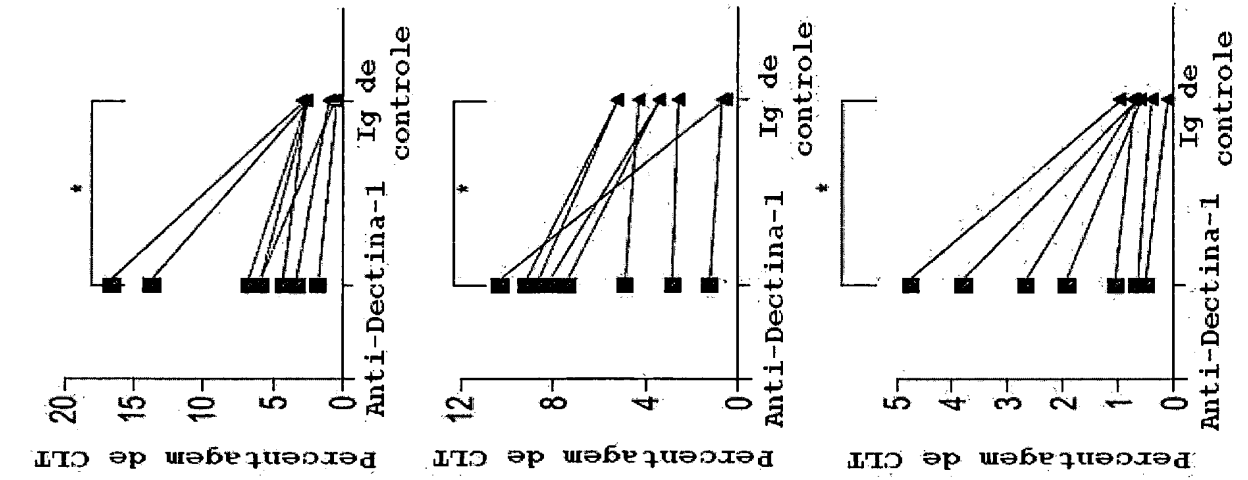


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

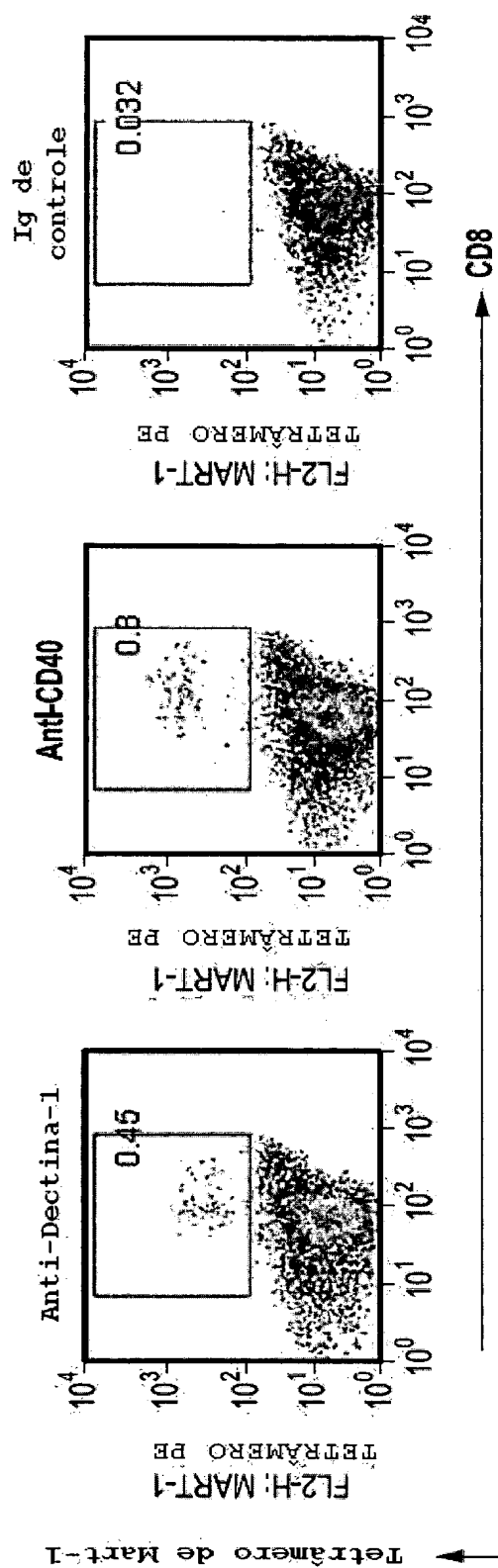


FIG. 12

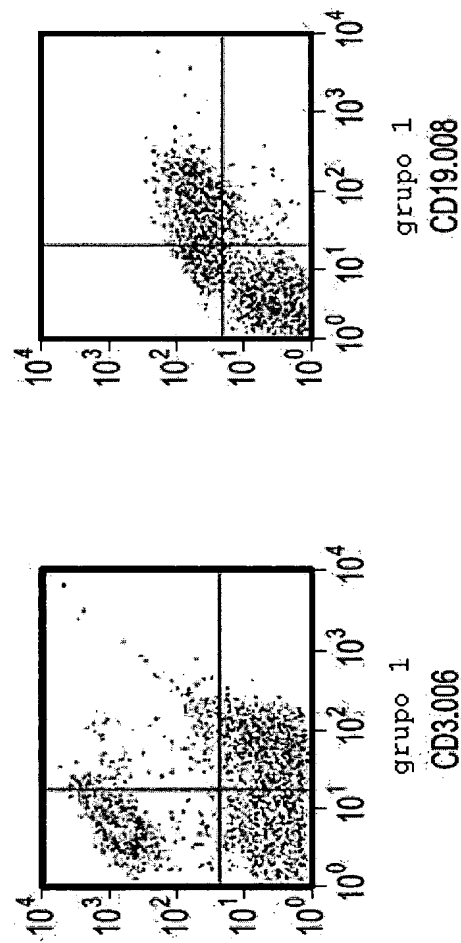


FIG. 13

Corte transversal de pele humana

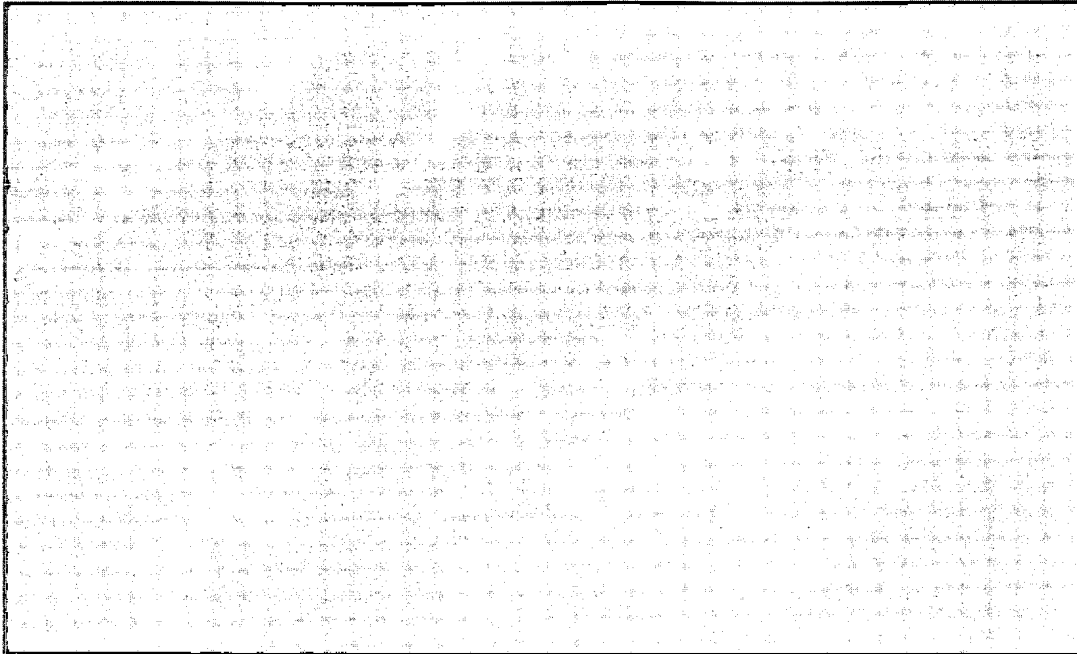


FIG. 14A

Linfonodo humano

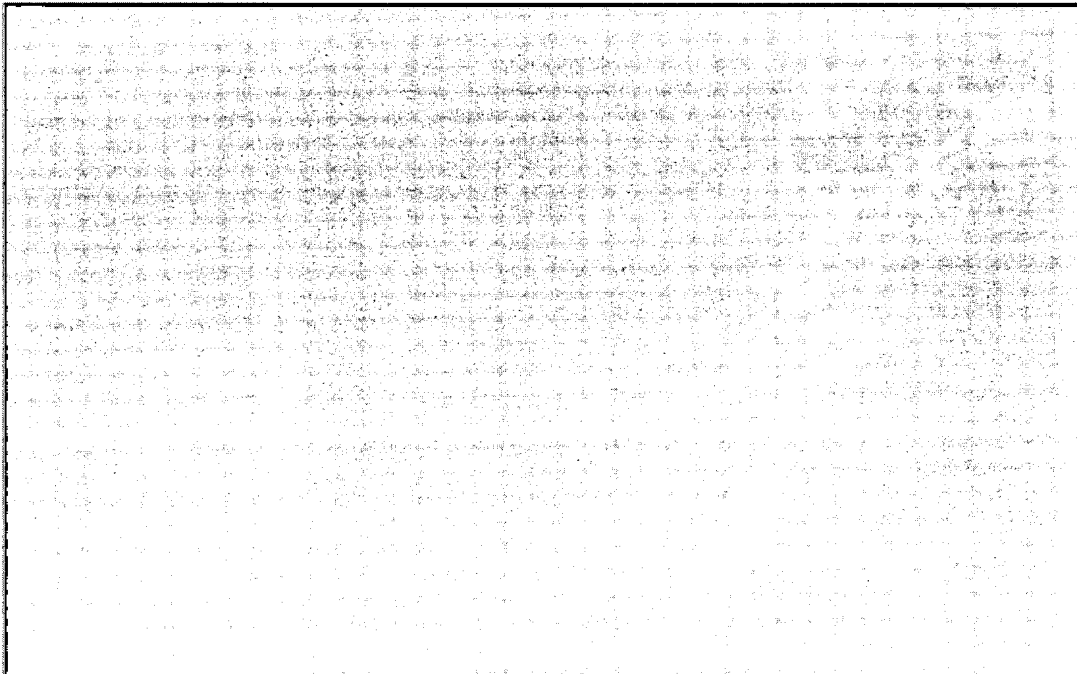


FIG. 14B

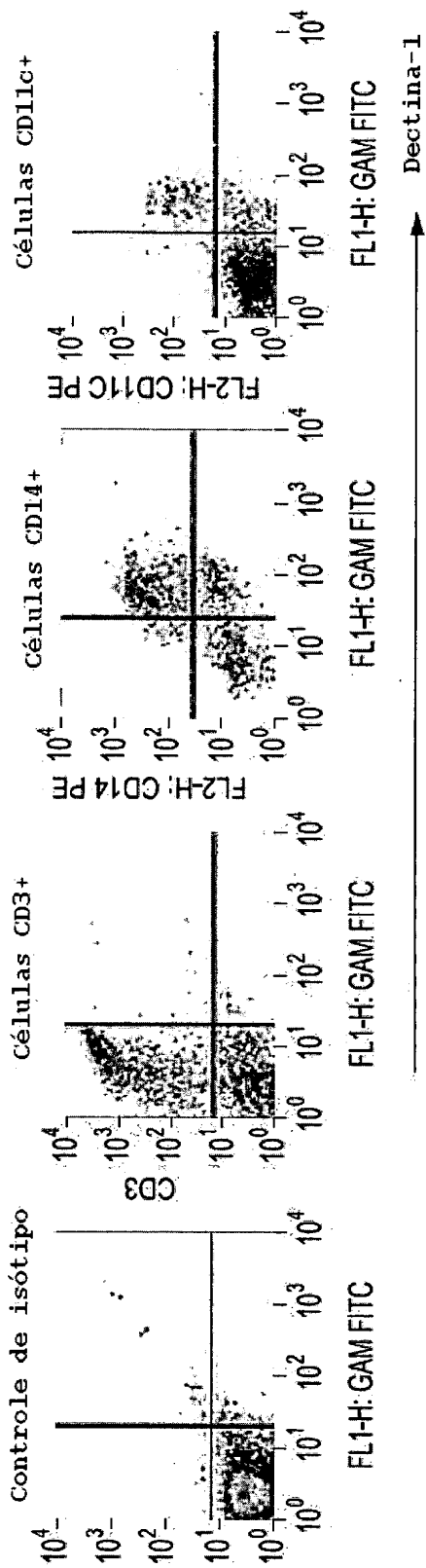
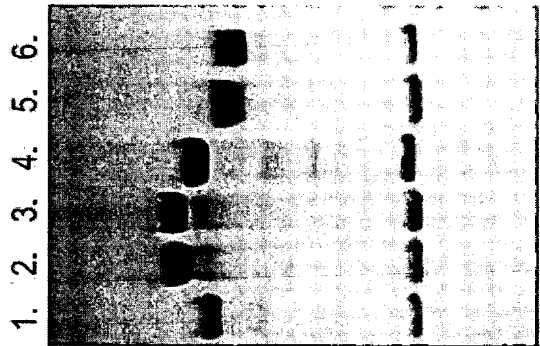


FIG. 15



1. ASGPR_49C11.gag p24 [50+27k]
 2. mlgG2b.Flu HA1-1* [50+37k]
 3. mlgG2b.Flu HA5-1* [50+37k]
 4. LOX-1_15C4 PSA* [50+28k]
 5. ASGPR_49C11.MART-1 pep* [50+6k]
 6. DCIR_24A5.Doc* [50+8k]
- * N-glicosilação prevista

FIG. 16

RESUMO

**APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS
APRESENTADORAS DE ANTÍGENO HUMANAS POR MEIO DE DECTINA-1**

A presente invenção inclui composições e métodos para
5 a ligação de Dectina-1 em células imunológicas com
anticorpos anti-Dectina-1-específicos ou fragmento destes
capazes de ativar as células imunológicas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

5 <110> Banchereau, Jacques
 Zurawski, Gerard
 Zurawski, Sandra
 Oh, SangKon
 Ni, Ling

10 <120> APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS APRESENTADORAS DE
 ANTÍGENO HUMANAS POR MEIO DE DECTINA-1

15 <130> BHCS:1047
 <150> US 60/891,425
 <151> 23-02-2007

20 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.4

25 <210> 1
 <211> 186
 <212> DNA
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente

35 <400> 1
 gacaccaccg aggcccgcca cccccacccc cccgtgacca cccccaccac caccgaccgg 60
 aagggcacca ccgccgagga gctggccggc atcggcatcc tgaccgtgat cctggggcggc 120
 aagcggacca acaacagcac cccaccaag ggcgaattct gcagatatcc atcacactgg 180
 cggccg 186

40 <210> 2
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente

50 <400> 2
 Asp Thr Thr Glu Ala Arg His Pro His Pro Pro Val Thr Thr Pro Thr
 1 5 10 15

55 Thr Asp Arg Lys Gly Thr Thr Ala Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile
 20 25 30

60 Leu Thr Val Ile Leu Gly Gly Lys Arg Thr Asn Asn Ser Thr Pro Thr
 35 40 45
 Lys Gly Glu Phe Cys Arg Tyr Pro Ser His Trp Arg Pro

	50	55	60
5	<210> 3 <211> 447 <212> PRT <213> Artificial		
10	<220> <223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente <400> 3		
15	Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln 1 5 10 15		
20	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr 20 25 30		
25	Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu 35 40 45		
30	Gly Val Met Trp Thr Gly Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met 50 55 60		
35	Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu 65 70 75 80		
40	Lys Met Asn Asn Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val 85 90 95		
45	Arg Asp Ala Val Arg Tyr Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr 100 105 110		
50	Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro 115 120 125		
55	Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly 130 135 140		
60	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn 145 150 155 160		
	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln 165 170 175		
	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 180 185 190		

	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
			195					200					205			
5	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
		210					215					220				
10	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
	225					230					235					240
15	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
					245					250					255	
20	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
				260					265					270		
25	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
			275					280					285			
30	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
		290					295					300				
35	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
	305					310					315					320
40	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
					325					330					335	
45	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
				340					345					350		
50	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
			355					360					365			
55	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
		370					375					380				
60	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
	385					390					395					400
65	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
					405					410					415	
70	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
				420					425					430		
75	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Ala	Ser	

	435	440	445
5	<210> 4		
	<211> 213		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente		
	<400> 4		
15	Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly		
	1 5 10 15		
20	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile		
	20 25 30		
25	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr		
	35 40 45		
30	Ala Thr Ser His Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
	50 55 60		
35	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu		
	65 70 75 80		
40	Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr		
	85 90 95		
45	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro		
	100 105 110		
50	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
	115 120 125		
55	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
	130 135 140		
60	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
	145 150 155 160		
65	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
	165 170 175		
70	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
	180 185 190		

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

5 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5
 10 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Polipeptideo sintetizado quimicamente
 <400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 20 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 25 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ser
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 40 85 90 95

Ala Arg Glu Arg Ala Val Leu Val Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 45 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 60 165 170 175

	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
				180					185					190			
5	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	
			195					200					205				
10	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	
		210					215					220					
15	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	
	225					230					235					240	
20	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
					245					250					255		
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	
				260						265					270		
25	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
			275					280					285				
30	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
		290					295					300					
35	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
	305					310					315					320	
40	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	
					325					330					335		
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
				340					345					350			
45	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
			355					360					365				
50	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
		370					375					380					
55	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
	385					390					395					400	
60	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
					405					410					415		

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

5 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

10 Ala Ser
 450

15 <210> 6
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente
 <400> 6

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

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

35 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Leu Tyr
 35 40 45

40 Ser Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

45 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

50 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Ser Pro Phe Thr
 85 90 95

55 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

60 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

65 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

70 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 5 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 10 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 15 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 7
 <211> 448
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente
 25 <400> 7
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 30 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 35 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 40 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 45 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50 Ala Arg Pro Tyr Gly Ser Glu Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 55 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 60 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

5	Gly 145	Cys	Leu	Val	Lys 150	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu 155	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp 160
10	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu 165	Thr	Ser	Gly	Val	His 170	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu 175
15	Gln	Ser	Ser	Gly 180	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser 185	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser 190
20	Ser	Ser	Leu	Gly 195	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr 200	Cys	Asn	Val	Asp 205	His	Lys	Pro
25	Ser	Asn 210	Thr	Lys	Val	Asp	Lys 215	Arg	Val	Glu	Ser	Lys 220	Tyr	Gly	Pro	Pro
30	Cys 225	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala 230	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly 235	Gly	Pro	Ser	Val	Phe 240
35	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys 245	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu 250	Met	Ile	Ser	Arg	Thr 255	Pro
40	Glu	Val	Thr	Cys 260	Val	Val	Val	Asp	Val 265	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val 270
45	Gln	Phe	Asn 275	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly 280	Val	Glu	Val	His	Asn 285	Ala	Lys	Thr
50	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe 295	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg 300	Val	Val	Ser	Val
55	Leu 305	Thr	Val	Leu	His	Gln 310	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly 315	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys 320
60	Lys	Val	Ser	Asn 325	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser 330	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile 335	Ser
65	Lys	Ala	Lys	Gly 340	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro 345	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro 350
70	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn 360	Gln	Val	Ser	Leu	Thr 365	Cys	Leu	Val
75	Lys	Gly 370	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp 375	Ile	Ala	Val	Glu	Trp 380	Glu	Ser	Asn	Gly

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

5

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

10

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

15

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala Ser
 435 440 445

20

<210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente
 <400> 8

30

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

35

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

40

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

45

Lys Tyr Ala Ala Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

50

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Gly Val Glu Pro
 65 70 75 80

55

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr
 85 90 95

60

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

65

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

70

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

5 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

10 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

15 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

20 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

25 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

30 <210> 9
 <211> 781
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente
 <400> 9

40 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

45 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

50 Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

55 Gly Val Met Trp Thr Gly Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met
 50 55 60

60 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

65 Lys Met Asn Asn Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

70 Arg Asp Ala Val Arg Tyr Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 100 105 110

75 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

	115	120	125
5	Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly 130 135 140		
10	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn 145 150 155 160		
15	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln 165 170 175		
20	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 180 185 190		
25	Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser 195 200 205		
30	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys 210 215 220		
35	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 225 230 235 240		
40	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 245 250 255		
45	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 260 265 270		
50	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 275 280 285		
55	Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 290 295 300		
60	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 305 310 315 320		
	Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 325 330 335		
	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 340 345 350		
	Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 355 360 365		

5	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	370	375	380	
10	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	385	390	395	400
15	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	405	410	415	
20	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	420	425	430	
25	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Ala	Ser	Asp	435	440	445	
30	Thr	Thr	Glu	Pro	Ala	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Thr	Asp	Thr	Ile	450	455	460	
35	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Val	Asp	Thr	Val	465	470	475	480
40	Leu	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ser	Val	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	485	490	495	
45	Ser	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Arg	Leu	Lys	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu	Gln	500	505	510	
50	Leu	Gly	Lys	Cys	Asn	Ile	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	515	520	525	
55	Asp	Pro	Leu	Leu	Pro	Val	Arg	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val	Glu	Thr	Pro	530	535	540	
60	Asn	Ser	Glu	Asn	Gly	Ile	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe	Ile	Asp	Tyr	Glu	545	550	555	560
65	Glu	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Arg	Phe	Glu	565	570	575	
70	Ile	Phe	Pro	Lys	Glu	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Asn	Thr	Asn	Gly	Val	580	585	590	
75	Thr	Ala	Ala	Cys	Ser	His	Glu	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe	Tyr	Arg	Asn	Leu	595	600	605	

Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys Leu Lys Asn Ser
 610 615 620

5

Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His
 625 630 635 640

10

His Pro Pro Asn Ser Lys Glu Gln Gln Asn Leu Tyr Gln Asn Glu Asn
 645 650 655

15

Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg Arg Phe Thr Pro
 660 665 670

20

Glu Ile Ala Glu Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Ala Gly Arg Met Asn
 675 680 685

25

Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala
 690 695 700

30

Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Met Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly
 705 710 715 720

35

Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met His Glu Cys Asn
 725 730 735

40

Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Tyr
 740 745 750

45

Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Leu Lys Tyr Val Arg
 755 760 765

50

Ser Ala Lys Leu Arg Met Val His His His His His His
 770 775 780

55

<210> 10
 <211> 781
 <212> PRT
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente
 <400> 10

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

5	Asp	Ile	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	35	40	45	
10	Gly	Val	Met	Trp	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Phe	Met	50	55	60	
15	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	65	70	75	80
20	Lys	Met	Asn	Asn	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Val	85	90	95	
25	Arg	Asp	Ala	Val	Arg	Tyr	Trp	Asn	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	100	105	110	
30	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	115	120	125	
35	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	130	135	140	
40	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155	160
45	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175	
50	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190	
55	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205	
60	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	210	215	220	
65	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235	240
70	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	245	250	255	
75	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	260	265	270	

	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
			275					280					285				
5	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
		290					295					300					
10	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305					310					315					320	
15	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
					325					330					335		
20	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
				340					345					350			
25	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
			355					360					365				
30	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
	370						375					380					
35	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
	385					390					395					400	
40	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
				405						410					415		
45	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
			420						425					430			
50	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Ala	Ser	Asp	
			435				440						445				
55	Thr	Thr	Glu	Pro	Ala	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Ile	
	450						455					460					
60	Cys	Ile	Gly	Tyr	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Glu	Gln	Val	Asp	Thr	Ile	
	465					470					475					480	
65	Met	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	His	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	Glu	Lys	
				485						490				495			
70	Lys	His	Asn	Gly	Lys	Leu	Cys	Asp	Leu	Asp	Gly	Val	Lys	Pro	Leu	Ile	
			500						505					510			

	Leu	Arg	Asp	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn	Pro	Met	Cys	
			515					520					525				
5	Asp	Glu	Phe	Ile	Asn	Val	Pro	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	Val	Glu	Lys	Ala	
		530					535					540					
10	Asn	Pro	Val	Asn	Asp	Leu	Cys	Tyr	Pro	Gly	Asp	Phe	Asn	Asp	Tyr	Glu	
	545					550					555					560	
15	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Leu	Ser	Arg	Ile	Asn	His	Phe	Glu	Lys	Ile	Gln	
					565					570					575		
20	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ser	Trp	Ser	Ser	His	Glu	Ala	Ser	Leu	Gly	Val	
				580					585					590			
25	Ser	Ser	Ala	Cys	Pro	Tyr	Gln	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe	Phe	Arg	Asn	Val	
			595					600					605				
30	Val	Trp	Leu	Ile	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr	Pro	Thr	Ile	Lys	Arg	Ser	
	610						615					620					
35	Tyr	Asn	Asn	Thr	Asn	Gln	Glu	Asp	Leu	Leu	Val	Leu	Trp	Gly	Ile	His	
	625					630					635					640	
40	His	Pro	Asn	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Thr	Lys	Leu	Tyr	Gln	Asn	Pro	Thr	
					645					650					655		
45	Thr	Tyr	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg	Leu	Val	Pro	
				660					665					670			
50	Arg	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	Arg	Met	Glu	
			675					680					685				
55	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn	Phe	Glu	Ser	
	690						695					700					
60	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile	Val	Lys	Lys	
	705					710					715					720	
65	Gly	Asp	Ser	Thr	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Gly	Asn	Cys	Asn	
					725					730					735		
70	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser	Met	Pro	Phe	
				740					745					750			
75	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys	

	755		760		765
5	Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala His His His His His His				
	770		775		780
	<210> 11				
	<211> 695				
10	<212> PRT				
	<213> Artificial				
	<220>				
15	<223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente				
	<400> 11				
	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala				
20	1 5 10 15				
	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr				
	20 25 30				
25	Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile				
	35 40 45				
30	Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe				
	50 55 60				
	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr				
35	65 70 75 80				
	Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys				
40	85 90 95				
	Ala Arg Pro Tyr Gly Ser Glu Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly				
	100 105 110				
45	Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe				
	115 120 125				
50	Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu				
	130 135 140				
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp				
55	145 150 155 160				
	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu				
60	165 170 175				

	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185						190		
5	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
10	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	
		210					215					220					
15	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	225					230					235					240	
20	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
					245					250					255		
25	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
			275					280					285				
30	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
		290					295					300					
35	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
	305					310					315					320	
40	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
					325					330					335		
45	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
				340					345					350			
50	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
			355					360					365				
55	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
		370					375					380					
60	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
	385					390					395					400	
65	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
					405					410					415		
70	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	

	420	425	430
5	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala Ser 435 440 445		
10	Asp Met Ala Lys Lys Glu Thr Val Trp Arg Leu Glu Glu Phe Gly Arg 450 455 460		
15	Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser 465 470 475 480		
20	Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala Phe 485 490 495		
25	Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr 500 505 510		
30	Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala 515 520 525		
35	Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp 530 535 540		
40	Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met 545 550 555 560		
45	Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln 565 570 575		
50	Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu 580 585 590		
55	Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met 595 600 605		
60	Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro 610 615 620		
65	Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln 625 630 635 640		
70	Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln 645 650 655		
75	Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala 660 665 670		

Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro
 675 680 685
 5
 Gly His Lys Ala Arg Val Leu
 690 695
 10
 <210> 12
 <211> 712
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente
 <400> 12
 20
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 30 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 35
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 40
 Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45
 Ala Arg Pro Tyr Gly Ser Glu Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 50
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 55
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 60
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

	165								170					175				
5	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
				180					185					190				
10	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro		
			195					200					205					
15	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro		
		210					215					220						
20	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
	225					230					235					240		
25	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
					245					250					255			
30	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val		
				260					265					270				
35	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
			275					280					285					
40	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val		
		290					295					300						
45	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys		
	305					310					315					320		
50	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
					325					330					335			
55	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro		
				340					345					350				
60	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val		
			355					360					365					
65	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly		
		370					375					380						
70	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp		
	385					390					395					400		
75	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp		
					405					410					415			

0

Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly
 660 665 670

5 Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro
 675 680 685

10 Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile
 690 695 700

15 Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn Pro
 705 710

<210> 13
 <211> 522
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Polipeptídeo sintetizado quimicamente
 <400> 13

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

30 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

35 Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

40 Gly Val Met Trp Thr Gly Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met
 50 55 60

45 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

50 Lys Met Asn Asn Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

Arg Asp Ala Val Arg Tyr Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
 100 105 110

55 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

0 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

5	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155	160
10	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175	
15	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190	
20	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205	
25	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	210	215	220	
30	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235	240
35	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	245	250	255	
40	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	260	265	270	
45	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	275	280	285	
50	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	290	295	300	
55	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	305	310	315	320
60	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	325	330	335	
65	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	340	345	350	
70	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	355	360	365	
75	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	370	375	380	

```

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385                      390                      395                      400

5
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                      405                      410                      415

10
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
                      420                      425                      430

15
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala Ser Asn
                      435                      440                      445

20
Ser Pro Gln Asn Glu Val Leu Tyr Gly Asp Val Asn Asp Asp Gly Lys
                      450                      455                      460

25
Val Asn Ser Thr Asp Leu Thr Leu Leu Lys Arg Tyr Val Leu Lys Ala
465                      470                      475                      480

Val Ser Thr Leu Pro Ser Ser Lys Ala Glu Lys Asn Ala Asp Val Asn
                      485                      490                      495

30
Arg Asp Gly Arg Val Asn Ser Ser Asp Val Thr Ile Leu Ser Arg Tyr
                      500                      505                      510

35
Leu Ile Arg Val Ile Glu Lys Leu Pro Ile
                      515                      520

<210> 14
<211> 36
40 <212> DNA
    <213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente
45
<400> 14
    ggatggtggg aagatggata cagttggtgc agcatc
                                         36

50 <210> 15
    <211> 48
    <212> DNA
    <213> Artificial

55 <220>
    <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente

<400> 15
    ctaggaacag tcagcacggg acaaactctt ctccacagtg tgaccttc
50                                         48

```

<210> 16
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente
 <400> 16
 10 gtcactggct cagggaaata gcccttgacc aggcac 37
 <210> 17
 <211> 31
 15 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente
 20
 <400> 17
 ccaggcatcc tagagtcacc gaggagccag t 31
 <210> 18
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente
 30
 <400> 18
 35 ggtgctggag gggacagtca ctgagctgct catagtgt 38
 <210> 19
 <211> 107
 <212> DNA
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente
 45
 <400> 19
 ctagttgctg gctaattggac cccaaaggct ccctttcctg gagaataactt ctgtttctct 60
 ccctggcttt tgagttgtcg tacggattaa ttaagggccc actcgag 107
 50
 <210> 20
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente
 <400> 20
 60 gctagctgat taattaa 17

<210> 21
 <211> 100
 <212> DNA
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente

 10 <400> 21
 ctagtgtgctg gctaattggac cccaaaggct ccctttcctg gagaatactt ctgttttctct 60

 ccctggcttt tgagttgtcg tacggattaa ttaagggccc 100

 15
 <210> 22
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente

 <400> 22
 25 gctagcgata caacagaacc tgcaacacct acaacacctg taacaa 46

 <210> 23
 <211> 29
 30 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente
 35
 <400> 23
 caccatcacc atcaccattg agcggccgc 29

 40 <210> 24
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente

 <400> 24
 50 gctagcgata caacagaacc tgcaacacct acaacacctg taacaacacc gacaacaaca 60
 cttctagcgc 70

 55 <210> 25
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Oligonucleotídeo sintetizado quimicamente

<400> 25
gctagcccca ttctgagccc cctgaccaaa ggcattcttg gctttgtgtt taccctgacc 60
gtgcccagcg aacgcaaggg tatacttgga ttcgttttca cacttactta agcggccgc 119