



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

(21) PI0710649-1 A2



* B R P I 0 7 1 0 6 4 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 11/04/2007
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)

(51) Int.CI.:
C07K 14/415 2006.01
C12N 15/29 2006.01
A61K 39/36 2006.01

(54) Título: PROTEÍNAS QUIMÉRICAS
HIPOALERGÊNICAS PERTENCENTES À FAMÍLIA DE
TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA DE PARIETARIA
JUDAICA PARA USO NO TRATAMENTO DE
ALERGIAS

(30) Prioridade Unionista: 12/04/2006 ES 200600955

(73) Titular(es): Bial Industrial Farmacéutica, S.A

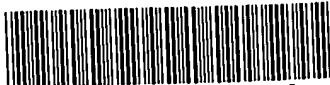
(72) Inventor(es): Alberto Martinez Garate, Juan Andrés Asturias , Roberto Gonzales Rioja

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT IB2007001025 de 11/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/116316de 18/10/2007

(57) Resumo: PROTEÍNAS QUIMÉRICAS HIPOALERGÊNICAS PERTENCENTES À FAMÍLIA DE TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA DE PARIETARIA JUDAICA PARA USO NO TRATAMENTO DE ALERGIAS A presente invenção refere-se a proteínas quiméricas hipoalergênicas que pertencem à família de transferência lipídica de Parietaria judaica para uso no tratamento de alergias. A presente invenção refere-se às moléculas de DNA recombinantes que codificam os polipeptídeos quiméricos para diferenciar os alérgenos de Parietaria judaica que podem ser usados para a prevenção e tratamento de alergias, em particular alergia ao pólen. Especificamente, os polipeptídeos quiméricos compostos de fragmentos dos alérgenos Par j 1 e Par j 2 que possuem características hipoalergênicas são descritos. Também são descritos métodos para produzir esses polipeptídeos recombinantes em sistemas de expressão heteróloga. Também descrevem- se métodos eficientes para purificar as proteínas quiméricas.



PI0710649-1

Resumo Descritivo da Patente de Invenção para "PROTEÍNAS QUIMÉRICAS HIPOALERGÊNICAS PERTENCENTES À FAMÍLIA DE TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA DE *PARIETARIA JUDAICA* PARA USO NO TRATAMENTO DE ALERGIAS".

5 DESCRÍÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo da produção de proteínas quiméricas para a prevenção e tratamento de alergias, em particular, alergias ao pólen e, mais particularmente, alergias causadas por alérgenos da família da proteína de transferência lipídica e mais especificamente aqueles encontrados no pólen de espécies de *Parietaria*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As alergias Tipo I são um problema significativo em países industrializados. Esse tipo de alergia é causado pela formação de anticorpos IgE contra抗ígenos transmitidos pelo ar. Esses anticorpos IgE interagem com os mastócitos e basófilos, liberando mediadores biológicos, tal como, histamina, e causando rinite alérgica, conjuntivite e asma brônquica em cerca de 20% da população [(1) Miyamoto, T. (1992). Increased prevalence of pollen allergy in Japan. In Advances in Allergology and Clinical Immunology. P. Godard, J. Bousquet, and F. B. Michel, eds . (Cornforth, UK: The Parthenon Publishing Group), pp. 343-347].

A imunoterapia específica (SIT) é um tratamento eficaz para reações alérgicas ativadas por alérgenos específicos e consiste basicamente na modulação da resposta imune no paciente pela administração regular, em concentrações crescentes, das proteínas que reduzem a alergia (extratos alergênicos). Altas doses dos alérgenos injetados induzem a alta síntese de IL-12 pelas células apresentadoras de抗ígenos, por exemplo, as células dendríticas, que promovem, de preferência, o desenvolvimento de células T que são células virgens cooperativas (nT_H) frente a T_H1 ou T_H0 . Isso permite um desvio da resposta imune do tipo resposta alérgica relacionada às células T_H2 frente a um tipo de resposta T_H1/T_H0 que resulta na produção de altos níveis de IFN- γ [(2) Akdis, C.A. and Blaser, K. (2000). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Allergy 55, 522-530] . O desvio imunológico

co é reforçado pela indução da tolerância (por energia ou deleção clonal) de células de memória TH2 sob a influência de células T reguladoras (TR1) que produzem as citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- β [(3) Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., and Blaser, K. (2001) . Mechanism of IL-10 induced cell 5 inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens. Int. Arch Allergy Immunol. 124; 180-182]. A redução na ativação e proliferação das células T_{H2} está associada com a produção reduzida de IL-4, e de IgEs com as células B. A redução na atividade e infiltração das células T_{H2} no muco nasal e brônquico resulta na síntese de IL-5, permitindo uma redução 10 na infiltração de eosinófilos que resulta em uma grande redução na liberação de mediadores inflamatórios, tais como, proteínas MBP e ECP. Os novos clones específicos de células T de alérgeno de fenótipo predominante T_{H0} produzem uma mistura de citocinas tipo T_{H1} e T_{H2} que promovem a produção 15 de uma grande quantidade de anticorpos alérgenos específicos IgG pelas células B. Por outro lado, os altos níveis de IL-10 induzem a alta síntese de anticorpos alérgenos específicos IgG4. Esses dois tipos de anticorpos específicos podem atuar como anticorpos de bloqueio que proporcionam a interseção dos anticorpos IgE combinados com seus receptores nos mastócitos e, portanto, inibem a degranulação e liberação de histamina [(4) Mover- 20 rate, R. (2003). Immunological mechanisms of specific immunotherapy with pollen vaccines: implications for diagnostics and the development of improved vaccination strategies. Expert Rev. Vacc. 2, 85-97; (5) Wachholz, P.A., Soni, N. K., Till, S., and Durham, S. R. (2003). Inhibition of allergen-IgE bind- 25 ing to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. J. Allergy Clin. Immunol. 112; 915-922]. Esses também bloqueiam a coleta de antí- geno mediado por IgE pelas células contendo antígeno, e esse suprime a res- posta imune aos alérgenos.

Os extratos alérgenos isolados de fontes naturais são misturas complexas de proteínas e outras moléculas. Sua composição, e, portanto 30 alergenicidade, depende do material usado, que varia de acordo com as condições ambientais, o estado de maturação no caso de pólenes e as condições de crescimento de ácaros, etc., no caso de fungos, etc. Alguns extratos

podem conter ainda uma concentração inadequada de grandes alérgenos e podem ainda ser contaminados por componentes indesejados aos quais o paciente não é alérgico, ou ambos. A imunoterapia atual usa exclusivamente extratos alérgenos completos, e isso resulta em inúmeros problemas, tais

5 como:

- reações adversas graves relacionadas à reatividade da vacina com IgE das células efetoras;

- aparência de nova sensibilização a outros alérgenos presentes na vacina após a imunoterapia;

10 - dificuldades na padronização dos extratos alérgenos.

Isso significa que a imunoterapia não é um tratamento seguro e eficaz como desejado. Um melhor entendimento da patogênese de alergia e dos mecanismos da imunoterapia específica tornou possível chegar mais perto da solução para os problemas mencionados acima. O conhecimento

15 da influência do antígeno mediado por IgE na resposta ao alérgeno específico TH2 aumentou os esforços para criar alérgenos que não se ligam a IgE. O objetivo principal da imunoterapia específica atual é modificar o alérgeno com o auxílio da inativação dos epitopos de IgE reduzindo, assim, e ainda eliminando a ligação a IgE e consequentemente as reações adversas [(6)

20 Valenta, R. and Linhart, B. (2005). Molecular design of allergy vaccines. Curr. Opin. Immunol. 27, 1-10]. Dessa forma, o alérgeno modificado será dirigido frente às células T, por um mecanismo de coleta de antígeno mediada por fagocitose/pinocitose, impedindo a intersecção de IgE e a apresentação de antígeno dependente de IgE. Isso induz um equilíbrio em produção

25 de citocina TH0 ou TH1 pelas células T, menor produção de IgE e maior produção de IgG pelas células B; resultando na indução de tolerância da célula T tipo TH2 sem o risco de anafilaxia. O progresso em métodos recombinantes para obter alérgenos e derivados de alérgenos permitiu um grande aumento na capacidade de desenvolver novas vacinas para o tratamento de

30 alergias. Isso se tornou possível devido à possibilidade de modificar ou deletar os aminoácidos significantes de epitopos de IgE, bem como o fracionamento e oligomerização desses para obter vacinas hipoalergênicas. Essas

moléculas que possuem uma menor capacidade de se ligar a IgE, porém mantêm sua reatividade frente às células T podem ser administradas em doses maiores, permitindo uma imunoterapia mais rápida e mais segura com um número menor de injeções. Ademais, os alérgenos recombinantes podem ser produzidos em larga escala em tanques de fermentação, utilizando sistemas de expressão microbiana, e a purificação desses é mais eficaz e econômica do que a de seus equivalentes naturais. O uso de derivados hipoalergênicos em imunoterapia foi anteriormente descrito utilizando fragmentos de trímeros de Bet v 1 [(7) Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., 5 Spitzauer, S., Krauth, M. T., Valent, P., Reisinger, J., Pelzmann, M., Hayek, B., Kronqvist, M., Gafvelin, G., Grönlund, H., Purohit, A., Suck, R., Fiebig, H., Cromwell, O., Pauli, G., van Hage-Hamsten, M., and Valenta, R. (2004). Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. u. S. A. 101, 14677-14682], multi-allergenic hybrids of bee venom proteins (Api in 1, 2, 3) [(8) Schmid-Grendelmeier, P., Karamloo, F., Müller, U., Housley-Marcovic, Z., Soldatova, L., Zumkehr, J., Kemeny, D. M., Kündig, T., Reimers, A., von Beust, B. R., Salagianni, M., Akdis, M., Kussebi, F., Spangfort, M. D., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2005). Prevention of allergy by a recombinant multi-allergen vaccine with reduced IgE binding and preserved T cell epitopes. Eur. J. Immunol. 35, 3268-3276] and mutated fusions of Par j 2 and Par j 1 for eliminating 10 their tertiary structure.

Alguns autores mencionam que as vacinas alergênicas não deveriam ser feitas com hipoalérgenos visto que a ligação a IgE poderia facilitar a captura e apresentação do alérgeno pelas células apresentadoras de 15 antígenos profissionais, como células dendríticas e células de linfócitos B ativadas, que expressam os receptores de superfície de IgE tanto de alta afinidade como de baixa afinidade. Essa abordagem possui um significado especial quando se utiliza a via sublingual em imunoterapia. A intersecção 20 de receptores de alta afinidade também pode resultar em uma redução na resposta de células T frente aos alérgenos [(9) Allam, J. P., Novak, N., Fuchs, C., Asen, S., Berge, S., Appel, T., et al. (2003) Characterization of den-

dritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive Fc ϵ RI expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112,141-8. (10) von Bubnoff, D., Matz, H., Frahnert, C., Rao, M. L., Hanau, D., de la Salle, H., Bieber, T. (2003) Fc ϵ RI induces the triptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J. Immunol.* 169, 1810-1816]. Muitos pesquisadores ainda fazem uso desse tipo de vacina sem introduzir deleções [(11) Batard, T., Didierlaurent, A., Chabre, H., Mothes, N., Bussieres, L., Bohle, B., et al. (2005) Characterization of wild-type recombinant Bet v 1a as a candidate vaccine against birch pollen allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 136, 10 239-249. (12) Jutel, M., Jaeger, L., Suck, R., Meyer, H., Fiebig, H., Cromwell, O. (2005) Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 608-13. (13) Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, M. T., Valent, P., et al. (2004) Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14677-82. (14) Cromwell, O., Fiebig, H., Suck, R., Kahlert, H., Nandy, A., Kettner, J., et al. (2006) Strategies for recombinant allergen vaccines and fruitful results from first clinical studies. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 26, 261-81].

Parietaria é um gênero de planta dicotiledônea da família *Urticaceae*, e a ordem *Urticales*. Várias espécies do gênero *Parietaria* são ampla e abundantemente distribuídas ao longo da Costa Mediterrânea [(15) Colombo, P., Duro, G., Costa, M.A. , Izzo, V., Mirisola, M., Locorotondo, G., Coccchiara, R., and Geraci, D. (1998). An update on allergens. *Parietaria* pollen allergens. *Allergy* 53, 917-921]. As espécies mais comuns são *P. judaica* e *P. officinalis*, porém outras espécies, tais como, *P. lusitanica*, *P. mauritanica* e *P. cretica*, podem estar presentes em algumas regiões. No entanto, as regiões mediterrâneas não são as únicas onde se encontram pólen de *Parietaria*, visto que sua presença foi descrita no sul da Inglaterra, Áustria, regiões temperadas de Europa Central e Oriental Austrália e Califórnia [(16) Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo, V., Passantino, R., Licorotondo, G., Amoroso, S., and Gerasi, D. (2003). The allergens of *Parietaria*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 130, 173-179; (17) Carreira, J. and Polo, F. (1995) . The allergens

of *Olea europaea* and *Parietaria* spp. and their relevance in the Mediterranean Area. Allergy Clin. Immunol. News 7, 79-84]. Uma característica significativa de *Parietaria* é o longo período de polinização que dura vários meses e resulta na presença de quase todos os sintomas contínuos em pacientes que são alérgicos a *Parietaria*, que variam de rinoconjuntivite leve a asma grave. Deve ser observado que a leve sensibilização monoespecífica normal a *Parietaria* envolve a sensibilização a várias espécies desse gênero, uma vez que contrariamente foi demonstrada a reatividade significativa entre espécies diferentes de *Parietaria*.

10 Diversos documentos foram apresentados sobre a purificação e
caracterização de frações alergênicas das duas espécies mais comuns que
são *P. judaica* e *P. officinalis*. Essas frações possuem pesos moleculares na
faixa de 10 a 14 kDa e são responsáveis virtualmente por toda a potência
alergênica de seus extratos [(16) Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo,
15 V., Passantino, R., Licorotondo, G., Amoroso, S., and Gerasi, D. (2003). The
allergens of *Parietaria*. Int. Arch. Allergy Immunol. 130, 173-179; (18) Ayuso,
R., Carreira, J., Lombardero, M., Duffort, O., Peris, A., Basomba, A., and Po-
lo, F. (1993). Isolation by mAb based affinity chromatography of two Par j
isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and
20 allergenic properties. Mol. Immunol. 30, 1347-1354; (19) Polo, F., Ayuso, R.,
and Carreira, J. (1990) . HPLC purification of the main allergen of *Parietaria*
judaica pollen. Mol. Immunol. 27, 151-157; (20) Polo, F., Ayuso, R., and Car-
reira, J. (1991). Studies on the relationship between structure and IgE-
binding ability of *Parietaria judaica* allergen I. Mol. Immunol. 28, 169-175] . O
25 desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante permitiu a caracteriza-
ção molecular de pólen de *Parietaria* que será completada: os dois alérge-
nos principais de pólen de *P. judaica* conhecidos como Par j 1 e Par j 2 fo-
ram clonados e seqüenciados [(21) Duro, G., Colombo, P., Costa, M.A. , Iz-
zo, V., Porcasi, R., DiFiore, R., Locorotondo, G., Mirisola, M. G., Cocchiara,
30 R., and Geraci, D. (1996) . cDNA cloning, sequence analysis and allergologi-
cal characterization of Par j 2.0101, a new major allergen of the *Parietaria*
judaica pollen. FEBS Lett. 399, 295-298; (22) Costa, M.A. , Colombo, P., Iz-

zo, V., Kennedy, H., Venturella, S., Cocchiara, R., Mistrello, G., Falagiani, P., and Geraci, D. (1994). cDNA cloning expression and primary structure of Par j 1, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. FEBS Lett. 341, 182-186; (23) Amoresano, A., Pucci, P., Duro, G., Colombo, P., Costa, M.A., Izzo, V., 5 Lambda, D., and Geraci, D. (2003). Assignment of disulphide bridges in Par j 2.0101, a major alérgeno of *Parietaria judaica* pollen. Biol. Chem. 384, 1165-1172]. Ambos os alérgenos pertencem à família de proteínas de transferência lipídica não-específica (ns-LTP) e possuem um peptídeo de sinal em sua região terminal que, após o processamento, dá origem a proteínas com um 10 peso molecular de 14.726 e 11.344 Da respectivamente e com cerca de 45% de resíduos idênticos. Os possíveis epitopos lineares de ligação a IgE em ambos os alérgenos, que poderiam estar situados em zonas estruturalmente relacionadas, foram descritos [(24) Asturias, J.A., Gómez-Bayón, N., Eseverri, J. L., and Martínez, A. (2003). Par j 1 e Par j 2, os alérgenos principais 15 do pólen de *Parietaria judaica*, possuem epitopos E da imunoglobulina similares. Clinical and Experimental Allergy 33, 518-524]. Essas regiões são os alvos que serão atuados de modo a serem capazes de obter as moléculas hipoalergênicas ótimas para o tratamento da alergia ao pólen de *P. judaica*.

20 As ns-LTP são bem-conhecidas por sua capacidade de complementar *in vitro* a troca intermembrana e/ou transferência de lipídeos polares [(25) van Ree, R. (2002). Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. Biochem. Soc. Trans 30, 910-913]. As duas principais famílias foram caracterizadas em plantas, LTP1 com uma massa molecular de 25 aproximadamente 9 kDa e LTP2 com uma massa molecular de aproximadamente 7 kDa. Os alérgenos pertencentes à família LTP foram identificados em plantas em vez de alimentos, onde esses foram amplamente estudados. Assim, Hev b 12 do látex de *Hevea brasiliensis* é uma proteína básica de 9,3 kDa que mostra cerca de 65% de identidade de seqüência com as LTPs alergênicas de frutos da família Rosaceae [(26) Beezhold, D. H., Hickey, V. L., Kostyal, D.A., and et al. (2003). Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. Ann Allergy Asthma Immunol 439-30

445] . Além disso, alguns alérgenos de pólen foram descritos como LTPs, tal como, Art v 3 de *Artemisia vulgaris* [(27) Díaz-Perales, A., Lombardero, M., Sanchez-Monge, R., and et al. (2000). As proteínas de transferência lipídica como panalérgenos de planta potenciais: reatividade cruzada entre proteínas de pólen de *Artemisia*, castanha *Castanea* e frutos *Rosaceae*, com capacidades de ligação a IgE diferentes. Clin Exp Allergy 1403-1410] and Ole e 7 of *Olea europaea* [(28) Tejera, M. L., Villalba, M., Batanero, E., and Rodriguez, R. (1999). Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. J. Allergy Clin. Immunol. 797-802; (29) Rodriguez, R., Villalba, M., Batanero, E., and et al. (2002). Allergenic diversity of the olive pollen. Allergy 6-16] que possuem 9 a 10 kDa e possuem 30 a 55% de identidade de seqüência com LTPs alergênicas de alimentos. Os principais alérgenos de *P. judaica*, Par j 1 e Par j 2, que possuem cerca de 45% de identidade de seqüência um com o outro, por outro lado, possuem pesos moleculares maiores do que o normal na família de LTPs; 14,7 e 11,3 kDa, respectivamente [(16) Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo, V., Passantino, R., Licorotondo, G., Amoroso, S., and Gerasi, D. (2003). The allergens of *Parietaria*. Int. Arch. Allergy Immunol. 130, 173-179]. Entretanto, embora ambos os alérgenos possuam uma estrutura similar àquela das LTPs, esses possuem níveis moderados de identidade com LTPs de alimentos na região de seqüência comum (28% entre Par j 1 e LTP de pêssego).

O documento WO2005/085278 descreve a construção de uma proteína de fusão que compreende os dois principais alérgenos de *Parietaria judaica*, onde a estrutura tridimensional da proteína de fusão foi desorganizada pela substituição de certos resíduos de cisteína na seqüência primária de cada alérgeno (mais especificamente os resíduos de cisteína envolvidos na formação de pontes de dissulfeto) de modo que as seqüências de alérgenos mantenham essencialmente o mesmo comprimento. De acordo com os últimos experimentos, isso deveria resultar em uma proteína que é 1000 vezes menos alergênica do que os alérgenos naturais.

Os inventores da presente invenção descobriram que uma redução surpreendentemente grande na alergenicidade pode ser obtida não só

pela desorganização da estrutura tridimensional do alérgeno como também pela deleção de alguns sítios de ligação a IgE (conhecidos como epitopos B) e que, mais surpreendentemente, isso não resulta em uma redução na imunogenicidade.

5 A presente invenção descreve pela primeira vez proteínas químéricas diferentes obtidas pela ligação de fragmentos dos dois alérgenos de *Parietaria judaica* (Par j 1 e Par j 2) que contêm um número menor de epitopos de ligação a IgE, bem como métodos e intermediários diferentes para obter as mesmas. A estrutura tridimensional das proteínas químéricas não
10 só está desorganizada como também certos epitopos B foram deletados. As proteínas químéricas de acordo com a presente invenção podem ser chamadas de hipoalergênicas com uma alergenicidade reduzida em 99,99%, visto que essas possuem uma capacidade inferior de se ligarem aos anticorpos IgE com base em: i) ELISA *in vitro*, Testes de inibição e imunodetecção
15 ELISA que utilizam misturas de soros dos paciente alérgicos a *P. judaica*; ii) testes *in vivo* de reatividade cutânea em pacientes alérgicos a *P. judaica*; e iii) teste de inibição EAST *in vitro* com soros individualizados de pacientes alérgicos a *P. judaica*. As proteínas químéricas de acordo com a presente invenção, por outro lado, mantêm sua capacidade imunogênica, como mostrado por testes de linfoproliferação em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 13 pacientes alérgicos a *P. judaica*.

20

Os extratos alergênicos são misturas complexas de moléculas de proteínas e não-proteínas. O uso crescente de técnicas para detectar os níveis de IgE específica contra os componentes de um extrato tornou possível
25 mostrar que paciente alérgicos geralmente possuem reatividade frente a vários componentes. Casos de pacientes alérgicos que reagem apenas a um único alérgeno são raros. Visto que os extratos alergênicos possuem problemas óbvios em imunoterapia, uma solução é agrupar o máximo de propriedades terapêuticas possível em uma única molécula.

30 **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

Os presentes inventores tiveram sucesso ao combinar dois alérgenos em uma molécula, apresentando não só benefícios do ponto de vista

de produção industrial e terapia, como também mostrando alergenicidade significativamente reduzida sem alteração na imunogenicidade.

Por essas razões, a presente invenção refere-se a proteínas quiméricas (que podem, mais adiante neste documento, ser denominadas 5 Q1, Q2, e Q3) compostas de fragmentos dos alérgenos Par j 1 e Par j 2, cuja reatividade alergênica é reduzida sem perda de capacidade imunogênica, visto que essas perdem alguns epitopos B de ligação a IgE. Dessa forma, o polipeptídeo quimérico resultante possui um peso molecular menor do que a soma das duas proteínas individuais.

10 A presente invenção também se refere à seqüência de nucleotídeo que inclui o DNA que codifica o polipeptídeo quimérico supramencionado, o sistema de expressão compreende a dita seqüência acompanhada pelas seqüências requeridas para expressão e controle, e a célula receptora transformada pelo dito sistema de expressão.

15 Essa invenção também se refere ao uso clínico desse polipeptídeo quimérico, à imunoterapia específica para o tratamento de alergias, bem como a possíveis composições em que esse polipeptídeo quimérico ocorre e aos diferentes métodos de administração desse.

20 As propriedades hipoalergênicas das proteínas quiméricas da presente invenção que permitem o uso dessas em imunoterapia foram amplamente mostradas. Os testes imunológicos realizados pelos inventores mostram que a quimera Q2 não tem reconhecimento de IgE em soros de pacientes alérgicos a *Parietaria judaica*, como ilustrado na Figura 10 e 11. Q2 possui a capacidade de ligação a IgE que é 10.000 vezes menor do que 25 aquela da mistura das duas proteínas naturais, como ilustrado na Figura 12.

30 Esses dados de baixa alergenicidade foram restringidos por experimentos in vivo em 30 pacientes por um teste cutâneo por puntura. A alergenicidade da quimera Q1 foi 3,5 vezes menor do que aquela obtida com as duas proteínas naturais isoladas (Figura 13). Por outro lado, a alergenicidade de Q2, formada por fragmentos de Par j 1 e Par j 2, que não contêm nenhum dos epitopos B descritos, foi 112 vezes menor do que aquela obtida com as duas proteínas naturais isoladas.

A baixa alergenicidade (capacidade de ligação a IgE) da quimera Q2 foi corroborada ao medir a reatividade dessa molécula com soros de 30 pacientes alérgicos a *Parietaria judaica* (Figura 14). Essa redução na alergenicidade foi surpreendentemente acompanhada pela manutenção da capacidade imunogênica da quimera Q2, que não se difere daquela da soma das proteínas naturais individuais (Figura 16).

5 A manutenção da imunogenicidade permitirá que essa quimera seja usada como um substituto do extrato completo, porém de forma muito mais segura (menor alergenicidade).

10 **Depósito de Cepas**

A cepa do microorganismo correspondente à presente invenção foi depositada na Coleção Espanhola de Tipos de Cultivos (CECT) na Universidade de Valência (Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 BURJASOT, Valencia) de acordo com o tratado 15 de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de microorganismos para o propósito de procedimentos de patente, com a seguinte referência:

Escherichia coli CECT 7141

Depositada em 7 de março de 2006.

20 **DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Figura 1 é um diagrama de construção de Q1.

A Figura 2 mostra uma seqüência de aminoácidos e nucleotídeos de Q1. Os resíduos correspondentes à cauda de afinidade do vetor pQE-32 estão sublinhados. Os resíduos introduzidos pela seção EcoRI (EF) 25 estão hachurados. Os resíduos de cisteína estão sublinhados duas vezes.

A Figura 3 mostra uma comparação dos epitopos de IgE de Par j 1 e Par j 2 (caixas) e o epitopo T (sublinhado), indicando os epitopos deletados Q2 em caixas marcadas com linhas grossas. Os resíduos idênticos (:) e resíduos similares (:) foram marcados.

30 A Figura 4 é um diagrama de construção de Q2.

A Figura 5 mostra uma seqüência de aminoácidos e nucleotídeos de Q2. Os resíduos que correspondem à cauda de afinidade do vetor

pQE-32 estão sublinhados. Os resíduos introduzidos pela seção EcoRI (EF) PstI (LQ), e EcoRV (DI) estão hachurados. Os resíduos de cisteína estão sublinhados duas vezes.

A Figura 6 mostra uma comparação dos epitopos de IgE de Par j 1 e Par j 2 (caixas) e o epitopo T (sublinhado), indicando os epitopos deletados de Q3 em caixas marcados com duas linhas. Os resíduos idênticos (:) e resíduos similares (.) foram marcados.

A Figura 7 é um diagrama de construção de Q3.

A Figura 8 mostra uma seqüência de aminoácidos e nucleotídeos de Q3. Os resíduos correspondentes à cauda de afinidade do vetor pQE-32 estão sublinhados. Os resíduos introduzidos pela seção EcoRI (EF) PstI (LQ), e EcoRV (DI), Bg1II (RS), e KpnI (GT) estão hachurados. Os resíduos de cisteína estão sublinhados duas vezes.

A Figura 9 mostra a coloração com azul de Coomassie de um gel de poliacrilamida após a eletroforese: Q1 (rota 1), Q2 (rota 2), Q3 (rota 3).

A Figura 10 mostra os resultados de uma análise de dicroísmo circular das proteínas purificadas nPar j 1-nPar j 2, Q1, Q2, e Q3.

A Figura 11 mostra a imunodetecção com anticorpos de IgE de uma mistura de soros de pacientes alérgicos a *P. judaica* que compreende: nPar j 1-nPar j 2 (rota 1), nPar j 1 (rota 2), nPar j 2 (rota 3), Q1 (rota 4), Q2 (rota 5), Q3 (rota 6).

A Figura 12 mostra uma ligação de anticorpos de IgE a Q1, Q2, e Q3 utilizando 15 soros de pacientes alérgicos a *P. judaica* (diluição 1/10). Os valores de três experimentos são mostrados com seus desvios.

A Figura 13 mostra o resultado de um teste de inibição ELISA que utiliza extrato de *P. judaica* na fase sólida e nPar j 1-Par j 2, Q1, Q2, e Q3 como inibidores utilizando uma mistura de soros de pacientes alérgicos a *P. judaica*. Cada valor corresponde à média de três experimentos com um desvio-padrão de menos de 10%.

A Figura 14 mostra o resultado de testes cutâneos realizados com extrato de *P. judaica*, nPar j 1-Par j 2 e Q1 (50 µg/ml), Q3 (250 µg/ml).

O valor mostrado é a área do adesivo em mm.

A Figura 15 mostra a determinação de IgE específica realizada com o extrato de *P. judaica*, nPar j 1-Par j 2, e Q1 (50 µg/ml), e Q2 e Q3 (250 µg/ml).

5 A Figura 16 mostra a determinação da concentração ótima para estudar a proliferação de linfócitos T em pacientes alérgicos a *P. judaica*. Índice de Estímulo (IE).

A Figura 17 mostra a proliferação de linfócitos T obtidos com extrato de *P. judaica* e 0,5 µg/ml das três proteínas quiméricas e naturais e 10 formas recombinantes de Par j 1 e Par j 2. O valor mostrado é aquele do índice de estímulo (%). Nenhuma diferença significativa (ns).

DESCRIÇÃO DETALHADA

De acordo com um aspecto da presente invenção, proporciona-se uma proteína químérica ou peptídeo de baixa alergenicidade obtida pela 15 deleção de qualquer epitopo B ou epitopo de ligação a IgE ou síntese sem qualquer epitopo B ou de ligação a IgE. A deleção irá se aplicar, de preferência, aos epitopos B nas posições 28 a 53 de Par j 1 e Par j 2.

O termo "baixa alergenicidade", e variantes similares, como usado aqui, é um termo relativo e se refere à capacidade in vivo e in vitro reduzida das proteínas e peptídeos estimularem uma resposta alérgica quando comparada com a mesma capacidade de imunógenos tipo selvagem.

De preferência, a proteína químérica compreende a seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID No.: 2, 4 ou 6, com mais preferência, a proteína químérica compreende a seqüência de aminoácido mostrada na 25 SEQ ID No 4.

A proteína químérica pode compreender alternativa ou adicionalmente uma seqüência homóloga à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID No 2, 4 ou 6. De preferência, a seqüência homóloga possui uma homologia de ao menos 70%, com mais preferência, ao menos 80%, com 30 ainda mais preferência, ao menos 90%, com mais preferência, 100%, à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID No 2, 4 ou 6, com mais preferência, à seqüência de aminoácido mostrada na SEQ ID No.: 4.

Outra modalidade preferida inclui uma proteína quimérica ou peptídeo que possui uma seqüência de aminoácido com ao menos 70%, de preferência, ao menos 80%, com mais preferência, ao menos 90%, com mais preferência, 100%, homologia à seqüência de aminoácido mostrada na

5 SEQ ID No 2, 4 ou 6.

A proteína quimérica também pode compreender uma seqüência de peptídeo que facilita sua purificação. Tais peptídeos são comumente conhecidos na técnica, por exemplo, uma cauda de poliistidina.

Os fragmentos que constituem as proteínas quiméricas podem 10 ser sintetizados por uma pessoa capacitada qualificada seguindo um esquema conhecido por amplificação na cadeia polimerase (PCR). Os ditos fragmentos, após serem digeridos por enzimas de restrição apropriadas, podem integrar a ligação a um vetor de expressão. Esse vetor de expressão (semelhante ao vetor comercial pQE32) pode possuir a capacidade de fundir 15 a proteína quimérica com as seqüências que ajudam a purificação, tais como, uma série de histidinas posicionadas no terminal amino. Durante a construção das proteínas quiméricas, os diferentes fragmentos de DNA são ligados por ligadores formados por seqüências identificadas por enzimas de restrição diferentes, e resíduos que não existem na seqüência original do alér- 20 geno natural, então, surgem na molécula quimérica final. Esses novos resíduos, que não interferem na leitura correta da proteína, foram marcados nas seqüências na Figura 2, 5, e 8, e estão apropriadamente descritos exemplos relativos. Similarmente, as quimeras possuem 14 resíduos na zona amino- 25 terminal que não estão presentes na seqüência original e poderiam corres- ponder à região rica em histidina que permite uma rápida purificação por interação com metais divalentes ligados a suportes sólidos.

De acordo com um segundo aspecto da presente invenção, proporciona-se um polinucleotídeo que codifica uma proteína ou peptídeo da invenção.

30 De preferência, o polinucleotídeo compreende a seqüência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID No 1, 3 ou 5, com mais preferência, o polinucleotídeo compreende a seqüência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID

No 3.

O polinucleotídeo pode compreender alternativa ou adicionalmente uma seqüência homóloga à seqüência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID No 1, 3 ou 5. De preferência, a seqüência homóloga possui uma homologia de ao menos 70%, com mais preferência, ao menos 80%, com ainda mais preferência, ao menos 90%, com mais preferência, ao menos 95%, à seqüência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID No.: 1, 3 ou 5.

Outra modalidade preferida inclui um polinucleotídeo que possui uma seqüência de nucleotídeo com ao menos 70%, de preferência, ao menos 80%, com mais preferência, ao menos 90%, com mais preferência, 100%, homologia à seqüência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID No.: 1, 3 ou 5.

O polinucleotídeo pode compreender ainda uma seqüência que codifica um peptídeo-sinal. O peptídeo-sinal é uma seqüência de aminoácido que inicia o transporte de uma proteína através da membrana do retículo endoplasmático. Os peptídeos-sinal adequados serão reconhecidos por um versado na técnica no campo da invenção.

A invenção também inclui peptídeos codificados por uma seqüência de polinucleotídeo da invenção.

De acordo com outros aspectos da presente invenção proporciona-se um sistema de expressão que compreende uma seqüência de polinucleotídeo da invenção, e uma célula hospedeira transformada pelo dito sistema de expressão capaz de expressar uma proteína ou peptídeo da invenção.

A invenção também inclui métodos para formar um peptídeo ou proteína da invenção, sendo que o dito método inclui as etapas de

(i) preparar um sistema de expressão duplicável capaz, em uma célula hospedeira, de expressar uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma proteína ou peptídeo da invenção;

(ii) transformar uma célula hospedeira com o dito sistema de expressão;

(iii) cultivar a dita célula hospedeira transformada sob condições

que permitem a expressão da dita proteína ou peptídeo; e

(iv) opcionalmente, recuperar a dita proteína ou peptídeo.

A invenção também compreende animais transgênicos capazes de produzir uma proteína ou peptídeo da invenção, por exemplo, no seu leite ou na parte branca de seus ovos.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, proporciona-se o uso de uma proteína ou peptídeo da invenção para o tratamento de um distúrbio imunológico, particularmente, um distúrbio de hipersensibilidade, tal como, alergia.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção, proporciona-se o uso de uma proteína ou peptídeo da invenção para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio imunológico, particularmente, um distúrbio de hipersensibilidade, tal como, alergia. O medicamento é, de preferência, uma vacina.

O distúrbio de hipersensibilidade é, de preferência, uma alergia ao pólen da *Parietaria*, com mais preferência, pólen da *Parietaria judaica*.

Como usado aqui, o termo tratamento e variações, tais como, "tratar" ou "tratando" se refere a qualquer regime que pode beneficiar um animal humano ou não-humano. O tratamento pode ser referente a uma condição existente ou pode ser profilático (tratamento preventivo). O tratamento pode incluir efeitos curativos, aliviadores ou profiláticos. De preferência, o tratamento é um tratamento profilático.

Ainda de acordo com um aspecto adicional da presente invenção proporciona-se uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de uma proteína ou peptídeo da invenção e um excipiente farmaceuticamente aceitável. De preferência, a composição farmacêutica é uma composição de vacina.

Ainda de acordo com um aspecto adicional da presente invenção proporciona-se um método para tratar um distúrbio imunológico, particularmente um distúrbio de hipersensibilidade, tal como, alergia, sendo que o dito método compreende a etapa de administrar uma quantidade eficaz de uma proteína ou peptídeo da invenção em um indivíduo necessitado desse.

De acordo com outro aspecto da presente invenção proporciona-se uma proteína ou peptídeo da invenção para uso no tratamento de um distúrbio imunológico, particularmente um distúrbio de hipersensibilidade, tal como, alergia.

5 A seleção das formas de administração e dosagem apropriadas para um paciente particular será evidente aos versados na técnica.

A presente invenção abrange o uso de quimeras de acordo com a presente invenção, de preferência, a quimera Q2, ou peptídeos sintéticos derivados dessa para tratamentos de dessensibilização em mamíferos. Os 10 métodos de dessensibilização envolvem a administração repetida por vias parenterais (subcutânea, intravenosa, ou intramuscular), ou vias orais, nasais ou retais do alérgeno em questão. Esses (poli)peptídeos podem ser administrados tanto separados com em combinação a outros diluentes, de acordo com a legislação vigente e os procedimentos galênicos para uso.

15 As proteínas quiméricas Q2 e Q3 descritas na invenção são hipoalergênicas uma vez que, como mostrado na Figura 10, 11, 12 e 14, essas possuem reatividade menor inferior ao soro de pacientes alérgicos a *P. judaica* do que o extrato completo ou as proteínas naturais combinadas, e, além disso, essa hipoalergenicidade também é encontrada em testes cutâneos *in vivo* (Figura 13).

20 As moléculas quiméricas Q1 e Q2 também possuem uma capacidade imunogênica similar àquela das proteínas naturais combinadas (Figura 16). Ambas as características (hipoalergenicidade e imunogenicidade) tornam a quimera Q2 um excelente candidato para o tratamento preventivo e 25 curativo da alergia ao pólen da *P. judaica* que pode ser manifestada como rinite, conjuntivite, asma, urticária, angioedema, eczema, dermatite, ou ainda choque anafilático.

As características imunológicas da proteína quimérica de acordo 30 com a presente invenção serão descritas a seguir. A Figura 10 mostra um teste de imunodetecção que indica que as quimeras Q2 e Q3 (rotas 5 e 6) possuem uma capacidade de ligação a IgE significativamente reduzida em pacientes alérgicos quando comparado com a reatividade das duas proteí-

nas naturais (rota 1), as proteínas recombinantes isoladas (rotas 2 e 3) ou a quimera (rota 4), que mostra a fusão recombinante das duas proteínas que são completas, porém contêm todos seus epitopos B. Isso deveria indicar que a ausência dos epitopos B incluídos entre os resíduos 29 e 52 (quimera 5 Q2) contribui para a redução na alergenicidade. Um resultado similar foi obtido quando a reatividade de 15 soros diferentes frente às proteínas quiméricas foi investigada (Figura 11). As proteínas quiméricas Q2 e Q3 possuem reatividade muito menor do que aquela observada em Q1, que é a ligação dos dois alérgenos completos (Par j 1-Par j 2). Essa redução na alergenicidade 10 foi quantificada pela inibição de ELISA com uma mistura de soros de pacientes alérgicos a *P. judaica* (Figura 12). Foram requeridos 10.000 vezes mais proteína Q2 para atingir 60% de inibição do extrato do que a mistura das duas proteínas naturais. Poderia ser, portanto, concluído que é 10.000 vezes menos alergênica do que as proteínas naturais e cerca de 20 vezes 15 menos alergênica do que a proteína quimérica Q1.

Uma medida mais direta da hipoalergenicidade da quimera Q2 foi obtida pela medida direta de reatividade cutânea em 30 pacientes alérgicos ao pólen de *P. judaica*. Os dados determinados na Figura 13 mostram que a quimera Q2 apresenta uma redução marcada em reatividade cutânea. 20 Uma comparação das descrições de cada distribuição mostra que a quimera Q2 possui um tamanho médio de adesivos 112 vezes menor do que aquele observado nas duas proteínas naturais, e isso indica uma redução na atividade alergênica em mais de 99%.

A baixa capacidade de ligação de IgE com a proteína quimérica 25 Q2 também foi mostrada com os soros de mais 30 pacientes alérgicos a *P. judaica* medida por EAST (Figura 14). Em todos os pacientes, a ligação a IgE foi significativamente reduzida na quimera Q2 comparada com a mistura de proteínas naturais.

Essa redução notável na capacidade de ligação a IgE e, então, 30 na capacidade de ativar reações adversas relacionadas à deleção de epitopos B foi acompanhada pela manutenção da capacidade imunogênica. A proteína Q2 mostra um índice de linfoproliferação que é similar àquele indu-

zido pelo extrato natural e à mistura das duas proteínas naturais puras combinadas, como mostrado na Figura 16. Isso mostra que a proteína quimérica Q2 construída com fragmentos de Par j 1 e Par j 2 continham um número menor de epitopos de IgE, porém mantiveram epitopos T suficientes para

5 induzir uma resposta imune protetora.

A invenção será melhor entendida por meio dos seguintes exemplos relacionados aos estágios experimentais na preparação da invenção e demonstração de suas qualidades. Esses exemplos são exemplos meramente ilustrativos e não limitam a invenção.

10 **Exemplo 1: Construção das fusões de Q1, Q2 e Q3**

As proteínas quiméricas foram construídas por amplificação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando, como uma matriz, plasmídeos que contêm as seqüências que codificam Par j 1.0103 e Par j 2.0101 descritas em Gonzalez-Rioja et al., "Expression and purification of the recombinant 15 allergens Par j 1 and Par j 2" XXIII Congreso EAACI, Abstracts Book (2004), 181-182 e ativadores específicos em cada caso. Os ativadores são compostos da zona de hibridização, de vários sítios de seção de endonucleases restritivas diferentes (sublinhados), e de alguns nucleotídeos de ancoragem. A reação de amplificação induzida por PCR possui os seguintes componentes 20 em um volume de reação de 50 μ l: tampão de amplificação x10, 5 μ l; 200 μ M de dNTPs; 100 pmols de cada oligonucleotídeo de ativação: 2,5 unidades de Taq polimerase (Pfx DNA polimerase, Invitrogen); 1 ng de matriz de DNA e água destilada estéril a 50 μ l. A reação de amplificação foi realizada 25 em um termociclador RoboCycler (Stratagene) sob condições específicas que serão descritas em cada caso. O produto de reação foi submetido à ele- 30 troforese em gel de agarose (2%) e a faixa de interesse foi isolada do gel utilizando Geneclean (Bio101), utilizando o método descrito pelo fabricante. Os fragmentos isolados foram digeridos por enzimas de restrição apropriadas e ligados ao vetor pBluescript digerido pelas mesmas enzimas. A mistu- 35 ra de ligação foi usada para transformar as células competentes de *E. coli* DH5 α (obteníveis junto a Invitrogen, Paisley, UK). As colônias resultantes se desenvolveram para isolar seu DNA do plasmídeo, que foi digerido pelas

enzimas apropriadas para liberar o fragmento de interesse. Os clones positivos foram selecionados para o seqüenciamento desses. O seqüenciamento do DNA inserido, o pBluescript, foi realizado pelo método de Sanger [(30) Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580] modificado para uso com dideoxinucleotídeos fluorescentes e amplificação em um termociclador utilizando o PRISM Ready Reaction DiDeoxy Termination Cyclo Sequencing Kit (Perkin Elmer), seguindo as instruções do fabricante.

A) Proteína quimérica Q1

Nesse caso, as seqüências completas de ambas as proteínas (Par j 1 e Par j 2) devem ser fundidas para obter uma proteína que possui a estrutura terciária desestabilizada, porém com todos seus epitopos de IgE seqüenciais completos. Para obter a construção conhecida como Q1, os cDNAs de Par j 1 e Par j 2 clonados no vetor pKS-Bluescript foram usados como matrizes. Para fundir as duas seqüências, é necessário possuir um ligador, nesse caso *Eco*RI-alvo, tanto na terminação C-terminal da seqüência de Par j 1 e na terminação N-terminal de Par j 2, para permitir a ligação subsequente dos fragmentos. O dito alvo foi adicionado ao oligonucleotídeo sintético correspondente (F1R1 e F1F2), e foi incorporado no fragmento amplificado no processo de PCR.

Oligonucleotídeos sintéticos usados:

- Fragmento 1: F1F1, CG GGATCC TGCAAGAACCTGCGG (*Bam*HI) e F1R1, CG GAATTC GGCTTTCCGGTGC^G (*Eco*RI). Condições: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 53°C, 30 s - 72°C, 90 s (5 ciclos); 25 94°C, 30 s - 60°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).

- Fragmento 2: F1F2, CG GAATTC GAGGAGGCTTGC^{GGGA} (*Eco*RI) e F1R2, CG AAGCTT CTAATAGTAACCTCTGA (Hind^{III}). Condições: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 51°C, 30 s - 72°C, 90 s (5 ciclos); 94°C, 30 s - 59°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).

Foram criados dois produtos de PCR correspondentes a Par j 1 e Par j 2, respectivamente. Para o primeiro deles (Par j 1), os oligonucleotídeos sintéticos F1F1 e F1R1 foram usados para as terminações N e C ter-

minal respectivamente, um tamanho de aproximadamente 420 pares de bases (pb) que é obtido. O fragmento amplificado foi clonado no vetor pKS-Bluescript e sua seqüência foi confirmada. Para o segundo fragmento correspondente a Par j 2, o mesmo procedimento foi empregado utilizando os 5 oligonucleotídeos F1F2 e F1R2 para as terminações N e C, respectivamente. Nesse caso, um fragmento de aproximadamente 300 pb foi obtido, esse foi clonado no vetor pKS-Bluescript e sua seqüência foi confirmada. Esse segundo fragmento foi ligado ao primeiro pela ligação através do alvo *EcoRI*, Par j 1 permanece na terminação N-terminal e Par j 2 na terminação C-terminal, e o fragmento resultante foi subseqüentemente subclonado no vetor de expressão comercial pQE-32 (Qiagen), que contém uma seqüência extra de 13 aminoácidos na terminação N-terminal, correspondente à cauda de afinidade (Figura 2). A dita seqüência é codificada por um polipeptídeo que possui 256 aminoácidos e um peso molecular aparente de 28070 Da.

15 **B) Proteína quimérica Q2**

Quando obtém-se essa quimera, o fragmento de ambas as proteínas foi ligado, porém sem incluir nenhum dos epitopos IgE seqüenciais descritos [(18) Asturias, J.A, Gómez-Bayón, N., Eseverri, J. L., and Martinez, A. (2003). Par j 1 e Par j 2, os alérgenos principais de pólen de *Parietaria judaica*, possuem epitopos E de imunoglobulina similares. Clinical and Experimental Allergy 33, 518-524]. Alguns oligonucleotídeos sintéticos que compreendem os seguintes fragmentos foram designados: Par j 1 (fragmentos do resíduo 1 a 28 e 53 a 139) e Par j 2 (fragmentos do resíduo 1 a 28 e 53 a 103) (Figuras 3 e 4). Parte da seqüência que contém os epitopos de IgE foi 20 25 eliminada dessa maneira.

Quatro fragmentos (dois de cada alérgeno) foram amplificados para essa construção e o cDNA de Par j 1 e Par j 2 clonado no vetor pKS Bluescript foi usado como a matriz. O mecanismo de construção da nova proteína é o uso de enzimas de restrição (*PstI*, *EcoRI* e *EcoRV* nesse caso) 30 para a ligação seqüencial dos fragmentos amplificados diferentes.

Oligonucleotídeos sintéticos usados:

- Fragmento 1: F1F1, CG GGATCC TGCAAGAACCTGCGG

(*Bam*HI) e F2R1, CG CTGCAG CCCCTTGACGGCTCTT (*Pst*I). Condições min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 54°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).

- Fragmento 2: F2F2, CG CTGCAG ATCCAGACCGCCATGAA
- 5 (PstI) e F2R2, CG GAATTC GGCTTTCCGGTGCAGGG (*Eco*RI).
 - Fragmento 3: F2F3, CG GAATTC GAGGAGGGCTTGCAGGGAA (*Eco*RI) e F2R3, CG GATATC CTCCTTCGACGGCTCCTT (*Eco*RV) .
 - Fragmento 4: F2F4, CG GATATC ATAGTGCACGCCACGAA (*Eco*RV) e F1R2, CG AAGCTT CTAATAGTAACCTCTGA (*Hind*III). As condições dos três fragmentos são: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 54°C, 30 s - 72°C, 90 s (5 ciclos); 94°C, 30 s - 62°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).

Para o primeiro desses, correspondente a Par j 1 (fragmento 1), os oligonucleotídeos sintéticos F1F1 e F2R1 foram usados para as terminações N e C, respectivamente, um tamanho de aproximadamente 90 pares de base que são obtidos e clonados no vetor pKS-Bluescript. Para o segundo fragmento correspondente a Par j 1, o mesmo procedimento foi realizado utilizando os oligonucleotídeos F2F2 e F2R2 para as terminações N e C terminal, respectivamente. Nesse caso, um fragmento de aproximadamente 260 pb foi obtido e clonado no vetor pKS-Bluescript. Esse último fragmento foi ligado ao primeiro pela ligação através do ligador do alvo realizada por *Pst*I e sua seqüência foi confirmada.

Com relação aos dois fragmentos amplificados da seqüência de Par j 2 (fragmentos 3 e 4), o procedimento descrito para fragmentos 1 e 2 foi seguido. Os oligonucleotídeos F2F3/F2R3 e F2F4/F1R4 para as terminações N e C terminal, respectivamente foram usados para a amplificação do mesmo, sendo que o tamanho dos produtos de PCR são aproximadamente 90 e 150 pb para fragmentos 3 e 4. O fragmento 4 foi ligado ao fragmento 3 por ligação através do ligador do alvo conduzido por *Eco*RV e sua seqüência foi confirmada.

Em uma última etapa, os dois novos fragmentos criados (um para cada alérgeno) foram ligados por ligação através do ligador do alvo

conduzido por EcoRI, Par j 1 permanece na terminação N-terminal e Par j 2 na terminação C-terminal. O dito fragmento foi subsequentemente subclonado no vetor de expressão comercial pQE-32, que contém uma seqüência extra de 13 aminoácidos na terminação N-terminal correspondente à cauda de afinidade (Figura 5). A dita seqüência codificada por um polipeptídeo que possui 212 aminoácidos e um peso molecular aparente de 23336 Da.

5

C) Proteína quimérica Q3

Essa última construção é virtualmente idêntica a Q2 exceto que nesse caso e em uma tentativa de eliminar qualquer possível existência de 10 epitopos de IgE, outra seqüência adicional de 8 aminoácidos presente nas seqüências de Par j 1 (resíduo 71 a 80) e Par j 2 (resíduo 72 a 81) (Figuras 6 e 7) foi eliminada.

Oligonucleotídeos sintéticos usados:

- Fragmento 1: F1F1, CG GGATCC TGCAAGAACCTGCGG 15 (BamHI) e F3R1, CG AGATCT GACCTCGCTGACGAG (*Bg*III) .
- Fragmento 2: F3F2, CG AGATCT AGCAAGCTCCGCC (B-*g*III) e F3R2, CG GGTACC GGGGACCTCGGCGAC (*Kpn*I). As condições dos 2 fragmentos são: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 54°C, 30 s - 72°C, 90 s (5 ciclos); 94°C, 30 s - 63°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min 20 (1 ciclo).
- Fragmento 3: F3F3, CG GGTACC CTCCCGCCCCATCACC (*Kpn*I) e F3R3, TTTAAAAAGGCCGTAATATCC. Condições: 94°C, 4 min (1 ciclo); 94°C, 30 s - 56°C, 30 s - 72°C, 90 s (35 ciclos); 72°C, 10 min (1 ciclo).

Nesse caso, a construção Q2-pQE-32 foi usada como a matriz e 25 tamanhos de aproximadamente 150, 370 e 290 pb foram obtidos para os fragmentos 1, 2 e 3 respectivamente. Os oligonucleotídeos usados foram F3F1 e F3R1 para o fragmento 1, F3F2 e F3R2 para o fragmento 2, e F3F3 e F3R3 para o fragmento 3. Os processos de ligação seqüencial dos fragmentos descritos nos casos anteriores foram repetidos. As novas enzimas 30 de restrição usadas foram *Bg*III e *Kpn*I. No terceiro e último fragmento e devido a seu tamanho pequeno, 66 pb, decidiu-se amplificar parte da seqüência do vetor PQE-32-Q2 para obter um fragmento de maior tamanho de mo-

do a ser capaz de trabalhar com mais comodidade no processo de purificação subsequente. Em cada etapa, o fragmento é obtido por PCR clonado no vetor pKS-Bluescript e sua seqüência foi confirmada. Uma mutação espontânea no primeiro fragmento correspondente ao primeiro aminoácido glutamina (Q) foi produzida por prolina (P).

Por fim, o fragmento resultante é subclonado no vetor de expressão pQE-32, que contém uma seqüência extra de 13 aminoácidos na terminação N-terminal correspondente à cauda de afinidade (figura 8). A dita seqüência é codificada por um polipeptídeo que possui 200 aminoácidos e 10 um peso molecular aparente de 21938 Da.

Exemplo 2: Expressão e purificação das proteínas quiméricas Q1, Q2, e Q3

Partindo-se de uma colônia isolada de uma lâmina de LB (suplementada com 100 e 25 µg/ml de ampicilina e canamicina respectivamente), um pré-inóculo de 50 ml do mesmo meio foi produzido e incubado durante a noite a 37°C com agitação (260 rpm). Um litro do mesmo meio foi inoculado com o dito pré-inóculo, partindo de uma densidade óptica (600 nm) de 0,2. A mistura foi incubada a 37°C com agitação durante 1 hora e 30 minutos, após isso a indução com IPTG (1 mM de concentração final) foi realizada durante 3 h sob as mesmas condições de incubação.

20 No caso de Q2, as células foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C e foram ressuspensas em 50 ml de tampão de lise (fosfato 20 mM, pH 7,4; 50 mM de imidazol; 0,5 M de NaCl). A matéria ressuspensa foi tratada com lisozima (concentração final de 0,1 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C com agitação. A sonicação (5 pulsos de 20 s) foi então 25 realizada e a mistura foi centrifugada a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado sobre 0,45 µm (Millex HV, Millipore) e foi aplicado (2,5 ml/min) a 5 ml de coluna Hi-Trap Chelating HP (GE-Healthcare) adaptada ao sistema ang ÅKTA Prime (GE-Healthcare). Essa coluna foi quelada com níquel e foi anteriormente balanceada com 10 volumes do tampão de 30 lise. Uma vez que a coluna foi lavada com 15 volumes de tampão de lise, a eluição da proteína ligada à coluna foi realizada utilizando tampão de eluição (fosfato 20 mM pH 7,4; 0,5 M de imidazol) em 100%. O eluente foi passado

através de 5 ml de coluna Hi-Trap Desalting (GE-Healthcare) para remover os sais e alterar a amostra de 20 mM pH 7 tampão fosfato. A proteína foi mantida a -40°C.

Uma etapa de purificação adicional foi requerida nos casos de 5 Q1 e Q3. Após a indução dessas, as células foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C e foram ressuspensas em 50 ml de tampão de lise suplementado com 8 M de uréia, o procedimento que está descrito no parágrafo anterior é adotado. Em uma segunda etapa de purificação, o eluente obtido foi aplicado (1 ml/min) a uma coluna Hi-Load 16/60 Superdex-10 200 (GE-Healthcare) anteriormente balanceada com PBS; a eluição da proteína foi realizada no tampão descrito no parágrafo anterior. A proteína foi mantida a -40°C.

A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE). O método descrito por Laemmli foi basicamente seguido [(31) 15 Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277, 680-685], utilizando um aparelho de eletroforese MINI-PROTEAN (Bio-Rad). Os géis, que medem 10 x 10 cm e possuem uma concentração de poliacrilamida de 12,5% foram submetidos a uma corrente de 200 volts durante 45 minutos em tampão tris-glicina. As 20 proteínas usadas como referência são aquelas do kit Bio-Rad para baixos pesos moleculares. O cálculo dos pesos moleculares e análise densitométrica dos géis foram realizados utilizando um analisador de imagens (Diversity, BioRad).

A proteína híbrida Q1 foi expressa como proteína de fusão marcada por His de 32 kDa (Figura 9) com um rendimento final de 2 mg/L de cultura bacteriana. As proteínas Q2 e Q3 foram expressas como proteínas de fusão marcadas por His de 28 kDa com um rendimento final de 5 e 7 mg/L de cultura, respectivamente (Figura 9).

Exemplo 3: Análise de dicroísmo circular das moléculas híbridas purificadas

30 Espectros de CD Far-UV (190 a 250 nm) em pH 7,0 e 20°C foram registrados com um espectropolarímetro Jasco J-810 equipado com um controlador de temperatura Jasco PTC-423S em cadinhos com termostato a

20°C. A concentração de proteína é 0,035 mg/ml em 20 mM de tampão fosfato de sódio em um cadiño de 0,2 cm e quarenta "scans" foram acumulados. Todos os espectros foram subtraídos pela base apropriada e convertidos em elipticidade média de resíduo.

5 Os elementos de estrutura secundária foram analisados por espectroscopia de CD aplicando uma mistura de alérgenos naturais da Parietaria (Par j 1 e Par j 2) e as proteínas híbridas (Figura 10). Os espectros das proteínas híbridas eram quase idênticos entre si, porém totalmente diferentes dos espectros de CD de alérgenos naturais. Os espectros de NPA apresentaram um mínimo a 208 nm, um lado bem-definido a 222 nm e um máximo a 190 nm, enquanto os espectros das proteínas híbridas foram deslocados frente à conformação em espiral aleatória que atinge um estado quase completamente desdobrado.

10

15 Exemplo 4: Testes imunológicos para demonstrar a baixa reatividade de fixação a IgE de proteínas químéricas frente a uma mistura de soros de pacientes alérgicos a *P. judaica*

A) Imunodetecção

Uma primeira avaliação da atividade de ligação a IgE das fusões 1, 2 e 3 foi realizada pelo método de imunotransferência que emprega uma 20 mistura de soros de pacientes alérgicos a *P. judaica*. Uma vez que os extractos de proteína e as proteínas purificadas foram aplicados aos géis de poliacrilamida, a eletrotransferência foi realizada pelo método de Towbin et al [(32) Towbin, H., Staehelin, I., and Gordon, J. (1979). A transferência eletroforética de proteínas de géis de poliacrilamida para folhas de nitrocelulose: 25 Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354]. Com essa finalidade, as proteínas separadas por SDS-PAGE foram eletricamente transfixadas em membranas PVDF Hybond-P (GE-Healthcare). Uma vez que as membranas foram bloqueadas durante 1 h em temperatura ambiente, essas foram incubadas durante a noite a 4°C com um 30 anticorpo primário e, após as várias lavagens com o mesmo tampão de lavagem, as membranas foram incubadas durante 1 h em temperatura ambiente com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase. As faixas fo-

ram detectadas pelo método quimiluminescente ECL (GE-Healthcare) como descrito pelo fabricante ao expor a membrana a uma película (Hyperfilm. ECL, GE-Healthcare).

Os testes de imunodetecção demonstraram uma capacidade de 5 ligação a IgE diferente entre as três fusões; o reconhecimento de anticorpos de IgE, consequentemente, ocorreu apenas no caso de Q1 (Figura 11). No caso de Q2, a identificação caiu muito nitidamente, enquanto no caso de Q3, o reconhecimento demonstrado foi zero.

B) ELISA Direto

10 A reatividade de IgE às três fusões foi analisada pelo método ELISA utilizando soros individuais de pacientes alérgicos a *P. judaica*. As placas de poliestireno (Greiner) foram incubadas durante a noite em temperatura ambiente com 1 µg de extrato de proteína de *P. judaica* ou 0,1 µg de proteína pura por copo em tampão PBS (10 mM de fosfato pH 7,2; 137 mM 15 de NaCl 2,7 mM de KCl). Essas foram bloqueadas com 200 µl/copo de PBS suplementado com 1% de BSA-0,05% de Tween 20 e mantido a 37°C durante 1 h. 100 µl/copo de soro (diluição 1/10) de pacientes alérgicos foram adicionados e incubados a 37°C durante 90 min. Após 3 lavagens com 200 µl/copo de PBS-T (PBS + 0,05 % de Tween 20), 100 µl/copo de um anti-soro 20 frente às imunoglobulinas IgE humanas (Dako) conjugados com peroxidase foram então adicionados (diluição 1:1000) e foram incubados durante 90 min a 37°C. Após três novas lavagens com PBS-T, 200 µl/copo de uma solução de o-fenilenodiamina (Sigma-Fast Tablet Sets, Sigma) preparados de acordo com as instruções do fabricante foram adicionados e as placas foram manti- 25 das no escuro durante 30 minutos. A reação foi interrompida com 50 µl/copo de 3 M de H₂SO₄ e a absorbância foi medida a 492 nm em um leitor de placa de ELISA Easy Reader EAR-400 AT (SLT-Lab Instruments).

30 A reatividade a IgE foi demonstrada apenas no caso de Q1, enquanto tanto Q2 como Q3 não demonstraram virtualmente nenhum reconhe- cimento dos anticorpos de IgE (Figura 12).

C) Inibição de ELISA

Para os testes de inibição de ELISA, a mistura de soros de paci-

entes alérgicos a *P. judaica* foi pré-incubada durante a noite a 4°C com uma determinada concentração de proteína de inibição (de 1 a 1000 ng/ml). O restante do procedimento seguido é igual àquele descrito para o teste de ELISA direto.

5 Em testes de inibição de ELISA com uma mistura de soros de pacientes alérgicos a *P. judaica*, Q1 demonstrou um grau de inibição de cerca de 50% da atividade de ligação a IgE do pólen de *P. judaica*, um pouco inferior àquela de nPar j 1-Par j 2 (92%), sendo necessário adicionar 500 vezes mais proteína (Figura 13). As quimeras Q2 e Q3 atingiram um grau 10 máximo de inibição de cerca de 60%, porém isso requereu uma concentração de proteína 10.000 vezes maior do que aquela requerida por nPar j 1-Par j 2 para atingir o mesmo grau de inibição, isso significa que essas quimeras reduziram sua alergenicidade em cerca de 99,99%.

15 Exemplo 5: Experimentos *in vivo* para demonstrar a baixa reatividade cutânea das proteínas quiméricas Q1, Q2, e Q3

Os testes de reação cutânea *in vivo* (por puntura) foram realizados para avaliar a natureza hipoalergênica das quimeras 1, 2 e 3 com a ajuda da determinação da molécula hipoalergênica candidata de modo a ser capaz de desenvolver uma imunoterapia satisfatória contra a alergia ao pólen da *P. judaica*.

20 Os testes cutâneos foram realizados utilizando extrato de *P. judaica*, nPar j 1-Par j 2, rPar j 1 e rPar j 2 expresso em *E. coli*, e as quimeras 1, 2 e 3. As proteínas purificadas foram diluídas em 0,5% de solução salina fenolada e 50% de solução salina fisiológica glicerinada. As concentrações 25 usadas foram 0,5, 5, e 50 µg/ml no caso de Par j natural, Par j 2, Q1; as concentrações foram 5, 50 e 250 µg/ml no caso de Q2 ou Q3. 0,9% de NaCl e hidrocloreto de histamina (10 mg/ml) foram usados como controles negativos e positivos respectivamente.

30 No experimento uma gota de cada alérgeno que será testado foi depositada na zona volar do antebraço, e a punção foi então feita através da gota com uma lanceta. Cada teste foi realizado em duplicata e em seqüências opostas de concentração crescente e decrescente. Após um período de

15 min, os adesivos foram contornados com uma caneta marcadora preta de ponta fina. As tiras de esparadrapo hipoalergênico foram colocadas nos adesivos e foram comprimidas suavemente para passar a tinta que marca a tira; essa foi transferida para as folhas de adesivo. As áreas do adesivo foram medidas ao varrer os registros utilizando um painel de indicação Summasketch e um programa de desenho auxiliado por computador (Autocad v.11).

Os resultados obtidos foram interpretados ao realizar uma análise estatística ilustrando os resultados em diagramas de bloco e utilizando o teste Wilcoxon para as variáveis relacionadas (Figura 14). Essas ilustrações mostram que as distribuições dos valores correspondentes às reações cutâneas (medidos em mm de área de adesivo) se diferem significativamente no caso das três quimeras ($P<0,001$) com relação ao extrato (média 65,25 mm² - faixa de confiança 95%: 54,98-75,53) e nPar j 1-Par j 2 (média 106,80 mm² - faixa de confiança 95%: 91,90-121,70). Os valores das quimeras 2 e 3 são virtualmente zero: Q2 (média 0,95 mm² - faixa de confiança 95%: 0-2,89) e Q3 (média 0,15 mm² - faixa de confiança 95%: 0-0,47).

Exemplo 6: Experimentos para demonstrar a baixa capacidade de ligação a IgE das proteínas quiméricas Q1, Q2 e Q3

Novamente, como um suplemento aos testes *in vivo*, testes *in vitro* foram realizados ao determinar IgE específica, utilizando o método de EAST direto.

A IgE específica foi determinada de acordo com Ceska et al . [(33) Ceska, M. and Lundkvist, U. (1972). Um método de radioimunoensaio novo e simples para a determinação de IgE. *Immunochemistry* 9, 1021-1030], ao acoplar as proteínas naturais e recombinantes (50 µg/ml) bem como o extrato de *P. judaica* (2 mg/ml) a discos ativados com brometo de cianogênio. 50 µl de soro dos pacientes foram subseqüentemente adicionados e incubados durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a lavagem os discos foram incubados durante 30 min a 37°C com 50 µl de anticorpo IgE anti-humano ligados à fosfatase alcalina, e a quantificação foi realizada seguindo as instruções fornecidas com o kit Hytec EIA específico a IgE pelo

fabricante (Hycor Biomedical Inc.).

Os resultados obtidos simplesmente reafirmam aqueles obtidos *in vivo*; das três quimeras, Q1 manteve sua capacidade imunogênica com ralação a nPar j 1-Par j 2 enquanto Q2 e Q3 apresentaram uma redução 5 bastante considerável na dita capacidade ($P<0,001$) (Figura 15).

Exemplo 7: Experimentos de linfoproliferação induzida para demonstrar a capacidade imunogênica das proteínas quiméricas Q1, Q2 e Q3

Uma exigência essencial para o uso de uma molécula hipoalergênica em imunoterapia é a manutenção de sua antigenicidade (epitopos T).

10 Portanto, para verificar se, além de não se ligar a anticorpos IgE, essas proteínas permaneceram antigênicas, um teste de linfoproliferação foi realizado em células sanguíneas mononucleares periféricas (CMSP) estimuladas pelas várias proteínas usadas nos experimentos. Os testes foram realizados por um método colorimétrico baseado na digestão do sal tetrazol WST-I pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis para originar o composto de formazana que é medido por colorimetria.

As CMSPs de 13 pacientes alérgicos a *P. judaica* foram isoladas por centrifugação em um gradiente de densidade utilizando uma solução de separação de linfócitos (Lymphoprep, Nycomed). As CMSPs foram então 20 ressuspensas em 1×10^6 células viáveis/ml em meio de cultura (meio isento de soro AIM V, Gibco) e sua viabilidade foi testada com 0,25% de azul de tripan em PBS (Sigma Chemical Co.). As CMSPs preparadas com viabilidade maior que 90% foram imediatamente usadas para os testes de proliferação *in vitro* como descrito pelo fabricante (agente de proliferação celular 25 WST-I, Roche Diagnostics). Essas foram depositadas em microplacas de fundo plano (Nunclon, NUNC), 2×10^5 CMSP em um volume final de meio de 200 μ l e as medidas foram tiradas em triplicata a 37°C e atmosfera umidificada 5% de CO₂ com o extrato de *P. judaica* e as várias proteínas purificadas a uma concentração final de 0,0005-0,005-0,05-0,5-5 μ g/ml. Os controles em triplicata de culturas não-estimuladas foram incluídos em todos os 30 casos. Após 3 dias, 20 μ l do agente de proliferação celular WST-I foram adicionados a todos os copos, e incubados durante 4 h. A formazana produzida

pelas células metabolicamente ativas foi quantificada por absorvência a 450 nm. As proteínas recombinantes usadas no teste foram as três quimeras e rPar j 1 e rPar j 2 expressas em *E. coli*.

Em uma primeira etapa, a proteína imunuogênica foi varrida para 5 determinar a concentração ótima para desenvolvimento subsequente do teste. Em todos os casos foi verificado que a concentração de proteína que mostra proliferação máxima (IE %) era 0,5 µg/ml (Figura 16).

Os resultados de proliferação com os 13 pacientes alérgicos a *P. judaica* foram determinados por análise estatística de diagrama de bloco e 10 testes não-paramétricos para duas amostras correlacionadas. A análise estatística mostrou que o extrato de *P. judaica* usado como um controle tem uma capacidade de estimulação antigênica que não se difere muito daquela de nPar j 1-Par j 2 ($P= 0,142$), e que Q1 e Q2 demonstraram uma distribuição de valores que não eram significativamente diferentes daqueles do extrato ($P= 0,152$ e $P= 0,294$ respectivamente) e nPar j 1-Par j 2 ($P= 0,484$ e 15 $P= 0,182$ respectivamente) (Figura 17). Q3, por outro lado, raramente apresentou capacidade de estimulação com relação ao extrato ($P= 0,002$) e nPar j 1-Par j 2 ($P= 0,004$). Por outro lado, a maior potência antigênica de rPar j 2 frente a rPar j 1 contra o extrato ($P= 0,142$ e $P= 0,003$ respectivamente) e 20 nPar j 1-Par j 2 ($P= 0,041$ e $P= 0,002$ respectivamente) deveria ser apontada.

Os resultados obtidos mostram que Q2 ainda manteve a dita propriedade, enquanto Q3 a perdeu completamente. Pode-se concluir a partir disso que o processo foi determinado para obter moléculas hipoalergênicas 25 diferentes para tratar a alergia a *P. judaica*, e que Q2 poderia ser a molécula hipoalergênica candidata para desenvolver uma imunoterapia satisfatória contra a alergia a *P. judaica*.

MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

A presente invenção refere-se ao uso das quimeras hipoalergênicas 30 ou peptídeos sintéticos descritos derivados dessas para tratamentos de hipossensibilização em mamíferos. O método de hipossensibilização envolve a administração repetida pelas vias parenterais (subcutânea, intrave-

nosa ou intramuscular), orais, sublinguais, nasais ou retais do alérgeno em questão. Esses (poli)peptídeos podem ser administrados separados ou em combinação com outros diluentes e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, de acordo com a legislação vigente e o procedimento galênico para

5 uso.

REFERÊNCIAS

1. Miyamoto, T. (1992). Increased prevalence of pollen allergy in Japan. In Advances in Allergology and Clinical Immunology. P. Godard, J. Bousquet, and F. B. Michel, eds . (Cornforth, UK: The Parthenon Publishing Group) , pp. 343-347.
2. Akdis, C.A. Blaser, K. (2000). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 55, 518-524.
3. Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., and Blaser, K. (2001). Mechanism of IL-10 induced cell inactivation in allergic inflammation and normal 15 response to allergens. *Int. Arch Allergy Immunol.* 124, 180-182.
4. Moverate, R. (2003). Immunological mechanisms of specific immunotherapy with pollen vaccines: implications for diagnostics and the development of improved vaccination strategies. *Expert Rev. Vacc.* 2, 85-97.
5. Wachholz, P.A., Soni, N. K., Till, S., and Durham, S. R. (2003). 20 Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112; 915-922.
6. Valenta, R. and Linhart, B. (2005) . Molecular design of allergy vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 1-10.
7. Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, 25 M. T., Valent, P., Reisinger, J., Pelzmann, M., Hayek, B., Kronqvist, M., Gafvelin, G., Grönlund, H., Purohit, A., Suck, R., Fiebig, H., Cromwell, O., Pauli, G., van Hage-Hamsten, M., and Valenta, R. (2004). Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14677-14682.
8. Schmid-Grendelmeier, P., Karamloo, F., Müller, U., Housley-Marcovic, Z., Soldatova, L., Zumkehr, J., Kemeny, D. M., Kündig, T., Reimers, A., von Beust, B. R., Salagianni, M., Akdis, M., Kussebi, F., Spangfort, 30

- M. D., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2005). Prevention of allergy by a recombinant multi-allergen vaccine with reduced IgE binding and preserved T cell epitopes. *Eur. J. Immunol.* 35, 3268-3276.
9. Allam, J.P., Novak, N., Fuchs, C., Asen, S., Berge, S., Appel, T., et al. (2003) Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive Fc ϵ RI expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 141-8.
10. von Bubnoff, D., Matz, H., Frahnert, C., Rao, M. L., Hanau, D., de la Salle, H., Bieber, T. (2003) Fc ϵ RI induces the triptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J. Immunol.* 169, 1810-1816.
11. Batard, T., Didierlaurent, A., Chabre, H., Mothes, N., Bussières, L., Bohle, B., et al. (2005) Characterization of wild-type recombinant Bet v 1a as a candidate vaccine against birch pollen allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 136, 239-249.
12. Jutel, M., Jaeger, L., Suck, R., Meyer, H., Fiebig, H., Cromwell, O. (2005) Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 608-13.
13. Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, M. T., Valent, P., et al. (2004) Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14677-82.
14. Cromwell, O., Fiebig, H., Suck, R., Kahlert, H., Nandy, A., Kettner, J., et al. (2006) Strategies for recombinant allergen vaccines and fruitful results from first clinical studies. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 26, 261-81.
15. Colombo, P., Duro, G., Costa, M.A., Izzo, V., Mirisola, M., Locorotondo, G., Cocchiara, R., and Geraci, D. (1998). An update on allergen. *Parietaria pollen allergen*. *Allergy* 53, 917-921.
- 30 16. Colombo, P., Bonura, A., Costa, M., Izzo, V., Passantino, R., Locorotondo, G., Amoroso, S., and Gerasi, D. (2003). The allergens of Parietaria. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 130, 173-179.

17. Carreira, J. and Polo, F. (1995). The allergens of *Olea europaea* and *Parietaria* spp. and their relevance in the Mediterranean Area. *Allergy Clin. Immunol. News* 7, 79-84.
18. Ayuso, R., Carreira, J., Lombardero, M., Duffort, O., Peris, A.,
5 Basomba, A., and Polo, F. (1993). Isolation by mAb based affinity chromatography of two *Par j* isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergenic properties. *Mol. Immunol.* 30, 1347-1354.
19. Polo, F., Ayuso, R., and Carreira, J. (1990). HPLC purification of the main allergen of *Parietaria judaica* pollen. *Mol. Immunol.* 27, 151-
10 157.
20. Polo, F., Ayuso, R., and Carreira, J. (1991). Studies on the relationship between structure and IgE-binding ability of *Parietaria judaica* allergen I. *Mol. Immunol.* 28, 169-175.
21. Duro, G., Colombo, P., Costa, M.A., Izzo, V., Porcasi, R.,
15 DiFiore, R., Locorotondo, G., Mirisola, M. G., Cocchiara, R., and Geraci, D. (1996). cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of *Par j 2.0101*, a new major alérgeno of the *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Lett.* 399, 295-298.
22. Costa, M.A., Colombo, P., Izzo, V., Kennedy, H., Venturella,
20 S., Cocchiara, R., Mistrello, G., Falagiani, P., and Geraci, D. (1994). cDNA cloning expression and primary structure of *Par j I*, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Lett.* 341, 182-186.
23. Amoresano, A., Pucci, P., Duro, G., Colombo, P., Costa,
25 M.A., Izzo, V., Lambda, D., and Geraci, D. (2003). Assignment of disulphide bridges in *Par j 2.0101*, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *Biol. Chem.* 384, 1165-1172.
24. Asturias, J.A., Gómez-Bayón, N., Eseverri, J.L., and Martínez, A. (2003). *Par j 1* and *Par j 2*, the major allergens from *Parietaria judaica* pollen, have similar immunoglobulin E epitopes. *Clinical and Experimental Allergy* 33, 518-524.
25. van Ree, R. (2002). Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 910-913.

26. Beezhold, D.H., Hickey, V. L., Kostyal, D.A., and et al. (2003). Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. *Ann Allergy Asthma Immunol* 439-445.
27. Díaz-Perales, A., Lombardero, M., Sanchez-Monge, R., and et al. (2000). Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 1403-1410.
28. Tejera, M. L., Villalba, M., Batanero, E., and Rodriguez, R. (1999). Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 797-802.
29. Rodriguez, R., Villalba, M., Batanero, E., and et al . (2002) . Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* 6-16.
30. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
31. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277, 680-685.
32. Towbin, H., Staehelin, I., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 16, 4350-4354.
33. Ceska, M. and Lundkvist, U. (1972). A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* 9, 1021-1030.

Listagem de Seqüênci

<110> Bial Industria Farmacéutica, S.A.
 <120> PROTEÍNAS QUIMÉRICAS HIPOALERGÊNICAS PERTENCENTES À FAMÍLIA DE
 TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA DE PARIETARIA JUDAICA PARA USO NO TRATA-
 5 MENTO DE ALERGIAS
 <130> Proteínas Quiméricas
 <160> 6
 <170> PatentIn versão 3.3
 <210> 1
 10 <211> 768
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Q1
 15 <400> 1
 atgagaggat ctcaccatca ccatcaccat gggatcctgc aagaaacctg cgggactatg 60
 gtgagagcgc ttagccgtg cctgccgttc gtgcagggga aagagaaaga gccgtcaaag 120
 gggtgctgca gcggcgccaa aagattggac ggggagacga agacggggcc gcagagggtg 180
 cacgcttgtg agtgcatcca gaccgccatg aagacttatt ccgacatcga cggaaactc 240
 20 gtcagcgagg tccccaaagca ctgcggcatc gttgacagca agctccgccc cattgacgtc 300
 aacatggact gcaagacact tggagtggtt cctcggcaac cccaaacttcc agtctctctc 360
 cgtcatggtc ccgtcacggg cccaaagtat cccgcccaca aagcacggtt ggagagaccc 420
 cagatttagag ttccggccccc cgcaccggaa aaagccgaat tcgaggaggc ttgcggaaa 480
 gtggtgcagg atataatgcc gtgcctgcat ttcgtgaagg gggaggagaa ggagccgtcg 540
 25 aaggagtgct gcagcggcac gaagaagctg agcgaggagg tgaagacgac ggagcagaag 600
 agggaggcct gcaagtgcac agtgcgcgcc acgaaggca tctccggat caaaaatgaa 660
 cttgtcgccg aggtccccaa gaagtgcacat attaagacca ctctccgccc catcaccgcc 720
 gacttcgact gctccaagat ccaaagtact atttcagag gttactat 768
 <210> 2
 30 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Proteína Q1

<400> 2

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ile Leu Gln Glu Thr

5 1 5 10 15

Cys Gly Thr Met Val Arg Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro Phe Val Gln

20 25 30

Gly Lys Glu Lys Glu Pro Ser Lys Gly Cys Cys Ser Gly Ala Lys Arg

35 40 45

10 Leu Asp Gly Glu Thr Lys Thr Gly Pro Gln Arg Val His Ala Cys Glu

50 55 60

Cys Ile Gln Thr Ala Met Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp Gly Lys Leu

65 70 75 80

Val Ser Glu Val Pro Lys His Cys Gly Ile Val Asp Ser Lys Leu Pro

15 85 90 95

Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val Val Pro Arg

100 105 110

Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro Val Thr Gly Pro

115 120 125

20 Ser Asp Pro Ala His Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln Ile Arg Val

130 135 140

Pro Pro Pro Ala Pro Glu Lys Ala Glu Phe Glu Glu Ala Cys Gly Lys

145 150 155 160

Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu His Phe Val Lys Gly Glu Glu

25 165 170 175

Lys Glu Pro Ser Lys Glu Cys Cys Ser Gly Thr Lys Lys Leu Ser Glu

180 185 190

Glu Val Lys Thr Thr Glu Gln Lys Arg Glu Ala Cys Lys Cys Ile Val

195 200 205

30 Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys Asn Glu Leu Val Ala Glu

210 215 220

Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr Leu Pro Pro Ile Thr Ala

	225	230	235	240			
	Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr						
	245	250	255				
	<210>	3					
5	<211>	636					
	<212>	DNA					
	<213>	Artificial					
	<220>						
	<223>	Q2					
10	<400>	3					
	atgagaggat	ctcaccatca	ccatcaccat	gggatcctgc	aagaaacctg	cgggactatg	60
	gtgagagcgc	tgatgccgtg	cctgccgttc	gtgcagggga	aagagaaaaga	gccgtcaaag	120
	gggctgcaga	tccagaccgc	catgaagact	tattccgaca	tcgacggaa	actcgtcagc	180
	gaggtccccca	agcactgcgg	catcgttgac	agcaagctcc	cggccattga	cgtcaacatg	240
15	gactgcaaga	cacttggagt	ggttcctcgg	caaccccaac	ttccagtctc	tctccgtcat	300
	ggtcccgta	cggggccaaag	tgatcccgcc	cacaaagcac	ggttggagag	accccgatt	360
	agagttccgc	cccccgaccc	ggaaaaagcc	gaattcgagg	aggcttgcgg	gaaagtggtg	420
	caggatataa	tgccgtgcct	gcatttcgtg	aagggggagg	agaaggagcc	gtcgaaggag	480
	gatatcatag	tgcgcgccac	gaagggcatc	tccggtatca	aaaatgaact	tgtcgccgag	540
20	gtccccaaaga	agtgcgatata	taagaccact	ctcccgccca	tcaccgcccga	cttcgactgc	600
	tccaagatcc	aaagtactat	tttcagaggt	tactat			636
	<210>	4					
	<211>	212					
	<212>	PRT					
25	<213>	Artificial					
	<220>						
	<223>	Proteína Q2					
	<400>	4					
	Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ile Leu Gln Glu Thr						
30	1	5	10	15			
	Cys Gly Thr Met Val Arg Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro Phe Val Gln						
	20	25	30				

Gly Lys Glu Lys Glu Pro Ser Lys Gly Leu Gln Ile Gln Thr Ala Met
 35 40 45

Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Pro Lys
 50 55 60

5 His Cys Gly Ile Val Asp Ser Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met
 65 70 75 80

Asp Cys Lys Thr Leu Gly Val Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val
 85 90 95

Ser Leu Arg His Gly Pro Val Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Lys
10 100 105 110

Ala Arg Leu Glu Arg Pro Gln Ile Arg Val Pro Pro Pro Ala Pro Glu
 115 120 125

Lys Ala Glu Phe Glu Glu Ala Cys Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met
 130 135 140

15 Pro Cys Leu His Phe Val Lys Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu
 145 150 155 160

Asp Ile Ile Val Arg Ala Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys Asn Glu
 165 170 175

Leu Val Ala Glu Val Pro Lys Lys Cys Asp Ile Lys Thr Thr Leu Pro
20 180 185 190

Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln Ser Thr Ile Phe
 195 200 205

Arg Gly Tyr Tyr
 210

25 <210> 5
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>

30 <223> Q3
 <400> 5
 atgagaggat ctcaccatca ccatcaccat gggatcctgc cagaaacctg cgggactatg 60

gtgagagcgc	tatgtccgtg	cctgcccgttc	gtgcaggggaa	aagagaaaaga	gcccgtcaaag	120	
gggctgcaga	tccagaccgc	catgaagact	tattccgaca	tcgacgggaa	actcgtcagc	180	
gaggtcagat	ctagcaagct	cccgcccatt	gacgtcaaca	tggactgcaa	gacacttgga	240	
gtggttcctc	ggcaacccca	acttccagtc	tctctccgtc	atggtcccgt	cacggggcca	300	
5	agtgtatccc	cccacaaagc	acggttggag	agacccaga	ttagagttcc	gccccccgca	360
	ccggaaaaag	ccgaattcga	ggaggcgtgc	gggaaagtgg	tgcaggatat	aatgccgtgc	420
	ctgcatttcg	tgaaggggga	ggagaaggag	ccgtcgaagg	aggatatcat	agtgcgcgcc	480
	acgaaggggca	tctccgtat	caaaaatgaa	cttgtcgccg	aggtccccgg	taccctcccg	540
	cccatcaccg	ccgacttcga	ctgctccaag	atccaaagta	ctatttcag	aggttactat	600
10	<210>	6					
	<211>	200					
	<212>	PRT					
	<213>	Artificial					
	<220>						
15	<223>	Proteína Q3					
	<400>	6					
	Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ile Leu Pro Glu Thr						
1	5		10		15		
	Cys Gly Thr Met Val Arg Ala Leu Met Pro Cys Leu Pro Phe Val Gln						
20	20		25		30		
	Gly Lys Glu Lys Glu Pro Ser Lys Gly Leu Gln Ile Gln Thr Ala Met						
	35		40		45		
	Lys Thr Tyr Ser Asp Ile Asp Gly Lys Leu Val Ser Glu Val Arg Ser						
	50		55		60		
25	Ser Lys Leu Pro Pro Ile Asp Val Asn Met Asp Cys Lys Thr Leu Gly						
	65		70		75		80
	Val Val Pro Arg Gln Pro Gln Leu Pro Val Ser Leu Arg His Gly Pro						
	85		90		95		
	Val Thr Gly Pro Ser Asp Pro Ala His Lys Ala Arg Leu Glu Arg Pro						
30	100		105		110		
	Gln Ile Arg Val Pro Pro Ala Pro Glu Lys Ala Glu Phe Glu Glu						
	115		120		125		

Ala Cys Gly Lys Val Val Gln Asp Ile Met Pro Cys Leu His Phe Val
130 135 140

Lys Gly Glu Glu Lys Glu Pro Ser Lys Glu Asp Ile Ile Val Arg Ala
145 150 155 160

5 Thr Lys Gly Ile Ser Gly Ile Lys Asn Glu Leu Val Ala Glu Val Pro
165 170 175

Gly Thr Leu Pro Pro Ile Thr Ala Asp Phe Asp Cys Ser Lys Ile Gln
180 185 190

Ser Thr Ile Phe Arg Gly Tyr Tyr
195 200

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína quimérica, caracterizada pelo fato de que comprehende uma seqüência de aminoácido derivada de uma proteína de transferência lipídica de classe não-específica 1, sendo que a seqüência de aminoácido da proteína quimérica é desprovida de um ou mais epitopos para ligação a anticorpos IgE correspondentes às seqüências das quais essa é derivada.
 2. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que comprehende seqüências de aminoácido derivadas das seqüências correspondentes à maior parte dos alérgenos do pólen de *Parietaria judaica* conhecidos como Par j 1 e Par j 2.
 3. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a dita seqüência de aminoácido de proteína quimérica comprehende as posições 28 a 53 de Par j 1 ou de Par j 2.
 4. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a proteína quimérica comprehende seqüências derivadas de Par j 1 e de Par j 2 que são desprovidos das posições de seqüência de aminoácido 28 a 53 de Par j 1 e Par j 2.
 5. Proteína quimérica, caracterizada pelo fato de que comprehende uma seqüência de aminoácido com homologia de ao menos 70% de SEQ ID No 2, SEQ ID No 4 ou de SEQ ID No 6.
 6. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que comprehende uma seqüência de aminoácido com homologia de ao menos 70% de SEQ ID No 4.
 7. Proteína quimérica, caracterizada pelo fato de que comprehende a seqüência de aminoácido SEQ ID No 2, SEQ ID No 4 ou SEQ ID No 6.
 8. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que comprehende a seqüência de aminoácido SEQ ID No 4.
 9. Proteína quimérica para uso no tratamento de um distúrbio imunológico.
 10. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 9, para uso no tratamento de alergia.

11. Polinucleotídeo, que compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma proteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

5 12. Polinucleotídeo, que compreende um nucleotídeo com ao menos 70% de homologia à seqüência de nucleotídeo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 3, ou de SEQ ID No 5.

13. Polinucleotídeo, que compreende um nucleotídeo com ao menos 70% de homologia à seqüência de nucleotídeo de SEQ ID No 3.

10 14. Polinucleotídeo, que compreende a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID No 1, SEQ ID No 3, ou de SEQ ID No 5.

15. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 14, que compreende a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID No 3.

16. Veículo de expressão microbiana em um organismo hospedeiro transformado, que se auto-replica e é usado para expressar o polinucleotídeo, como definido nas reivindicações 11 a 15.

17. Organismo hospedeiro transformado por um veículo de expressão microbiana, como definido na reivindicação 16.

18. Organismo, de acordo com a reivindicação 17, sendo que o organismo é um organismo procariótico.

20 19. Organismo, de acordo com a reivindicação 18, sendo que o organismo procariótico pertence ao gênero *E.coli*.

20. Organismo, de acordo com a reivindicação 17, sendo que o organismo é um organismo eucariótico.

25 21. Método para produzir um polipeptídeo que contém uma proteína quimérica, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo de um organismo hospedeiro que contém um veículo de expressão microbiano que se auto-replica no organismo previamente mencionado e é usado para expressar a proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

30 22. Método para purificar a proteína quimérica, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, que compreende o isolamento dessa da cultura, das células ou ambas.

23. Uso de uma proteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, para o tratamento de um distúrbio imunológico.

24. Uso de uma proteína, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, na preparação de um medicamento para o tratamento 5 de um distúrbio imunológico.

25. Uso, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, em que o dis-
túrbio imunológico é alergia.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 25, em que a alergia é
alergia ao pólen da *Parietaria judaica*.

10 27. Composição farmacêutica, que compreende uma quantidade
eficaz de uma proteína, como definida em qualquer uma das reivindicações
1 a 10, e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

28. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação
27, em que a composição é uma composição de vacina.

15 29. Método para tratar um distúrbio imunológico, sendo que o
dito método compreende a etapa de administrar uma composição farmacêu-
tica, como definida na reivindicação 27 ou 28, em um indivíduo necessitado
da mesma.

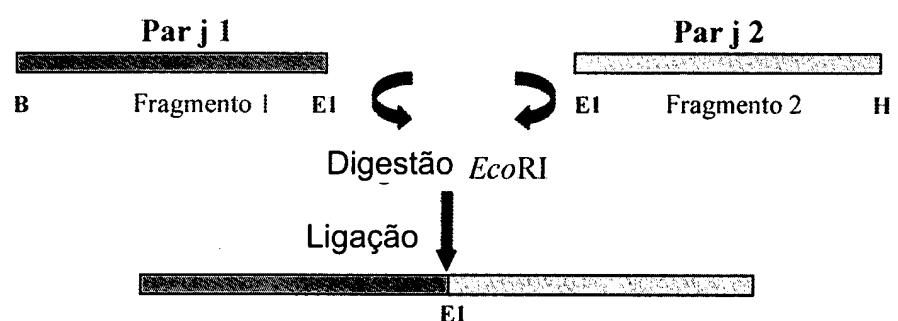


FIG. 1

ATGAGAGGATCTACCATCACCATCACCATGGATCCTGCAAGAAACCTGC
M R G S H H H H H H G I L Q E T C

 GGGACTATGGTGAGAGCGCTGATGCCGTGCCTGCCGTTCTGCAGGGAAA
G T M V R A L M P C L P F V Q G K

 GAGAAAGAGCCGTCAAAGGGGTGCTGCAGCGGCCAAAAGATTGGACGGG
E K E P S K G C C S G A K R L D G

 GAGACGAAGACGGGCCGCAGAGGGTGCACGCTTGTGAGTGCATCCAGACC
E T K T G P Q R V H A C E C I Q T

 GCCATGAAGACTTATTCCGACATCGACGGAAACTCGTCAGCGAGGTCCCC
A M K T Y S D I D G K L V S E V P

 AAGCACTGCGGCATCGTTGACAGCAAGCTCCGCCATTGACGTCAACATG
K H C G I V D S K L P P I D V N M

 GACTGCAAGACACTTGGAGTGGTCTCGCAACCCCAACTCCAGTCTCT
D C K T L G V V P R Q P Q L P V S

 CTCCGTATGGTCCCGTCACGGGCCAAGTGATCCGCCAACAAAGCACGG
L R H G P V T G P S D P A H K A R

 TTGGAGAGACCCAGATTAGAGTTCCGCCCGCACCGAAAAAGCCGAA
L E R P Q I R V P P P A P E K A E

 TTGGAGAGACCCAGATTAGAGTTCCGCCCGCACCGAAAAAGCCGAA
E E A C G K V V Q D I M P C L H

 TTGGAGAGACCCAGATTAGAGTTCCGCCCGCACCGAAAAAGCCGAA
F V K G E E K E P S K E C C S G T

 AAGAAGCTGAGCGAGGAGGTGAAGACGACGGAGCAGAAGAGGGAGGCCTGC
K K L S E E V K T T E Q K R E A C

 AAGTGCATAGTGCAGGCCACGAAGGGCATCTCCGGTATCAAAATGAACCTT
K C I V R A T K G I S G I K N E L

 GTGCCGAGGTCCCAAGAAGTGCATATTAAGACCACTCTCCGCCATC
V A E V P K K C D I K T T L P P I

 ACCGCCGACTTCGACTGCTCCAAGATCCAAAGTACTATTTCAGAGGTTAC
T A D F D C S K I Q S T I F R G Y

TAT
Y

FIG. 2

Sequence alignment of Par j 1 and Par j 2 showing structural domains. Domains are indicated by black boxes above the sequences. Amino acid positions 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70 are indicated above the sequences.

Region	Par j 1 Position	Par j 2 Position
1-I	10-20	10-20
1-II	30-40	30-40
1-III	50-60	50-60
2-I	10-20	10-20
2-II	30-40	30-40
2-III	50-60	50-60
2-IV	10-20	10-20
2-V	30-40	30-40
2-VI	50-60	50-60
1-IV	10-20	10-20
1-V	30-40	30-40
2-VII	10-20	10-20
2-VIII	30-40	30-40

FIG. 3

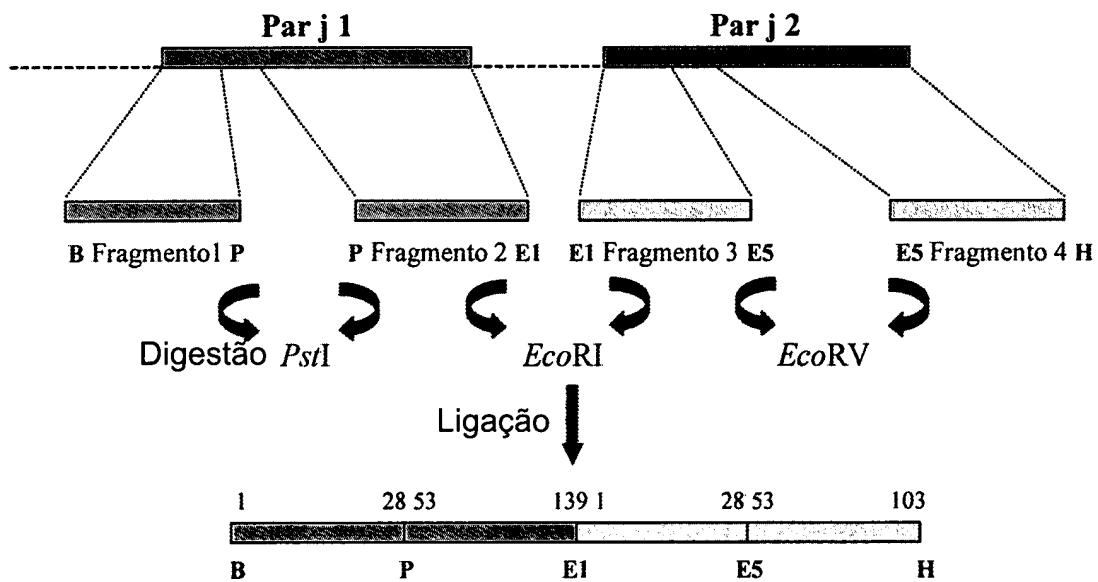


FIG. 4

ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGATCTGCAAGAAACCTGC
 M R G S H H H H H H G I L Q E T C

 GGGACTATGGT GAGAGCGCTGATGCCGTGCCTGCCGTTCGTGCAGGGGAAA
 G T M V R A L M P C L P F V Q G K

 GAGAAAGAGCCGTCAAAGGGGCTGCAGATCCAGACGCCATGAAGACTTAT
 E K E P S K G L Q I Q T A M K T Y

 TCCGACATCGACGGAAACTCGTCAGCGAGGTCCCCAAGCACTGCGGCATC
 S D I D G K L V S E V P K H C G I

 GTTGACAGCAAGCTCCGCCATTGACGTCAACATGGACTGCAAGACACTT
 V D S K L P P I D V N M D C K T L

 GGAGTGGTTCCCTCGGCAACCCAACCTCCAGTCTCTCCGTATGGTCCC
 G V V P R Q P Q L P V S L R H G P

 GTCACGGGCCAAGT GATCCGCCAACAAAGCACGGTGGAGAGACCCAG
 V T G P S D P A H K A R L E R P Q

 ATTAGAGTTCCGCCCCCGCACCGGAAAAGCCGAATTGAGGAGGCTTGC
 I R V P P P A P E K A E F E E A C

 GGGAAAGTGGTGCAGGATATAATGCCGTGCCTGCATTCTGTGAAGGGGGAG
 G K V V Q D I M P C L H F V K G E

 GAGAAGGAGCCGTGAAGGAGGATATCATAGTGCACGCCACGAAGGGCATC
 E K E P S K E D I I V R A T K G I

 TCCGGTATCAAAATGAACCTGTCGCCGAGGTCCCCAAGAAGTGCATATT
 S G I K N E L V A E V P K K C D I

 AAGACCACTCTCCGCCATCACCGCCGACTCGACTGCTCCAAGATCCAA
 K T T L P P I T A D F D C S K I Q

 AGTACTATTTCAGAGGTTACTAT
 S T I F R G Y Y

FIG. 5

Sequence alignment of Par j 1 and Par j 2. The alignment shows two rows of amino acid sequences with gaps indicated by dots. Conserved regions are highlighted with black boxes. Region 1-I is from residue 30 to 50. Region 2-I is from residue 10 to 20. Region 2-II is from residue 30 to 40. Region 2-III is from residue 40 to 50. Region 2-IV is from residue 50 to 60. Region 2-V is from residue 60 to 70. Region 2-VI is from residue 70 to 80. Region 1-IV is from residue 80 to 90. Region 2-VII is from residue 80 to 90. Region 2-VIII is from residue 90 to 100. Region 1-V is from residue 120 to 130.

	1-I	1-II	1-III	2-I	2-II	2-III	2-IV	2-V	2-VI	1-IV	2-VII	2-VIII	1-V
Par j 1	QETCGTMVRALMPCLPFVQGKEKEPSKG	CCSGAKRLDGETKTGPQRVHACEC	QTAMKTYSDIDGKLVSE										
Par j 2	EEACGKVVQDIMPCLHFVKGEEKEPSKE	CCSGTKKLSEEVKTTEQKREACKC	VRATKGISGIKNELVAE										
	10 20	30 40 50	60 70	10 20	30 40	50	60	70		80 90	80 90	90 100	120 130

FIG. 6

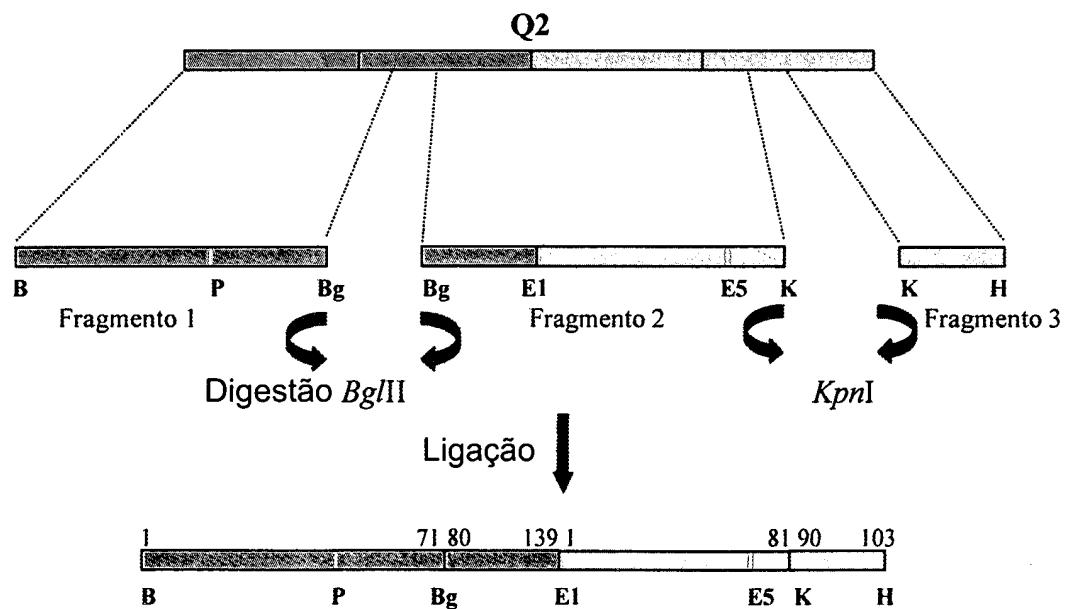


FIG. 7

ATGAGAGGATCTCACCATCACCATGGGATCCTGCCAGAAACCTGC
M R G S H H H H H H G I L P E T C
 GGGACTATGGTGAGAGCGCTGATGCCGTGCCGTTCTGCAGGGAAA
 G T M V R A L M P C L P F V Q G K
 GAGAAAGAGCCGTCAAAGGGGCTGCAGATCCAGACCGCCATGAAGACTTAT
 E K E P S K G L Q I Q T A M K T Y
 TCCGACATCGACGGAAACTCGTCAGCGAGGTCAAGATCTAGCAAGCTCCCG
 S D I D G K L V S E V R S S K L P
 CCCATTGACGTCAACATGGACTGCAAGACACTTGGAGTGGTCTCGGCAA
 P I D V N M D C K T L G V V P R Q
 CCCCAACTTCCAGTCTCTCCGTATGGTCCCGTACGGGCCAAGTGAT
 P Q L P V S L R H G P V T G P S D
 CCCGCCACAAAGCACGGTGGAGAGACCCAGATTAGAGTTCCGCC
 P A H K A R L E R P Q I R V P P P
 GCACCGGAAAAAGCCGAATCGAGGAGGCTGCGGAAAGTGGTGCAGGAT
 A P E K A E F E E A C G K V V Q D
 ATAATGCCGTGCCTGCATTCGTGAAGGGGAGGAGAAGGAGCCGTCGAAG
 I M P C L H F V K G E E K E P S K
 GAGGATATCATAGTCGCGGCCACGAAGGGCATCTCCGGTATCAAAATGAA
 E D I I V R A T K G I S G I K N E
 CTTGTCGCCGAGGTCCCCGTACCCCTCCGCCATACCGCCACTTCGAC
 L V A E V P G T L P P I T A D F D
 TGCTCCAAGATCAAAGTACTATTTCAAGAGGTTACTAT
C S K I Q S T I F R G Y Y

FIG. 8

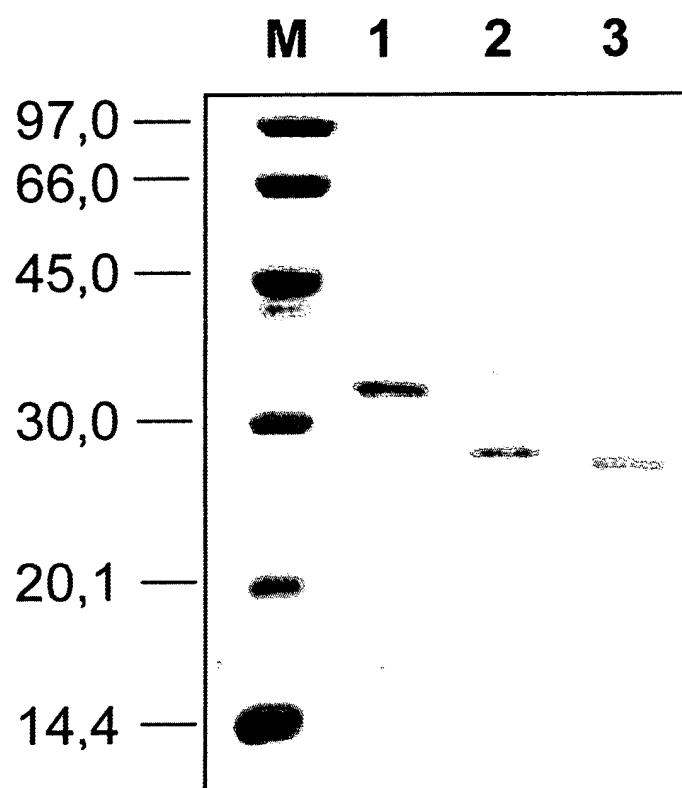


FIG. 9

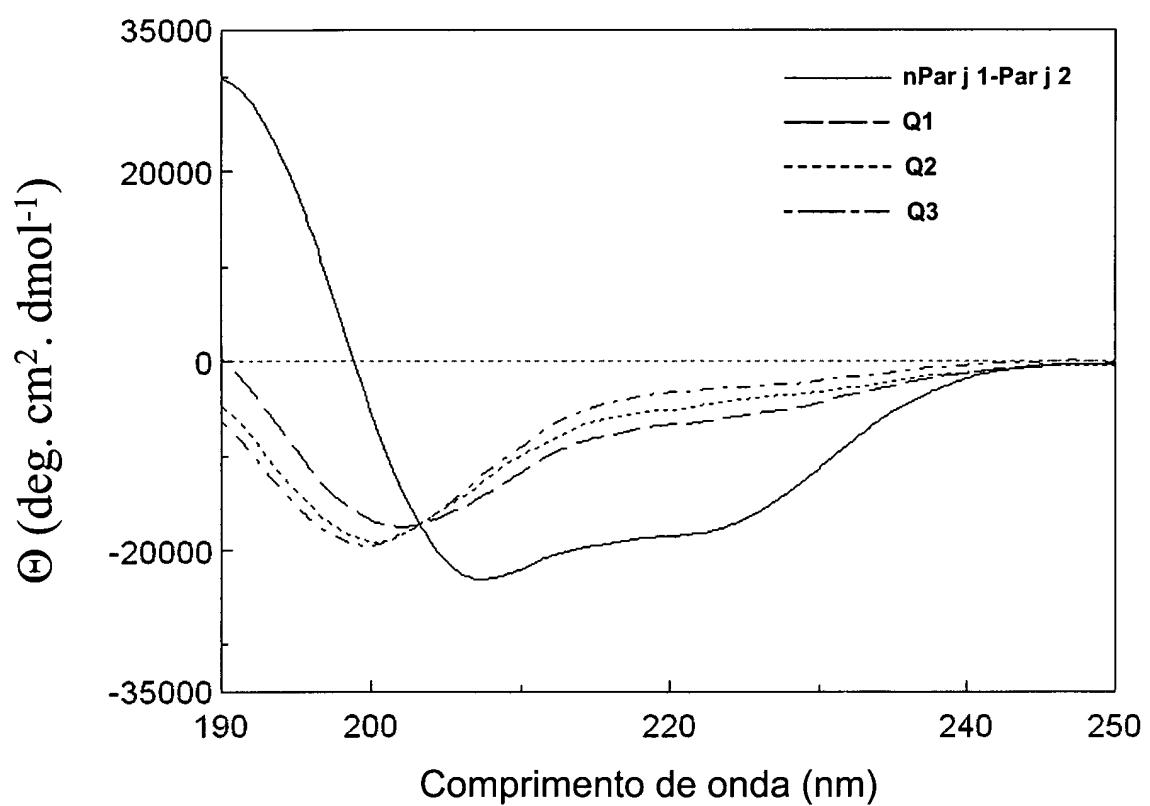


FIG. 10

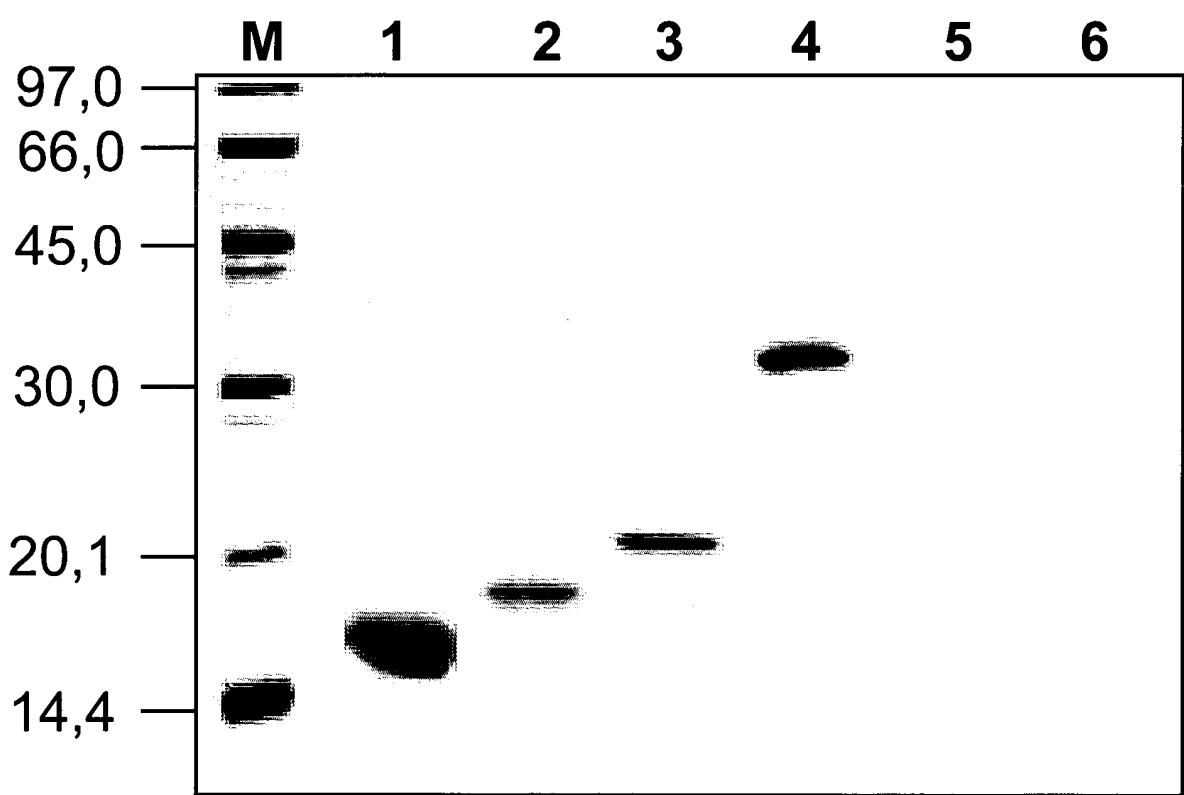


FIG. 11

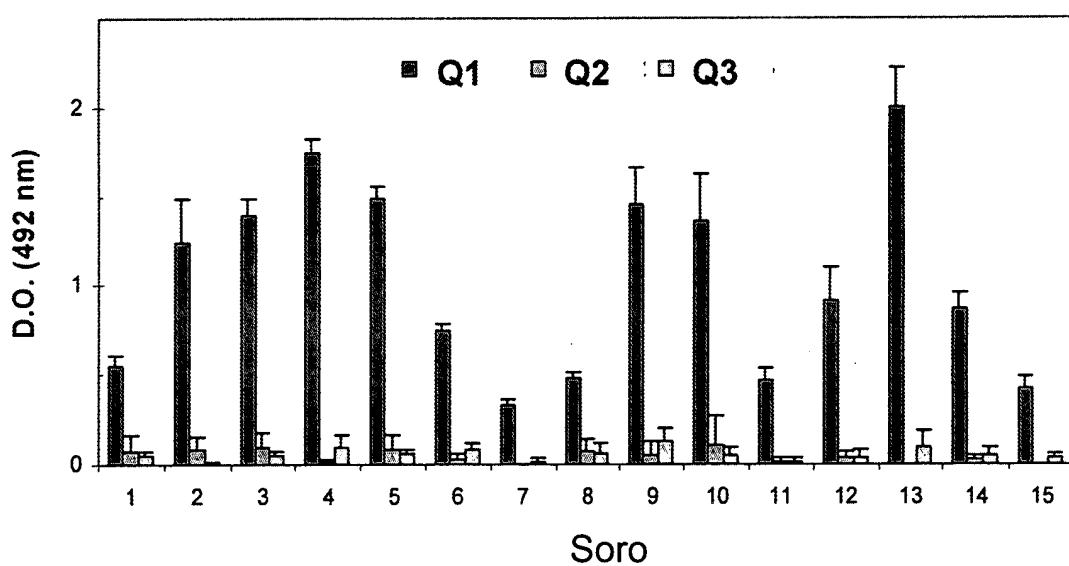


FIG. 12

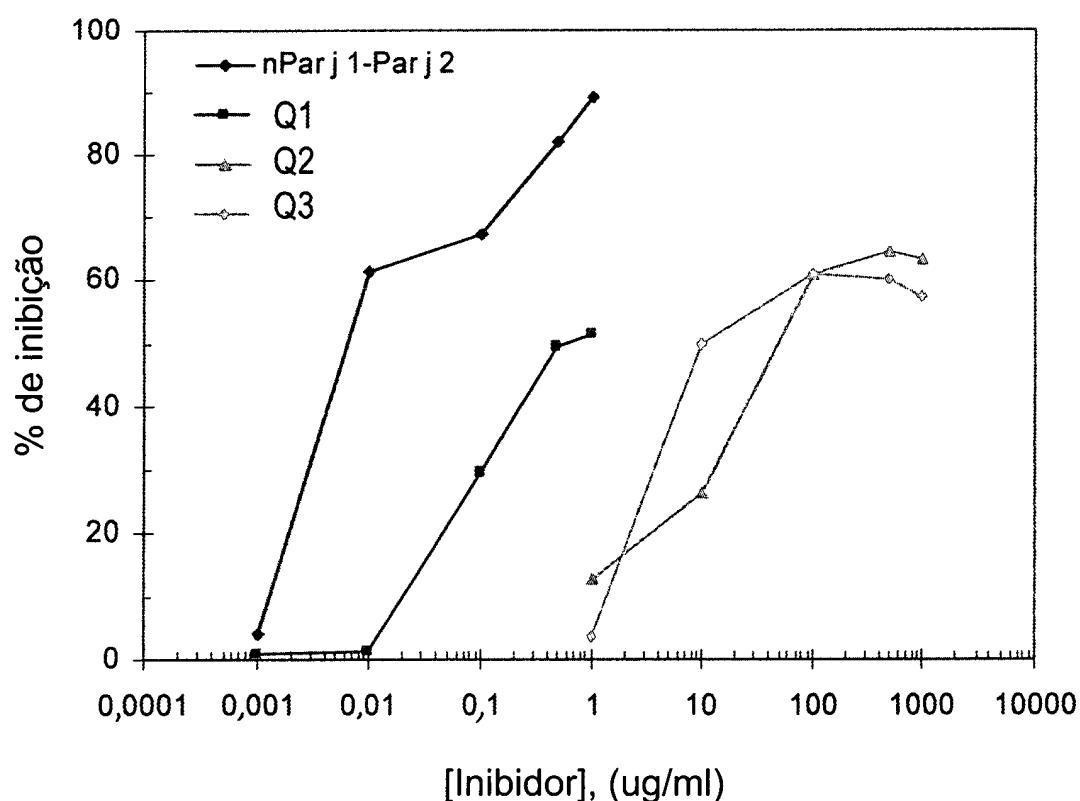


FIG. 13

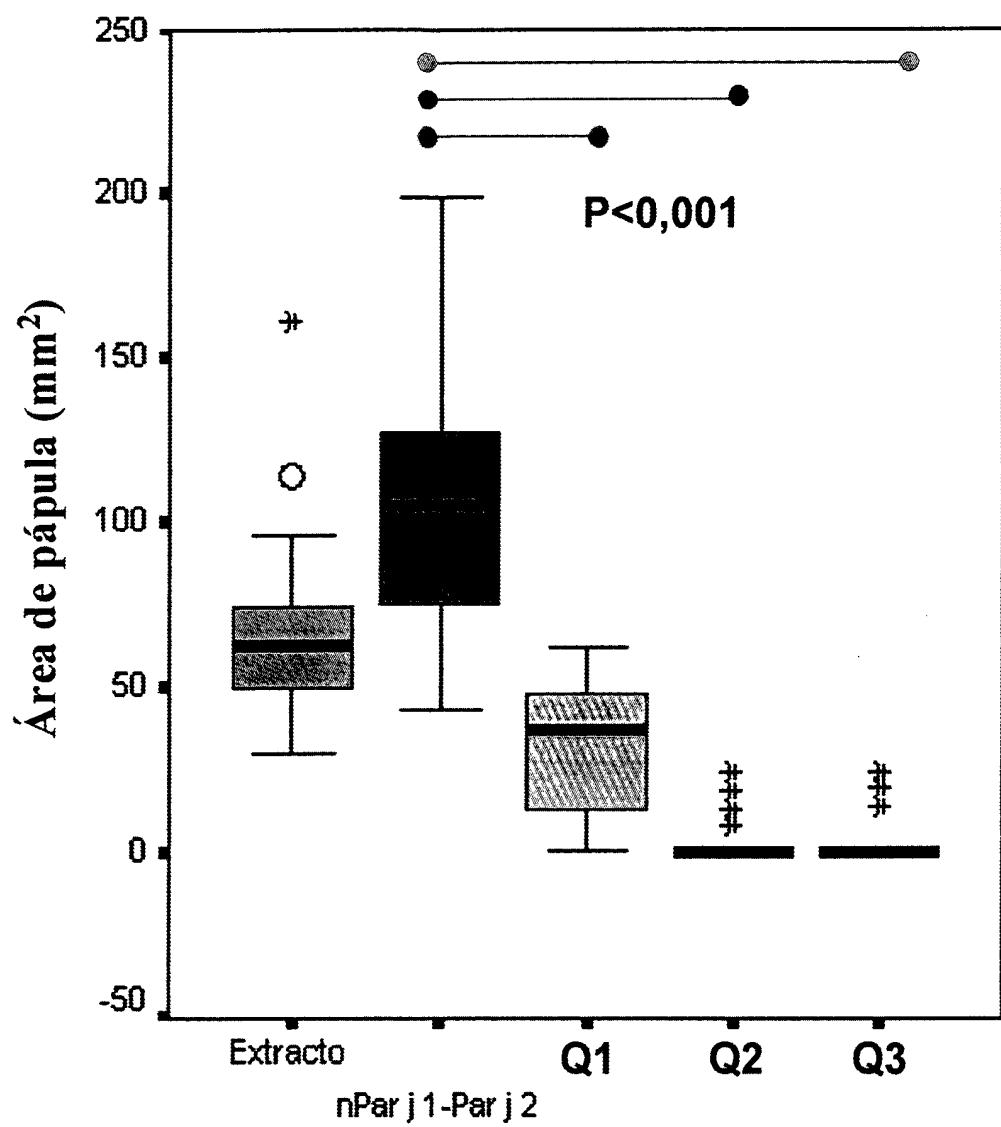


FIG. 14

13/15

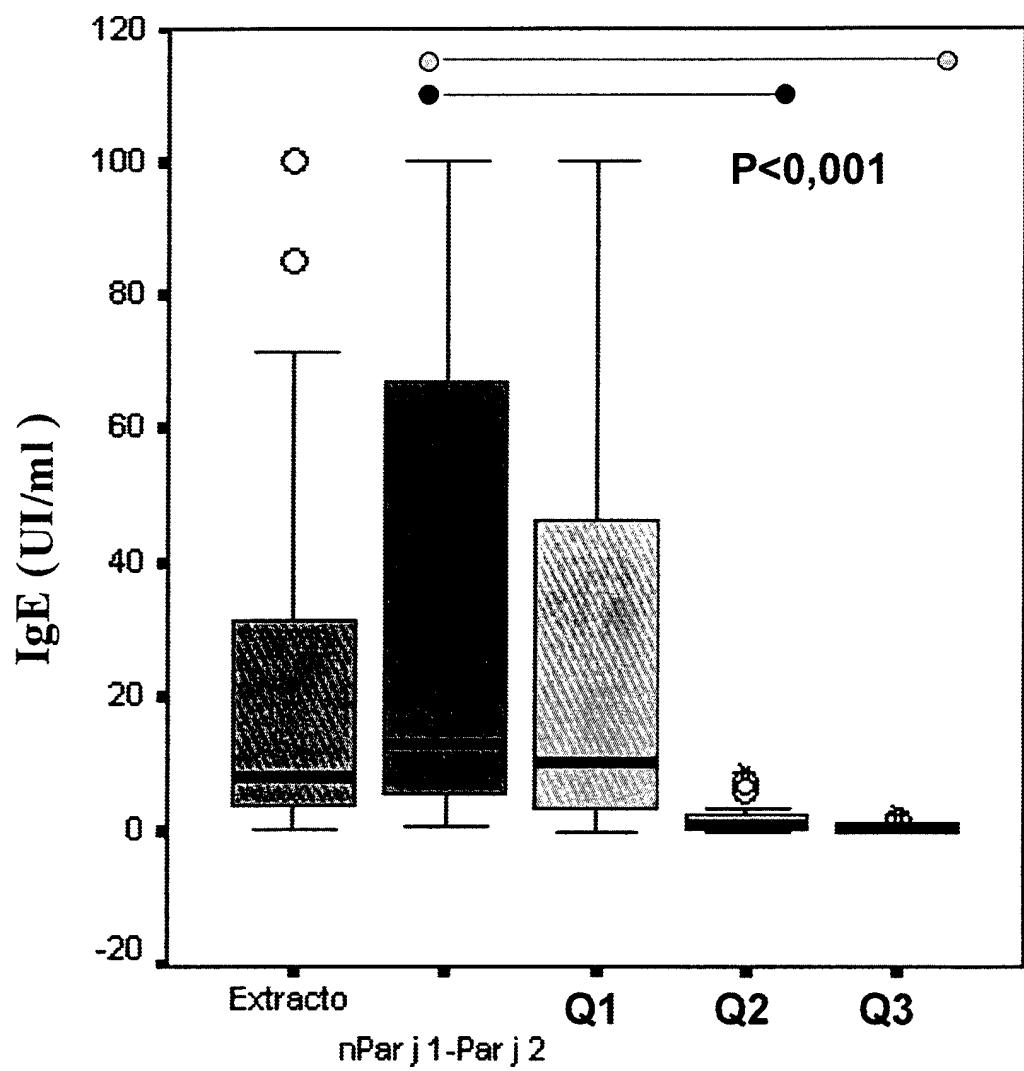


FIG. 15

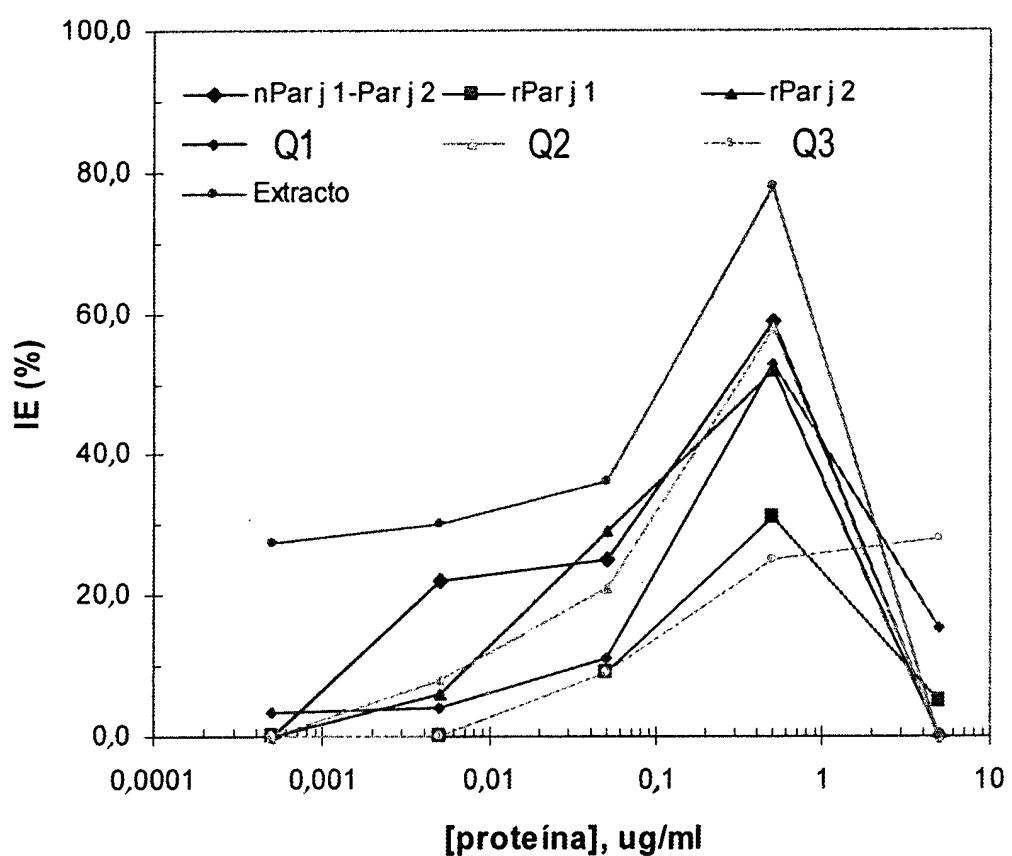


FIG. 16

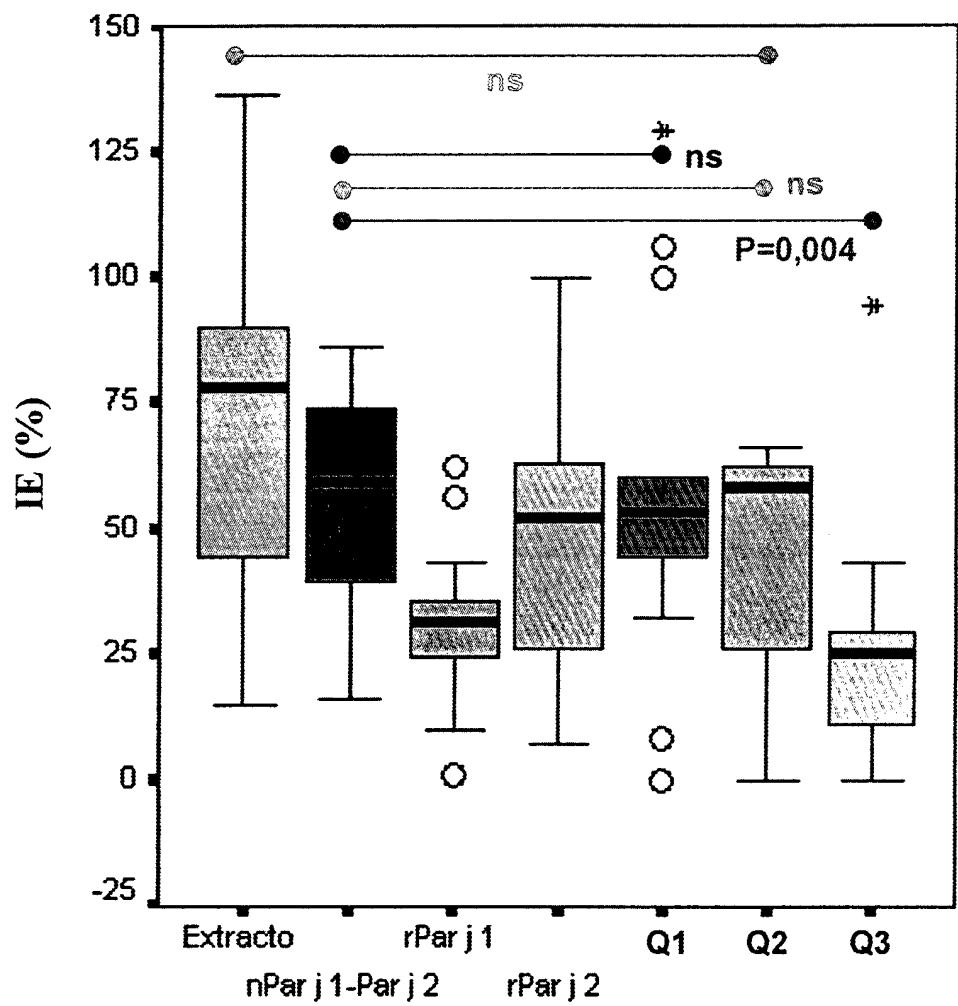


FIG. 17

RESUMO

Patente de Invenção: "PROTEÍNAS QUIMÉRICAS HIPOALERGÊNICAS PERTENCENTES À FAMÍLIA DE TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA DE *PARIETARIA JUDAICA* PARA USO NO TRATAMENTO DE ALERGIAS".

5 A presente invenção refere-se a proteínas quiméricas hipoalergênicas que pertencem à família de transferência lipídica de *Parietaria judaica* para uso no tratamento de alergias. A presente invenção refere-se às moléculas de DNA recombinantes que codificam os polipeptídeos quiméricos para diferenciar os alérgenos de *Parietaria judaica* que podem ser usados
10 para a prevenção e tratamento de alergias, em particular alergia ao pólen. Especificamente, os polipeptídeos quiméricos compostos de fragmentos dos alérgenos Par j 1 e Par j 2 que possuem características hipoalergênicas são descritos. Também são descritos métodos para produzir esses polipeptídeos recombinantes em sistemas de expressão heteróloga. Também descrevem-
15 se métodos eficientes para purificar as proteínas quiméricas.