



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

(21) **PI0710649-1 A2**

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



(51) *Int.Cl.:*  
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 Farmacêutica, 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 2007/116316 de 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**

**Relatório 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    DESCRIÇÃO**

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 antígenos 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 antígenos, 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- $\gamma$  [(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- $\beta$  [(3) Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., and Blaser, K. (2001) . Mechanism of IL-10 induced cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens. *Int. Arch Allergy Immunol.* 124; 180-182]. A redução na ativação e proliferação das células TH2 está associada com a produção reduzida de IL-4, e de IgEs com as células B. A redução na atividade e infiltração das células TH2 no muco nasal e brônquico resulta na síntese de IL-5, permitindo uma redução 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 TH0 produzem uma mistura de citocinas tipo TH1 e TH2 que promovem a produção 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) Mowbray, 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 binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112; 915-922]. Esses também bloqueiam a coleta de antígeno mediado por IgE pelas células contendo antígeno, e esse suprime a resposta imune aos alérgenos.

Os extratos alérgenos isolados de fontes naturais são misturas complexas de proteínas e outras moléculas. Sua composição, e, portanto alergenidade, 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 efectoras;

- 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 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 conseqüentemente as reações adversas [(6)

15 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 de citocina  $T_H0$  ou  $T_H1$  pelas células T, menor produção de IgE e maior produção de IgG pelas células B; resultando na indução de tolerância da célula T tipo  $T_H2$  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

20 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

25

30

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., 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 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 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 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 FcεRI 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) FcεRI 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, 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., Cocchiara, 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 mono específica 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*.

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, 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 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, 151-157; (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] . O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante permitiu a caracterização molecular de pólen de *Parietaria* que será completada: os dois alérgenos principais de pólen de *P. judaica* conhecidos como Par j 1 e Par j 2 foram clonados e seqüenciados [(21) Duro, G., Colombo, P., Costa, M.A. , Izzo, V., Porcasi, R., 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 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 do pólen de *Parietaria judaica*, possuem epitopos E da imunoglobulina
- 15 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 completar *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 a-
- 30 lergênicas 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-



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 sequência 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 sequência 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 sequência 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 sequência primária de cada alérgeno (mais especificamente os resíduos de cisteína envolvidos na formação de pontes de dissulfeto) de modo que as sequências 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 quiméricas 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 quiméricas não  
10 só está desorganizada como também certos epitopos B foram deletados. As proteínas quiméricas 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 imunodeteção  
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 quiméricas de acordo com a presente invenção, por outro lado, mantêm sua capacidade imunogênica, como mos-  
20 trado por testes de linfoproliferação em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 13 pacientes alérgicos a *P. judaica*.

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 possí-  
25 vel 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 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.

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.

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.

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 aquela da mistura das duas proteínas naturais, como ilustrado na Figura 12.

Esses dados de baixa alergenicidade foram restringidos por experimentos in vivo em 30 pacientes por um teste cutâneo por punção. 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 contém 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).

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 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 sequência 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) 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 sequência 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 EcorRV (DI) estão hachurados. Os resíduos de cisteína estão sublinhados duas vezes.

5 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.

10 A Figura 8 mostra uma sequência 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 EcorRV (DI), Bg1II (RS), e KpnI (GT) estão hachurados. Os resíduos de cisteína estão sublinhados duas vezes.

15 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.

20 A Figura 11 mostra a imunodeteção 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).

25 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.

30 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 quimérica 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 redu-  
20 zida das proteínas e peptídeos estimularem uma resposta alérgica quando comparada com a mesma capacidade de imunógenos tipo selvagem.

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

A proteína quimérica pode compreender alternativa ou adicionalmente uma sequência homóloga à sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID No 2, 4 ou 6. De preferência, a sequência 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 sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID No 2, 4 ou 6, com mais preferência, à sequência 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 alérgeno 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-terminal que não estão presentes na seqüência original e poderiam corresponder à região rica em histidina que permite uma rápida purificação por interação com metais divalentes ligados a suportes sólidos.  
20  
25

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  
5 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 me-  
10 nos 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  
15 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.

20 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.

25 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;

30 (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  
5 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.

10 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.

15 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  
20 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  
25 quantidade eficaz de uma proteína ou peptídeo da invenção e um excipiente farmacêuticamente 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  
30 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 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 como 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 curativo da alergia ao pólen da *P. judaica* que pode ser manifestada como rinite, conjuntivite, asma, urticária, angioedema, eczema, dermatite, ou ainda choque anafilático.

25 As características imunológicas da proteína quimérica de acordo com a presente invenção serão descritas a seguir. A Figura 10 mostra um teste de imunodeteção 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 químera (rota 4), que mostra a fusão recombinante das duas proteínas que são completas, porém contêm todos seus epítopos B. Isso deveria indicar que a ausência dos epítopos B incluídos entre os resíduos 29 e 52 (químera 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 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 menos alergênica do que a proteína quimérica Q1.

Uma medida mais direta da hipoalergenicidade da químera 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 químera Q2 apresenta uma redução marcada em reatividade cutânea. Uma comparação das descrições de cada distribuição mostra que a químera 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 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 químera Q2 comparada com a mistura de proteínas naturais.

Essa redução notável na capacidade de ligação a IgE e, então, na capacidade de ativar reações adversas relacionadas à deleção de epítopos 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 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 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 em um volume de reação de 50 µl: tampão de amplificação x10, 5 µl; 200 µM 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 µl. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador RoboCycler (Stratagene) sob condições específicas que serão descritas em cada caso. O produto de reação foi submetido à eletroforese 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 mistura de ligação foi usada para transformar as células competentes de E. coli DH5α (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 dideoxynucleotídeos fluorescentes e amplificação em um termociclador utilizando o PRISM Ready Reaction DiDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer), seguindo as instruções do fabricante.

#### A) Proteína quimérica Q1

10 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  
15 como matrizes. Para fundir as duas seqüências, é necessário possuir um ligador, nesse caso *EcoRI*-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 TGCAAGAAACCTGCGG (*Bam*HI) e F1R1, CG GAATTC GGCTTTTCCGGTGCGG (*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 GAGGAGGCTTGCGGGA (*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).

30 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 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 subsequentelemente 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 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) para a ligação seqüencial dos fragmentos amplificados diferentes.

Oligonucleotídeos sintéticos usados:

- Fragmento 1: F1F1, CG GGATCC TGCAAGAAACCTGCGG

(*Bam*HI) e F2R1, CG CTGCAG CCCCTTTGACGGCTCTT (*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 (*Pst*I) e F2R2, CG GAATTC GGCTTTTTCCGGTGCGGG (*Eco*RI).

- Fragmento 3: F2F3, CG GAATTC GAGGAGGCTTGCGGGAA (*Eco*RI) e F2R3, CG GATATC CTCCTTCGACGGCTCCTT (*Eco*RV).

- Fragmento 4: F2F4, CG GATATC ATAGTGCGCGCCACGAA (*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 sequência extra de 13 aminoácidos na terminação N-terminal correspondente à cauda de afinidade (Figura 5). A dita sequência codificada por um polipeptídeo que possui 212 aminoácidos e um peso molecular aparente de 23336 Da.

### 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 epitopos de IgE, outra sequência 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 TGCAAGAAACCTGCGG (*Bam*HI) e F3R1, CG AGATCT GACCTCGCTGACGAG (*Bgl*II) .

- Fragmento 2: F3F2, CG AGATCT AGCAAGCTCCCGCCC (*Bgl*II) 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 (1 ciclo).

- Fragmento 3: F3F3, CG GGTACC CTCCCGCCCATCACC (*Kpn*I) e F3R3, TTAAAAAGGCCGTAATATCC. 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 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 de restrição usadas foram *Bgl*II 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 sequência 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 sequência extra de 13 aminoácidos na terminação N-terminal correspondente à cauda de afinidade (figura 8). A dita sequência é codificada por um polipeptídeo que possui 200 aminoácidos e 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.

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 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 ÄKTA Prime (GE-Healthcare). Essa coluna foi quelada com níquel e foi anteriormente balanceada com 10 volumes do tampão de 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 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-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) 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 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

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

#### A) Imunodeteção

- Uma primeira avaliação da atividade de ligação a IgE das fusões 1, 2 e 3 foi realizada pelo método de imunotransferência que emprega uma mistura de soros de pacientes alérgicos a *P. judaica*. Uma vez que os extra-
- 20 tos 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: 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
- 25 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-
- 30

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 imunodeteção demonstraram uma capacidade de  
 5 ligação a IgE diferente entre as três fusões; o reconhecimento de anticorpos de IgE, conseqüentemente, 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a absorvência foi medida a 492 nm em um leitor de placa de ELISA Easy Reader EAR-400 AT (SLT-Lab Instruments).

A reatividade a IgE foi demonstrada apenas no caso de Q1, enquanto tanto Q2 como Q3 não demonstraram virtualmente nenhum reconhe-  
 30 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 punção) 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   len da *P. judaica*.

- 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 glicerizada. 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.

- No experimento uma gota de cada alérgeno que será testado foi
- 30   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 mm<sup>2</sup> - faixa de confiança 95%: 54,98-75,53) e nPar j 1-Par j 2 (média 106,80 mm<sup>2</sup> - faixa de confiança 95%: 91,90-121,70). Os valores das quimeras 2 e 3 são virtualmente zero: Q2 (média 0,95 mm<sup>2</sup> - faixa de confiança 95%: 0-2,89) e Q3 (média 0,15 mm<sup>2</sup> - 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 subsequenteiramente 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 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). Portanto, para verificar se, além de não se ligar a anticorpos IgE, essas proteínas permaneceram antigênicas, um teste de linfoproliferação foi realizado em células sangüíneas 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 ressuspensas em  $1 \times 10^6$  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 WST-I, Roche Diagnostics). Essas foram depositadas em microplacas de fundo plano (Nunc, NUNC),  $2 \times 10^5$  CMSP em um volume final de meio de 200  $\mu$ l e as medidas foram tiradas em triplicata a 37°C e atmosfera umidificada 5% de CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ g/ml. Os controles em triplicata de culturas não-estimuladas foram incluídos em todos os casos. Após 3 dias, 20  $\mu$ 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 imunogênica 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 ex-  
15 trato ( $P= 0,152$  e  $P= 0,294$  respectivamente) e nPar j 1-Par j 2 ( $P= 0,484$  e  $P= 0,182$  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 hipoalergêni-  
25 cas 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 hipoalergê-  
30 nicas 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 farmacologicamente aceitáveis, de acordo com a legislação vigente e o procedimento galênico para 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 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). 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, M. T., Valent, P., Reisinger, J., Pelzmann, M., Hayek, B., Kronqvist, M., Gafvelin, G., 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,

- 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.
- 5 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 FcεRI expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111,141-8.
- 10 10. von Bubnoff, D., Matz, H., Frahnert, C. Rao, M. L., Hanau, D., de la Salle, H., Bieber, T. (2003) FcεRI induces the triptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J. Immunol.* 169, 1810-1816.
- 15 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, 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.
- 20 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.* 202, 14677-82.
- 25 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., 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.
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,  
M.A., Izzo, V., Lambda, D., and Geraci, D. (2003). Assignment of disulphide  
25 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*  
30 *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* 227, 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* 76, 4350-4354.
33. Ceska, M. and Lundkvist, U. (1972). A new and simple radio-immunoassay method for the determination of IgE. *Immunochemistry* 9, 1021-1030.

Listagem de Sequência

	<110>	Bial Industria Farmacéutica, S.A.	
	<120>	PROTEÍNAS QUIMÉRICAS HIPOALERGÊNICAS PERTENCENTES À FAMÍLIA DE TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA DE <i>PARIETARIA JUDAICA</i> PARA USO NO TRATAMENTO DE ALERGIAS	
5	<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 tgatgccgtg cctgccgttc gtgcagggga aagagaaaga gccgtcaaag	120
		gggtgctgca gcggcgccaa aagattggac ggggagacga agacggggcc gcagaggggtg	180
		cacgcttggtg agtgcattcca gaccgccatg aagacttatt ccgacatcga cgggaaactc	240
20		gtcagcgagg tccccaagca ctgcggcatc gttgacagca agtcccgc cattgacgtc	300
		aacatggact gcaagacact tggagtgggt cctcggaac cccaacttcc agtctctctc	360
		cgatcatggc ccgtcacggg cccaagtgat cccgccaca aagcacggtt ggagagaccc	420
		cagattagag ttccgcccc cgcaccgga aaagccgaat tcgaggaggc ttgcgggaaa	480
		gtggtgcagg atataatgcc gtgcctgcat ttcgtgaagg gggaggagaa ggagccgtcg	540
25		aaggagtgct gcagcggcac gaagaagctg agcgaggagg tgaagacgac ggagcagaag	600
		agggaggcct gcaagtgcatt agtgcgcgcc acgaagggca tctccggtat caaaaatgaa	660
		cttgtcgccg aggtcccaa gaagtgcgat attaagacca ctctccgcc catcacgcc	720
		gacttcgact gctccaagat ccaaagtact attttcagag gttactat	768
	<210>	2	
30	<211>	256	
	<212>	PRT	
	<213>	Artificial	

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Proteína Q1

&lt;400&gt; 2

Met Arg Gly Ser His 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	aagagaaaga	gccgtcaaag	120									
	gggctgcaga	tccagaccgc	catgaagact	tattccgaca	tcgacgggaa	actcgtcagc	180									
	gaggtcccca	agcactgcgg	catcgttgac	agcaagctcc	cgccattga	cgtcaacatg	240									
15	gactgcaaga	cacttggagt	ggttcctcgg	caaccccaac	ttccagtctc	tctccgtcat	300									
	ggtcccgta	cgggcccaag	tgatcccgcc	cacaaagcac	ggttggagag	accccagatt	360									
	agagttccgc	ccccgcacc	ggaaaaagcc	gaattcgagg	aggcttgcgg	gaaagtgggtg	420									
	caggatataa	tgccgtgcct	gcatttcgtg	aagggggagg	agaaggagcc	gtcgaaggag	480									
	gatatcatag	tgcgcgccac	gaagggcatc	tccggtatca	aaaatgaact	tgtcgccgag	540									
20	gtccccaaga	agtgcgatat	taagaccact	ctccgcca	tcaccgccga	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 tgatgccgtg cctgccgttc gtgcagggga aagagaaaga gccgtcaaag	120
	gggctgcaga tccagaccgc catgaagact tattccgaca tcgacgggaa actcgtcagc	180
	gaggtcagat ctagcaagct cccgccatt gacgtcaaca tggactgcaa gacacttgga	240
	gtggttcttc ggcaacccca acttccagtc tctctccgtc atgggtcccg caccggccca	300
5	agtgatcccg cccacaaagc acggttggag agacccaga ttagagttcc gcccccgca	360
	ccggaaaaag ccgaattcga ggaggcttgc gggaaagtgg tgcaggatat aatgccgtgc	420
	ctgcatttcg tgaaggggga ggagaaggag ccgtcgaagg aggatatcat agtgcgcgcc	480
	acgaagggca tctccggtat caaaaatgaa cttgtcgccg aggtcccccg taccctcccg	540
	cccatcaccg ccgacttcga ctgtccaag atccaaagta ctattttcag 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 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 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  
10 195 200

## REIVINDICAÇÕES

1. Proteína quimérica, caracterizada pelo fato de que compreende 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 compreende 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 compreende 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 compreende 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 compreende 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 compreende uma seqüência de aminoácido com homologia de ao menos 70% de SEQ ID No 4.

7. Proteína quimérica, caracterizada pelo de que compreende 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 compreende 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.

15 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 distúrbio 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 farmacêutica, como definida na reivindicação 27 ou 28, em um indivíduo necessitado da mesma.

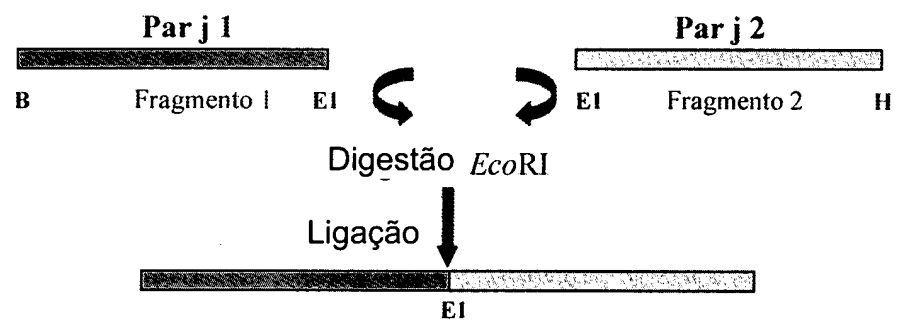


FIG. 1

ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCTGCAAGAAACCTGC  
M R G S H H H H H G I L Q E T C  
 GGGACTATGGTGAGAGCGCTGATGCCGTGCCTGCCGTTTCGTGCAGGGGAAA  
 G T M V R A L M P C L P F V Q G K  
 GAGAAAGAGCCGTCAAAGGGGTGCTGCAGCGGCGCCAAAAGATTGGACGGG  
 E K E P S K G C C S G A K R L D G  
 GAGACGAAGACGGGGCCGCAGAGGGTGCACGCTTGTGAGTGCATCCAGACC  
 E T K T G P Q R V H A C E C I Q T  
 GCCATGAAGACTTATTCCGACATCGACGGGAAACTCGTCAGCGAGGTCCCC  
 A M K T Y S D I D G K L V S E V P  
 AAGCACTGCGGCATCGTTGACAGCAAGCTCCCGCCCATTCGACGTCAACATG  
 K H C G I V D S K L P P I D V N M  
 GACTGCAAGACACTTGGAGTGGTTCCCTCGGCAACCCCAACTTCCAGTCTCT  
 D C K T L G V V P R Q P Q L P V S  
 CTCCGTCATGGTCCCGTCACGGGGCCCAAGTGATCCCGCCACAAAGCACGG  
 L R H G P V T G P S D P A H K A R  
 TTGGAGAGACCCAGATTAGAGTTCCGCCCCCGCACCGGAAAAAGCCGAA  
 L E R P Q I R V P P P A P E K A E  
 TTCGAGGAGGCTTGCGGGAAAGTGGTGCAGGATATAATGCCGTGCCTGCAT  
F E E A C G K V V Q D I M P C L H  
 TTCGTGAAGGGGGAGGAGAAGGAGCCGTGAAGGAGTGTGCAGCGGCACG  
 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  
 AAGTGCATAGTGC GCGCCACGAAGGGCATCTCCGGTATCAAAAATGAACTT  
 K C I V R A T K G I S G I K N E L  
 GTCGCCGAGGTCCCCAAGAAGTGCGATATTAAGACCACTCTCCCGCCCATC  
 V A E V P K K C D I K T T L P P I  
 ACCGCCGACTTCGACTGCTCCAAGATCCAAAGTACTATTTTCAGAGGTTAC  
 T A D F D C S K I Q S T I F R G Y  
 TAT  
 Y

FIG. 2

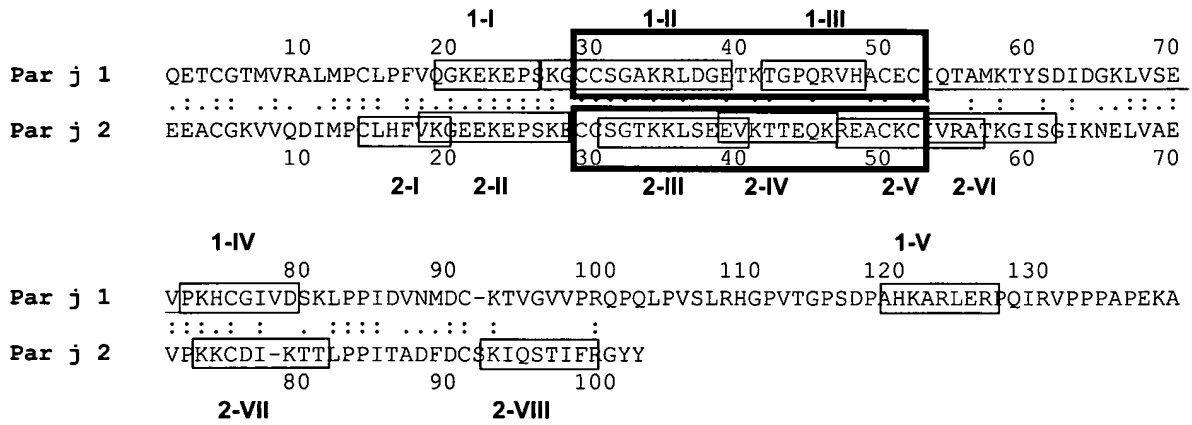


FIG. 3

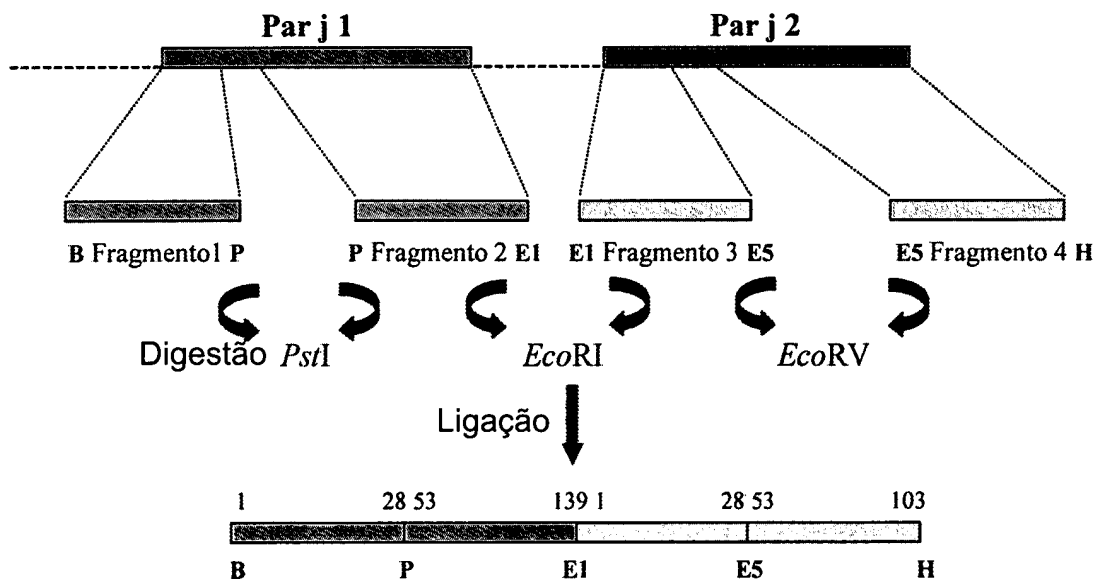


FIG. 4



ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCTGCAAGAAACCTGC  
 M R G S H H H H H G I L Q E T C  
 GGGACTATGGTGAGAGCGCTGATGCCGTGCCTGCCGTTTCGTGCAGGGGAAA  
 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  
 TCCGACATCGACGGGAAACTCGTCAGCGAGGTCCCCAAGCACTGCGGCATC  
 S D I D G K L V S E V P K H C G I  
 GTTGACAGCAAGCTCCCGCCCATTGACGTCAACATGGACTGCAAGACACTT  
 V D S K L P P I D V N M D C K T L  
 GGAGTGGTTCCTCGGCAACCCCAACTTCCAGTCTCTCTCCGTCATGGTCCC  
 G V V P R Q P Q L P V S L R H G P  
 GTCACGGGCCCCAAGTGATCCCGCCCACAAAGCACGGTTGGAGAGACCCAG  
 V T G P S D P A H K A R L E R P Q  
 ATTAGAGTTCCGCCCCCGCACCGGAAAAAGCCGAATTTCGAGGAGGCTTGC  
 I R V P P P A P E K A E F E E A C  
 GGGAAAGTGGTGCAGGATATAATGCCGTGCCTGCATTTTCGTGAAGGGGGAG  
 G K V V Q D I M P C L H F V K G E  
 GAGAAGGAGCCGTCTGAAGGAGGATATCATAGTGC GCGCCACGAAGGGCATC  
 E K E P S K E D I I V R A T K G I  
 TCCGGTATCAAAAATGAACTTGTCGCCGAGGTCCCCAAGAAGTGCGATATT  
 S G I K N E L V A E V P K K C D I  
 AAGACCACTCTCCCGCCCATCACCGCCGACTTCGACTGCTCCAAGATCCAA  
 K T T L P P I T A D F D C S K I Q  
 AGTACTATTTTCAGAGGTTACTAT  
 S T I F R G Y Y

FIG. 5

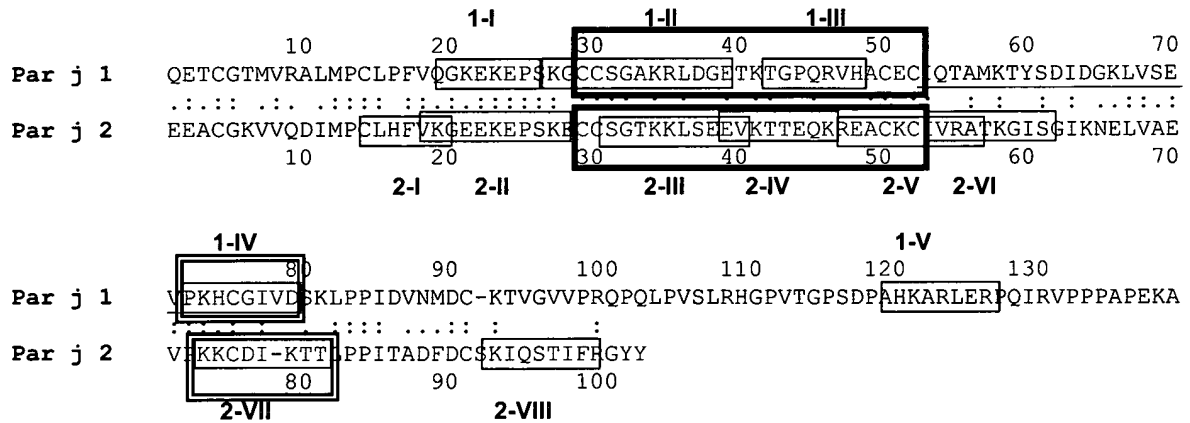


FIG. 6

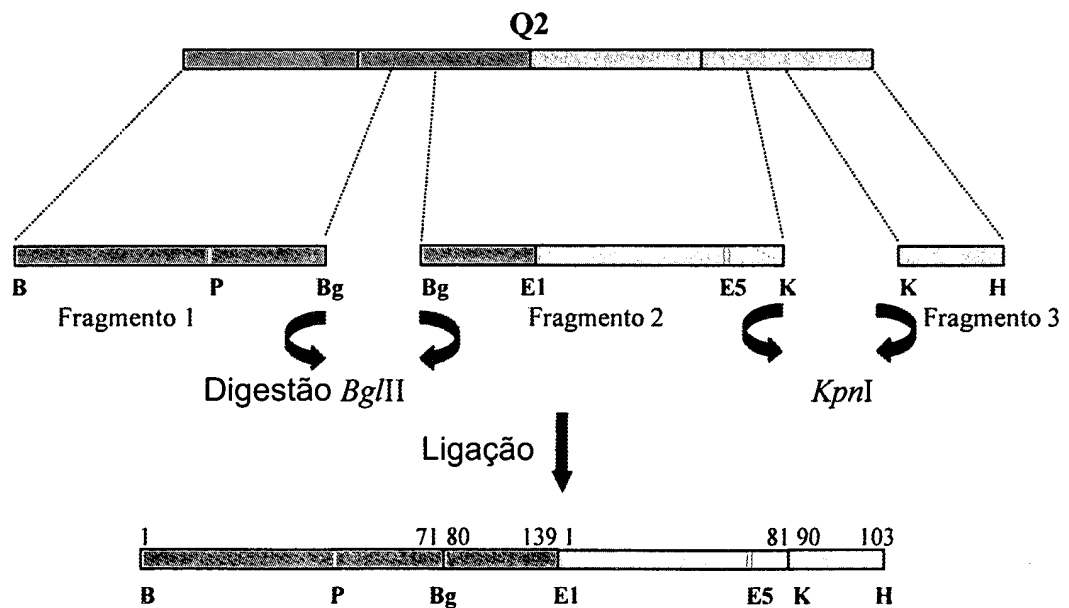


FIG. 7

ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCTGCCAGAAACCTGC  
M R G S H H H H H G I L P E T C  
 GGGACTATGGTGAGAGCGCTGATGCCGTGCCTGCCGTTTCGTGCAGGGGAAA  
 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  
 TCCGACATCGACGGGAAACTCGTCAGCGAGGTCAGATCTAGCAAGCTCCCG  
 S D I D G K L V S E V R S S K L P  
 CCCATTGACGTCAACATGGACTGCAAGACACTTGGAGTGGTTCCTCGGCAA  
 P I D V N M D C K T L G V V P R Q  
 CCCCAACTTCCAGTCTCTCTCCGTCATGGTCCCGTCACGGGGCCCAAGTGAT  
 P Q L P V S L R H G P V T G P S D  
 CCCGCCCACAAAGCACGGTTGGAGAGACCCCAGATTAGAGTTCCGCCCCC  
 P A H K A R L E R P Q I R V P P P  
 GCACCGGAAAAAGCCGAATTCGAGGAGGCTTGCGGGAAAGTGGTGCAGGAT  
 A P E K A E F E E A C G K V V Q D  
 ATAATGCCGTGCCTGCATTTTCGTGAAGGGGGAGGAGAAGGAGCCGTCGAAG  
 I M P C L H F V K G E E K E P S K  
 GAGGATATCATAGTGC GCGCCACGAAGGGCATCTCCGGTATCAAAAATGAA  
 E D I I V R A T K G I S G I K N E  
 CTTGTCGCCGAGGTCCCCGGTACCCTCCCGCCCATCACCGCCGACTTCGAC  
 L V A E V P G T L P P I T A D F D  
 TGCTCCAAGATCCAAAGTACTATTTTCAGAGGTTACTAT  
C S K I Q S T I F R G Y Y

FIG. 8

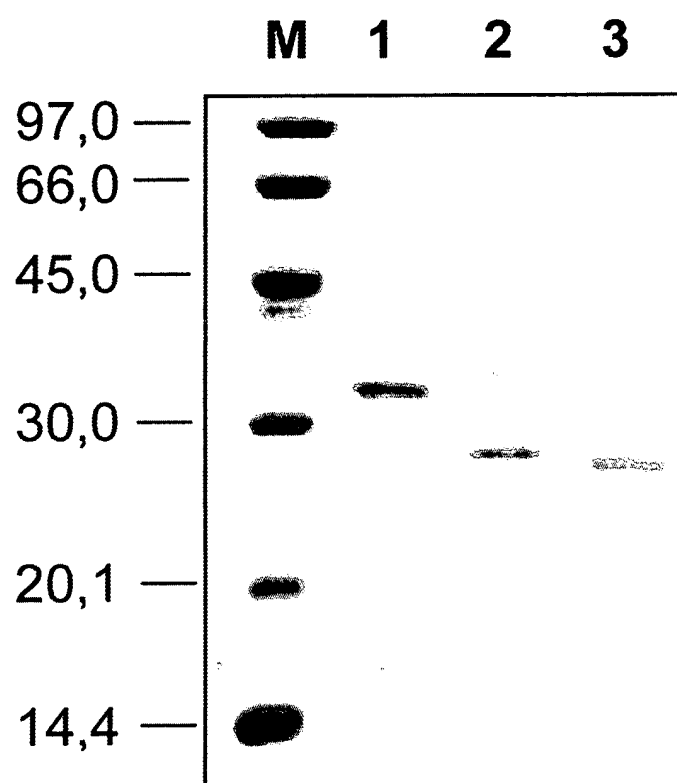


FIG. 9

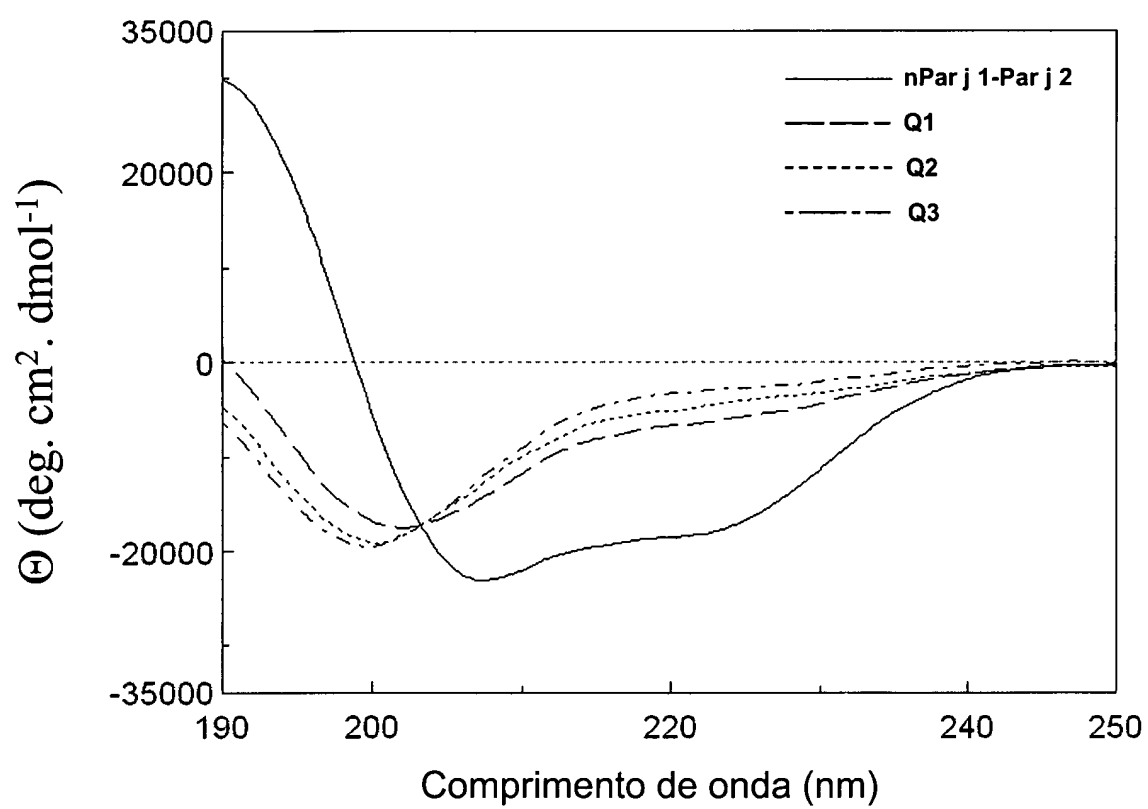


FIG. 10

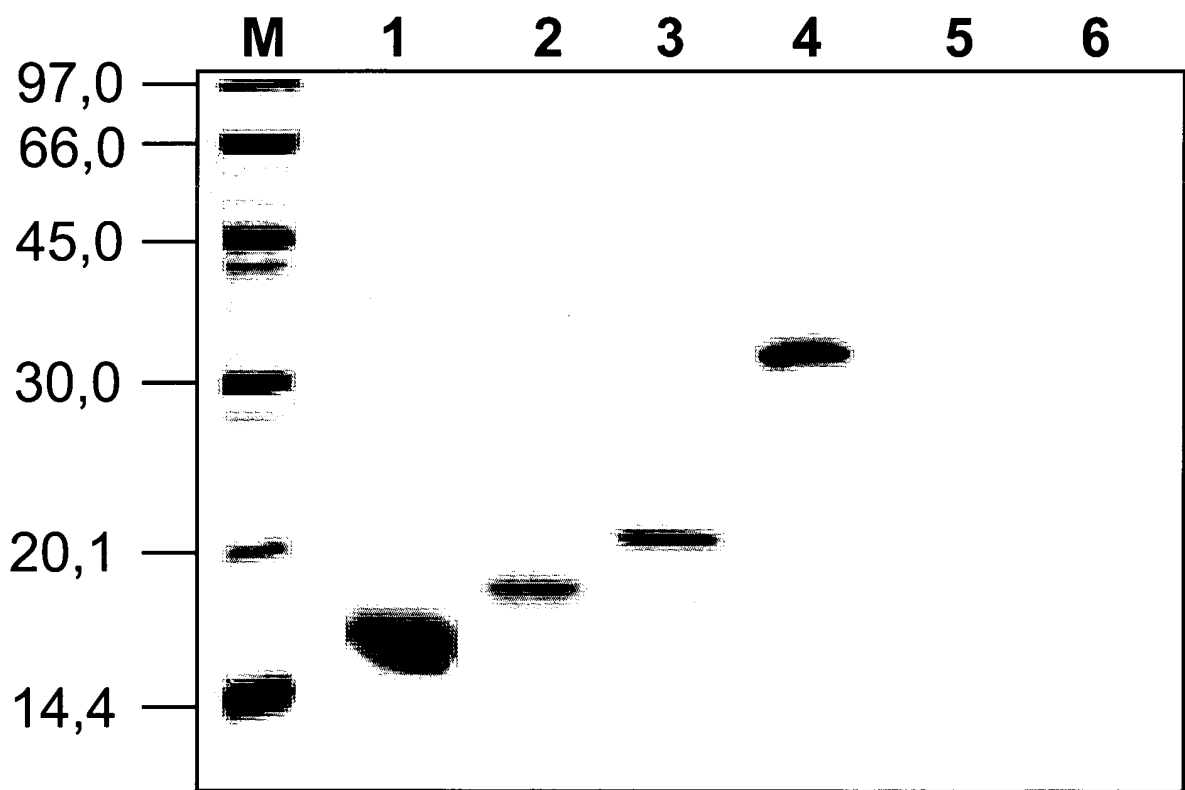


FIG. 11

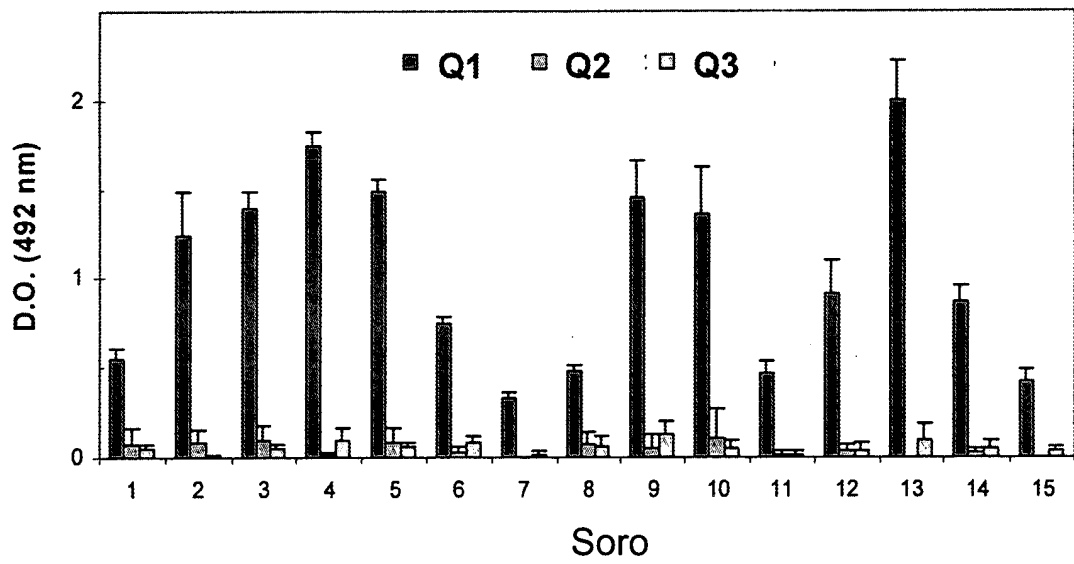


FIG. 12

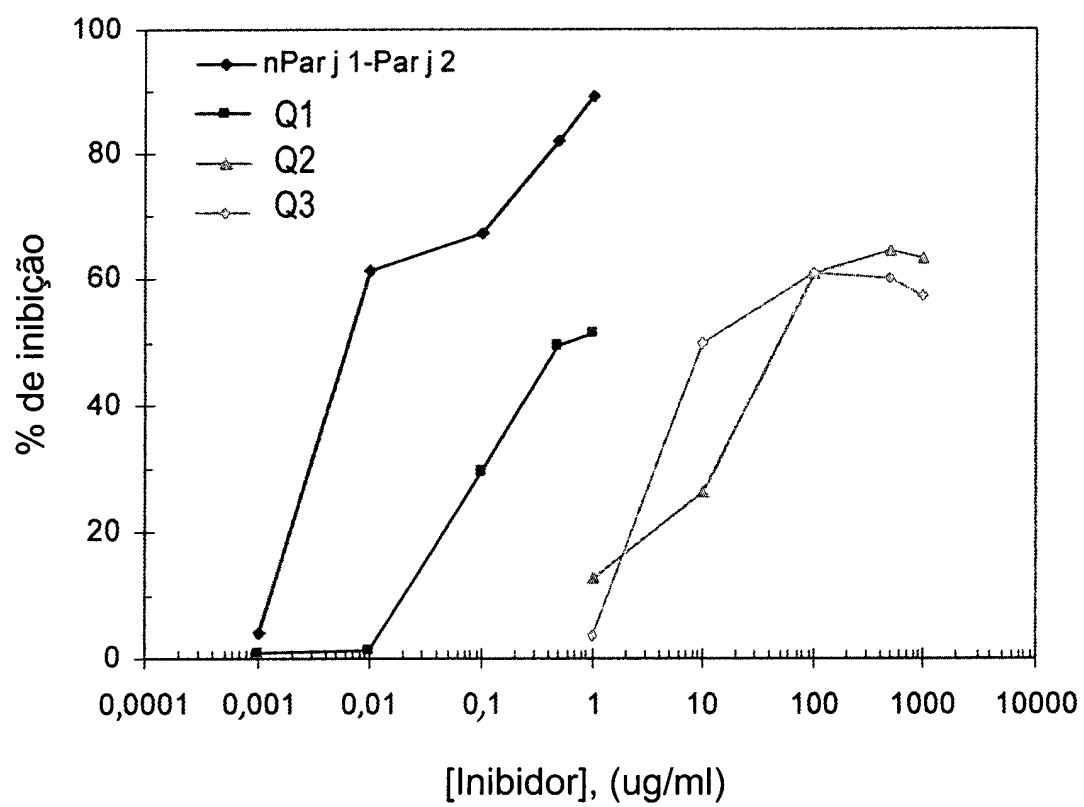


FIG. 13



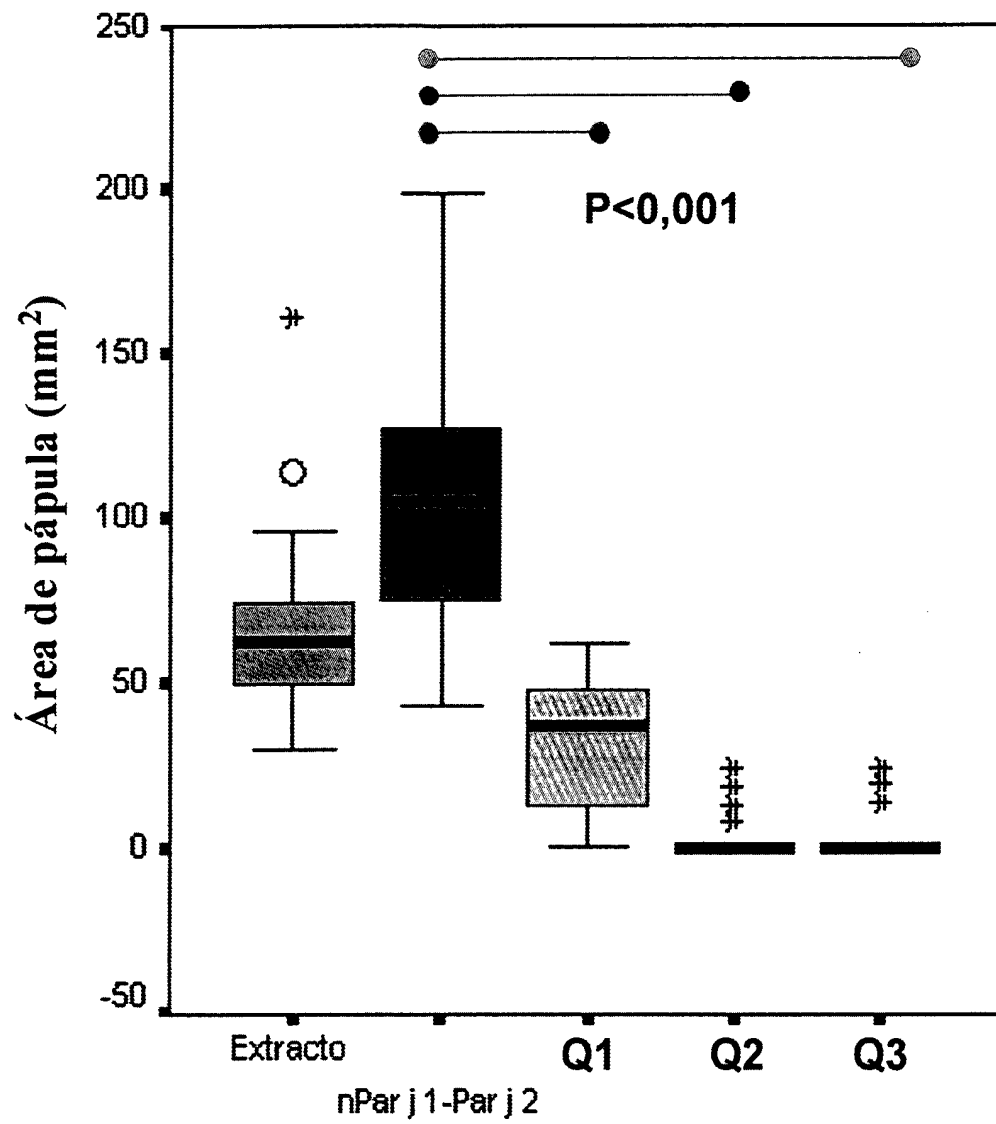


FIG. 14

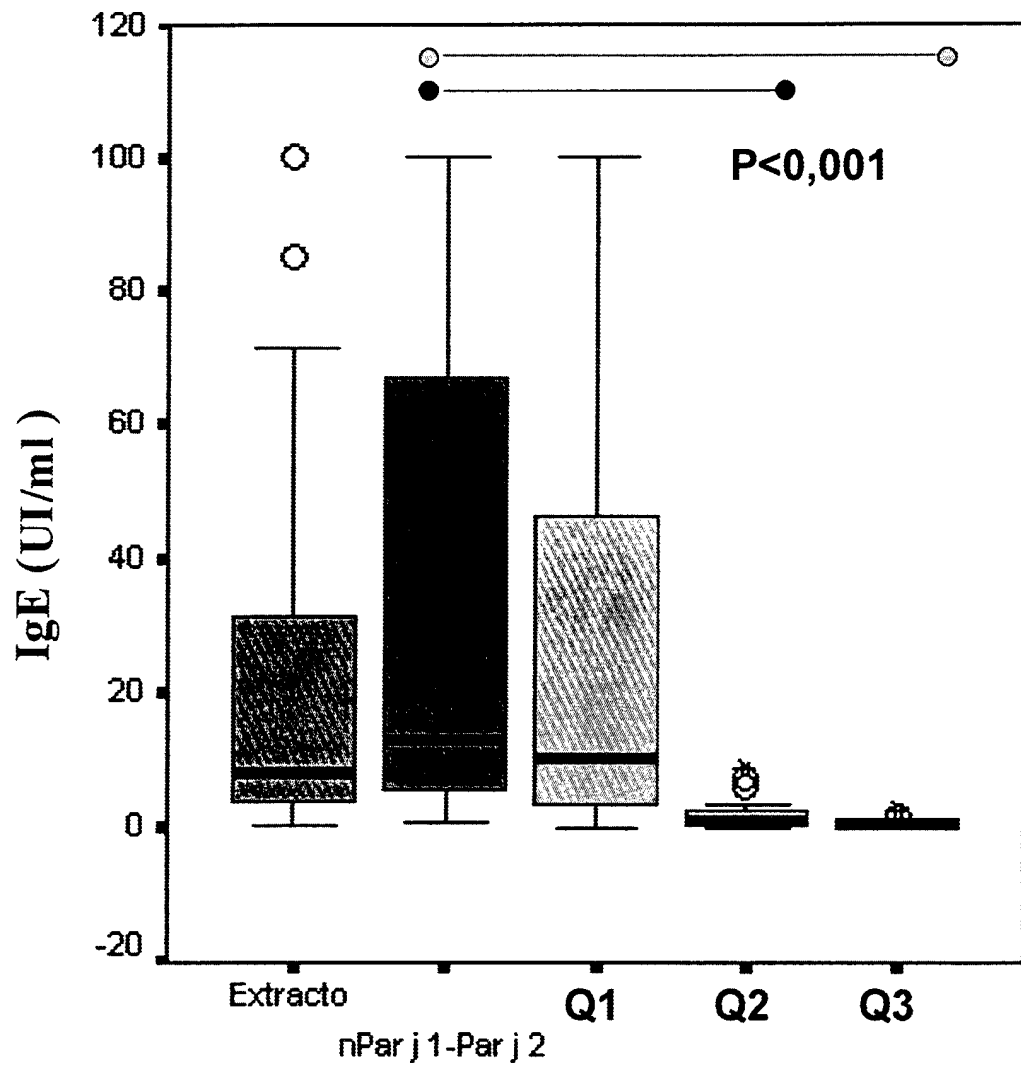


FIG. 15

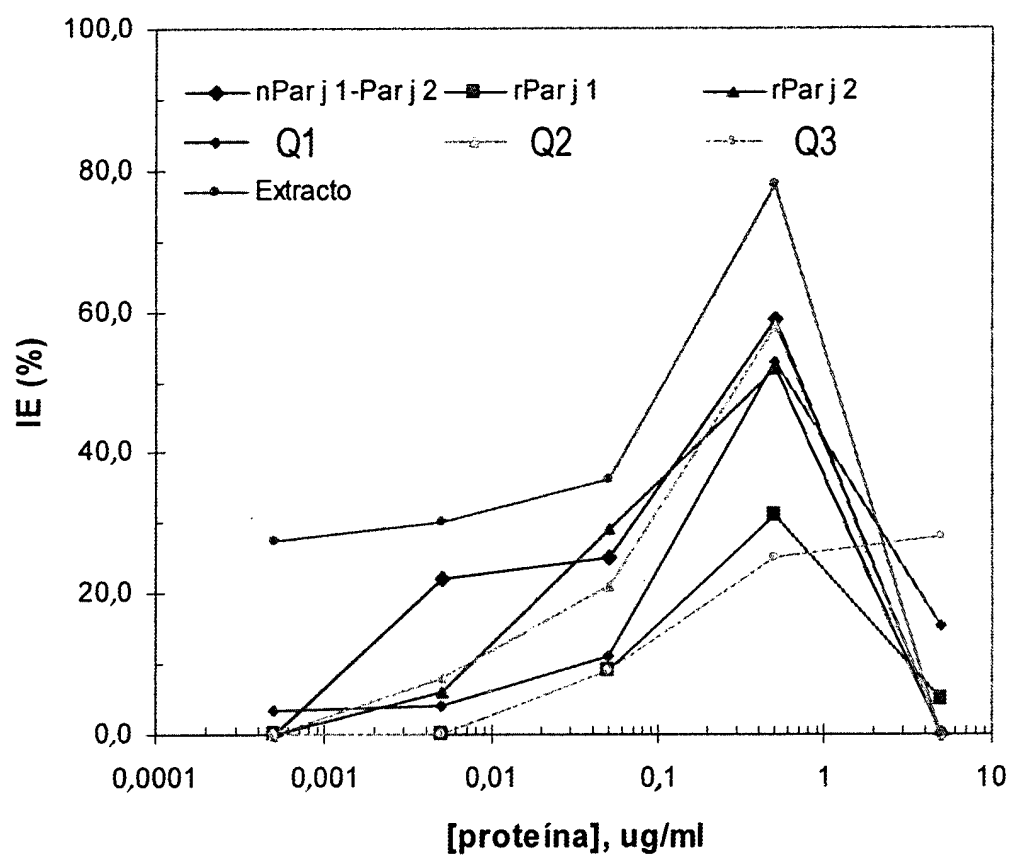


FIG. 16

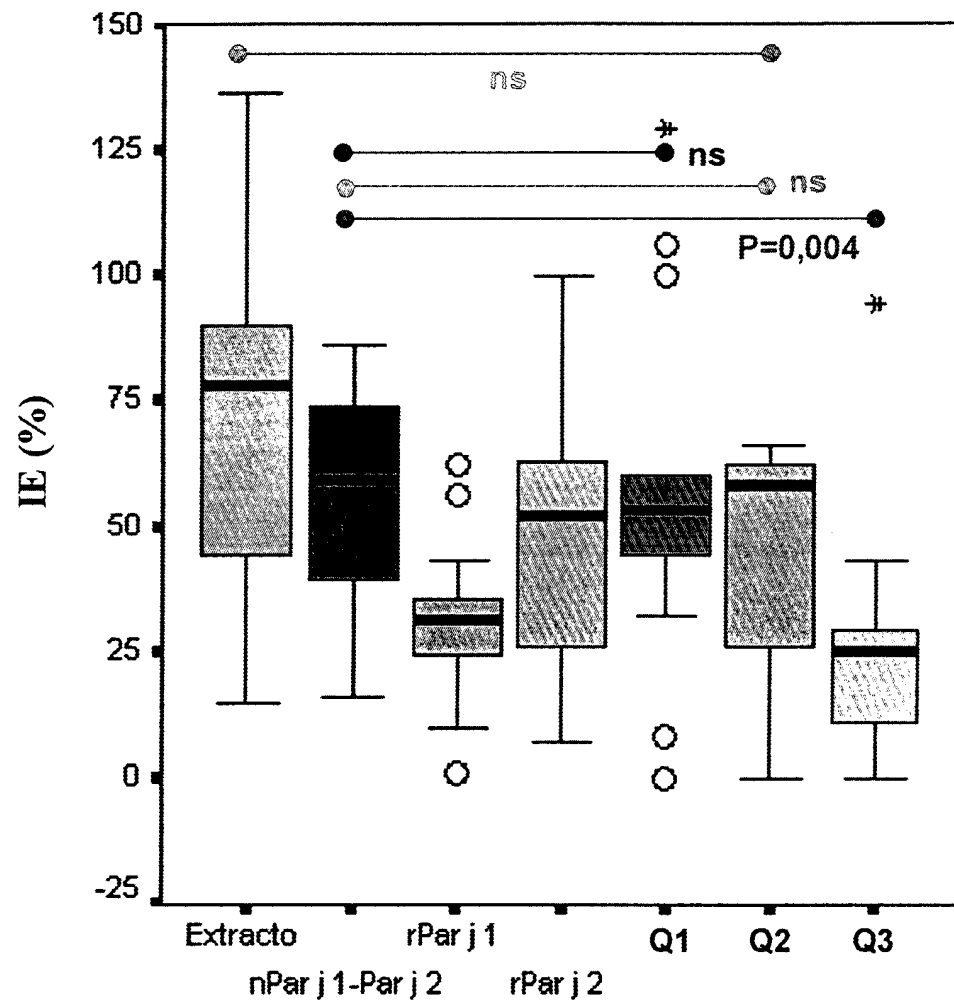


FIG. 17

**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-se métodos eficientes para purificar as proteínas quiméricas.  
15