

ÁCIDO NUCLEICO PARA TRATAR ALERGIA A LOS ÁCAROS

Campo Técnico

La presente invención se refiere a un ácido nucleico que se espera que sea útil como un ingrediente activo de una composición farmacéutica, por ejemplo, un ácido nucleico que se espera que sea útil para tratar alergia a los ácaros.

Antecedentes del Arte

La alergia a los ácaros es una enfermedad alérgica que se da en respuesta a alérgenos derivados de los ácaros. La enfermedad alérgica es causada por los siguientes pasos: 1) alérgenos que son tomados en un cuerpo son fagocitados por células que presentan antígenos y presentados a células T nativas, 2) células T nativas son diferenciadas en células Th2, 3) citosina tal como IL-4 es producida a partir de una célula inmune tal como la célula Th2, 4) células B producen IgE mediante IL-4, y 5) unión IgE de los alérgenos se unen a mastocitos. Se ha conocido que en pacientes con enfermedad alérgica, antagonismos entre inmunidad de tipo Th1 que involucra células Th1 que producen IFN- γ o similar e inmunidad de tipo Th2 que involucra células Th2 que producen IL-4 o similar alterna a dominante tipo Th2 que da como resultado respuesta inflamatoria inmune tipo Th2 (Middleton's Allergy Seventh edition Principles & Practice, 2009). Por lo tanto, IFN- γ se puede usar como un indicador de inmunidad tipo Th1, e IL-4 se puede usar como un indicador de inmunidad tipo Th2. Además, en ratones, IFN- γ produce un cambio de clase preferencial a isotipo IgG2a en células B activadas, mientras que suprime respuestas a todos los otros isotipos. Es decir, IgG2a también se puede usar como un indicador de inmunidad tipo Th1. Por ejemplo, se ha conocido que producción de IgG2a está promovida en ratones con déficit de IL-4 y que la producción de IgG2a se suprime en ratones con déficit de IFN- γ (Arthritis Res., 2002, Vol. 4, p. 54-58). También existe un informe respecto

que los anticuerpos producidos a partir de células B están involucrados en el mecanismo de acción de inmunoterapia de alérgenos. Por ejemplo, se ha conocido que en seres humanos, IgG antagoniza unión de IgE a un alérgeno para inhibir formación de complejo alérgeno–IgE y así inhibir liberación de histamina de mastocitos (J Allergy Clin Immunol., 2017, Vol. 140, p. 1485–1498).

Hasta ahora, desarrollo de múltiples inmunoterapias para alergia a los ácaros ha sido avanzado (J Allergy Clin Immunol., 2013, Vol. 132, p. 1322–1336; WO 2014/195803; Expert Rev Vaccines., 2014, Vol. 13, p. 1427–1438). Además, Der p 1, Der p 2, Der p 7, Der p 23, y similares han sido conocidos como alérgenos relacionados con la alergia a los ácaros (Documentos 1 y 2 de Patentes, y Documento 1 que no es Patente). Sin embargo, por ejemplo, inmunoterapia subcutánea (SCIT, por sus siglas en inglés) e inmunoterapia sublingual (SLIT, por sus siglas en inglés) tienen problemas tal como posibilidad de anafilaxis y largos períodos de tratamiento durante varios años.

Como una de las técnicas para vacunas de ácido nucleico, vacunas de ácido nucleico para tratar alergia usando proteínas de membrana asociadas a lisosoma (LAMP) han sido estudiadas. Además, un plásmido que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica que comprende LAMP–1, que es un miembro de la familia LAMP, y Cry J1 y/o Cry J2, que son alérgenos de *Cryptomeria japonica*, fue construido (Documento 3 de Patente 3 y Documento 2 que no es Patente). Se ha informado que dicho plásmido no produce liberación sistémica de alérgenos libres que producen anafilaxis, pero induce una respuesta inmune tipo Th1. Adicionalmente, se ha informado que un plásmido que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica que comprende LAMP–1 y alérgenos del maní Ara H1, Ara H2 y Ara H3 redujeron producción de IgE en un modelo de ratón (Documento 4 de Patente). En el campo de alergia a los ácaros, una vacuna que comprende un ácido nucleico que codifica una

proteína quimérica que comprende Der p 1 y un dominio de transmembrana de LAMP-1 y un dominio de dirección endosomal/lisosomal ha sido construido (Documento 5 de Patente y Documento 3 que no es Patente). Sin embargo, una vacuna de ácido nucleico para tratar alergia a los ácaros que comprende múltiples antígenos alérgenos de ácaros, y un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP-1 y un dominio de dirección endosomal/lisosomal no ha sido informada.

Arte Relacionado

Documento Patente

[Documento 1 Patente] WO 1988/010297

[Documento 2 Patente] WO 2007/124524

[Documento 3 Patente] WO 2013/187906

[Documento 4 Patente] WO 2015/200357

[Documento 5 Patente] WO 2004/019978

Documento que no es Patente

[Documento 1 que no es Patente] "Clinical & Experimental Allergy", (UK), 1995; 25: 416–422

[Documento 2 que no es Patente] "Journal of Immunology Research", (Egypt), 2016; Article ID 4857869

[Documento 3 que no es Patente] "Vaccine", (Países Bajos), 2006; 24 (29–30): 5762–5771

Síntesis de la Invención

Problemas a ser Resueltos por la Invención

Un objetivo de la presente invención es el de proporcionar un ácido nucleico que se espera que sea de utilidad para tratar alergia a los ácaros.

Medios para Resolver los Problemas

Como un resultado de investigación repetida con considerable creatividad en la preparación de ácidos nucleicos para tratar alergia a los ácaros, los inventores de la presente han preparado plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7 (Ejemplo 1), confirmado que una proteína quimérica se expresa del plásmido (Ejemplo 2), y encontrado que una respuesta inmune tipo Th1 es inducida en ratones a los que el plásmido es administrado (Ejemplos 3 y 4). Como resultado, un ácido nucleico que se espera que sea de utilidad para tratar alergia a los ácaros se proporciona, y así la presente invención ha sido cumplida.

Es decir, la presente invención se refiere a los siguientes [1] a [17].

[1] Un ácido nucleico que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica,

donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra–orgánulos de LAMP;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana;

y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio con dirección endosomal/lisosomal de LAMP.

[2] Un ácido nucleico que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica,

donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que

comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulos de LAMP;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 en este orden;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana;

y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio con dirección endosomal/lisosomal de LAMP.

[3] El ácido nucleico descrito en [1] o [2], donde el péptido señal es un péptido señal de LAMP.

[4] El ácido nucleico descrito en cualquiera de [1] a [3], donde el dominio de transmembrana es un dominio de transmembrana de LAMP.

[5] El ácido nucleico que se describe en cualquiera de [1] a [4], donde el péptido señal se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2, el dominio de estabilización intra-orgánulo se compone de una secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2, el dominio alérgeno es un dominio alérgeno que comprende Der p 1 compuesto por la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p 2 compuesto por la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p 23 compuesto por la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p 7 compuesto por la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2, el dominio de transmembrana se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, y el dominio de dirección endosomal/lisosomal se compone de la secuencia de

aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

[6] Un ácido nucleico que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2, donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th1 a un alérgeno seleccionado del grupo compuesto por Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7.

[7] Un ácido nucleico que comprende:

a) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2; o

b) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 10 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregados en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2, donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th1 a un alérgeno seleccionado entre el grupo que se compone por Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7.

[8] Un ácido nucleico que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2.

[9] Un vector de expresión que comprende:

el nucleico descrito en cualquiera de [1] a [8].

[10] Un vector de expresión que comprende:

el ácido nucleico descrito en [8].

[11] Una célula huésped transformada con el nucleico descrito en cualquiera de [1] a [8].

- [12] Un método para producir un ácido nucleico, que comprende:
cultivar una célula huésped transformada con el ácido nucleico descrito en cualquiera de [1] a [8].
- [13] Una composición farmacéutica, que comprende:
el vector de expresión que se describe en [10] y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- [14] La composición farmacéutica que se describe en [13], que es una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia a los ácaros.
- [15] Un método para prevenir o tratar alergia a los ácaros, que comprende:
administrar una cantidad profilácticamente efectiva o terapéuticamente efectiva del vector de expresión descrito en [10].
- [16] El vector de expresión descrito en [10], para usar en la prevención o tratamiento de alergia a los ácaros.
- [17] Uso del vector de expresión descrito en [10], para la elaboración de una composición farmacéutica para prevención o tratamiento de alergia a los ácaros.

Efectos de la Invención

El ácido nucleico de la presente invención se puede usar para prevención o tratamiento de alergia a los ácaros.

Breve Descripción de Dibujos

[Fig. 1] Fig. 1 es un diagrama que ilustra producción de IgG2a específica para Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7, que es inducida cuando el ácido nucleico de la presente invención se administra a un ratón. El eje vertical indica absorbancia a 450 nm, y el eje horizontal indica cada grupo de administración. Las líneas horizontales indican valores medios aritméticos.

[Fig. 2] Fig. 2 ilustra producción IFN- γ cuando células de bazo de ratones

a las cuales el ácido nucleico de la presente invención ha sido administrado fueron estimuladas con proteína Der p 1, proteína Der p 2, proteína Der p 7, o proteína Der p 23. El eje vertical indica la concentración de IFN- γ en el sobrenadante de cultivo (pg/mL), y el eje horizontal indica cada grupo de administración. Las líneas horizontales indican valores medios aritméticos. La línea de puntos indicada el valor de límite de detección más bajo (LLOD).

[Fig. 3] Fig. 3 ilustra producción IL-4 cuando células de bazo de ratones a las cuales el ácido nucleico de la presente invención ha sido administrado fueron estimuladas con proteína Der p 1, proteína Der p 2, proteína Der p 7, o proteína Der p 23. El eje vertical indica la concentración de IL-4 en el sobrenadante de cultivo (pg/mL), y el eje horizontal indica cada grupo de administración. Las líneas horizontales indican valores medios aritméticos. La línea de puntos indicada el valor de límite de detección más bajo (LLOD).

Realizaciones para Llevar a Cabo la Invención

En adelante, la presente invención será descripta en detalle.

Ácido nucleico de la presente invención

Ejemplos del ácido nucleico de la presente invención incluyen un ácido nucleico que tiene las siguientes características:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulos de LAMP,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que

comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana,
y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio con dirección endosomal/lisosomal de LAMP.

En la presente invención, el ácido nucleico es un polímero que está formado por polimerización de nucleótidos y se compone de una secuencia de nucleótidos con una longitud arbitraria. Los nucleótidos pueden incluir desoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o sus análogos. El ácido nucleico de la presente invención es ADN, ARN o su ácido nucleico modificado. En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es ADN.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico introducido dentro de un vector de expresión. En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico introducido dentro de un vector plásmido.

En la memoria descriptiva, “proteína quimérica” significa una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos en donde dos o más genes se fusionan usando tecnología de recombinación genética. El ácido nucleico de la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos que codifican proteína quimérica que comprende un péptido señal, un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP, un dominio alérgeno que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7, un dominio de transmembrana, y un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP en este orden (en adelante, denominado como “proteína quimérica referida a la presente invención”).

LAMP es una proteína bien conocida por aquellos con experiencia en el arte (J Biol Chem., 1991, Vol.266, p.21327–21330). En la presente memoria descriptiva, LAMP no está particularmente limitada, pero ejemplos de la misma

incluyen LAMP-1, LAMP-2, CD63/LAMP-3, DC-LAMP, y LIMP II, y homólogos, ortólogos, parálogos, variantes, y sus proteínas modificadas. En una realización de la presente invención, LAMP es LAMP-1. En la presente invención, un animal del cual proviene LAMP no está particularmente limitado, pero en una realización, LAMP es LAMP humana. En una realización, LAMP humana es LAMP-1 humana. Ejemplos de secuencia de aminoácidos de LAMP-1 humana incluyen una secuencia de aminoácidos en donde la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante aminoácidos números 1005 a 1040 de SEQ ID NO: 2 se une a una terminal C de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante aminoácidos números 1 a 380 de SEQ ID NO: 2.

La estructura general del péptido señal es bien conocida por aquellos con experiencia en el arte (Annu Rev Biochem., 2003, Vol. 72, p. 395 a 447). El péptido señal tiene una función de dirigir transporte y localización de una proteína. Como el péptido señal usado en la presente invención, cualquier péptido señal adecuado puede ser seleccionado siempre que tenga una función de dirigir transporte y localización de la proteína. En una realización, el péptido señal que se usa en la presente invención es un péptido señal de LAMP. En una realización, el péptido señal de LAMP usado en la presente invención es un péptido señal de LAMP-1.

En una realización, el péptido señal usado en la presente invención se compone de la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 3 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregado en la secuencia de aminoácidos

de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2.

El término de “identidad” en la presente memoria descriptiva significa un valor de Identidad obtenido usando un EMBOSS Needle (Nucleic Acids Res., 2015, Vol.43, p.W580–W584; https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) con un parámetro preparado por defecto. Los parámetros anteriores son de la siguiente forma.

Penalidad de Brecha Abierta = 10

Penalidad Extendida de Brecha = 0,5

Matriz = EBLOSUM62

Penalidad de Brecha Final = falso

En una realización, el péptido señal usado en la presente invención se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2.

La secuencia del dominio de estabilización intra-órgánulo de LAMP es bien conocido por aquellos con experiencia en el arte (WO 2013/187906). EL dominio de estabilización intra-órgánulo de LAMP tiene una función de protección del dominio alérgeno de proteasas, pH bajo, y otras sustancias y condiciones que desestabilizan una proteína. Como el dominio de estabilización intra-órgánulo de LAMP usado en la presente invención, cualquier dominio de estabilización intra-órgánulo adecuado de LAMP puede ser seleccionado siempre que tenga una función de protección del dominio alérgeno de proteasas, pH bajo, y otras sustancias y condiciones que desestabilizan una proteína. En una realización, el dominio de estabilización intra-órgánulo de LAMP usado en la presente invención es un dominio de estabilización intra-órgánulo de LAMP-1.

En una realización, el dominio de estabilización intra-órgánulo de LAMP usado en la presente invención se compone de la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 10 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregado en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el dominio de estabilización intra-órgano usado en la presente invención se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2.

El dominio alérgeno usado en la presente invención incluye Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 como alérgenos. Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 son alérgenos que pueden ser observados en ácaros (WO 1988/010297; WO 2007/124524; y Clin Exp Allergy., 1995, Vol. 25, p. 416–422). Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 usados en la presente invención pueden ser sus variantes siempre que tengan antigenicidad. La antigenicidad de cualquier proteína puede ser confirmada, por ejemplo, observando que la administración a un animal provoque producción de anticuerpo o respuesta de célula T a esa proteína (Bioanalysis., 2012, Vol. 4, p. 397–406). En una realización, Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 usadas en la presente invención carecen del péptido señal.

En una realización, Der p 1 se compone de la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2; o 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 10 aminoácidos

son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregado en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, Der p 1 se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, Der p 2 se compone de la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 10 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregado en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, Der p 2 se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, Der p 23 se compone de la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 10 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregado en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, Der p 23 se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, Der p 7 se compone de la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 10 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregado en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, Der p 7 se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el dominio alérgeno usado en la presente invención comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 en cualquier orden. Además, en una realización, el dominio alérgeno usado en la presente invención comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 en este orden.

En una realización, el dominio alérgeno usado en la presente invención se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 1002 de SEQ ID NO: 2.

La estructura general del dominio de transmembrana es bien conocida por aquellos con experiencia en el arte (Annu Rev Biochem., 2007, Vol. 76, p. 125 a 140). El dominio de transmembrana tiene una función de anclar proteínas a membranas biológicas. Como el dominio de transmembrana usado en la presente invención, cualquier proteína de dominio de transmembrana adecuada puede ser seleccionada siempre que tenga una función de anclar proteínas a membranas biológicas. En una realización, el dominio de transmembrana usado en la presente invención es un dominio de transmembrana de LAMP. En una realización, el dominio de transmembrana de LAMP usado en la presente

invención es un dominio de transmembrana de LAMP-1.

En una realización, el dominio de transmembrana usado en la presente invención se compone de la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 2 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregado en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el dominio de transmembrana usado en la presente invención se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2.

La estructura del dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP es bien conocido por aquellos con experiencia en el arte (WO 1994/017192). El dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP tiene una función de transportar una proteína a lisosoma. Como el dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP usado en la presente invención, cualquier dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP puede ser seleccionado siempre que tenga una función de transportar la proteína a lisosoma. En una realización, dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP usado en la presente invención es un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP-1.

En una realización, el dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP usado en la presente invención se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en donde 1 aminoácido es suprimido, sustituido, insertado y/o agregado en la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040

de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP usado en la presente invención se compone de una secuencia de aminoácidos en un rango de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En la proteína quimérica relacionada con la presente invención, el péptido señal, el dominio de estabilización intra-órgánulo de LAMP, cada alérgeno comprendido en el dominio alérgeno, el dominio transmembrana, y el dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP puede ser directamente unido o puede ser indirectamente unido mediante un péptido conector. El péptido conector a ser usado puede ser apropiadamente seleccionado por aquellos con experiencia en el arte. En una realización, el péptido conector se compone de 10 o menos aminoácidos. En una realización, el péptido conector usado entre el dominio de estabilización intra-órgánulo de LAMP y el dominio alérgeno, entre alérgenos, y entre el dominio alérgeno y el dominio de transmembrana es un péptido conector seleccionado entre el grupo compuesto por LeuGlu, GlyGlyGlyGly, y GluPheThr.

En una realización, el péptido conector usado entre el dominio de transmembrana y el dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP es un péptido conector compuesto por la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1029 a 1036 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de LAMP,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización

intra-orgánulos de LAMP,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana de LAMP, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio con dirección endosomal/lisosomal de LAMP.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de LAMP-1,

una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de estabilización intra-orgánulos de LAMP-1,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana de LAMP-1, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio con dirección endosomal/lisosomal de LAMP-1.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de

nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se

compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido conector que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1029 a 1036 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal,
una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulos de LAMP,
una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 en este orden,
una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana,
y
una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio con dirección endosomal/lisosomal de LAMP.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de LAMP,
una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulos de LAMP,
una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 en este orden,
una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana de LAMP, y
una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio con dirección endosomal/lisosomal de LAMP.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que

codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de LAMP-1,

una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de estabilización intra-orgánulos de LAMP-1,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 en este orden,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana de LAMP-1, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP-1.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la

secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2 en este orden,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2,

Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2 en este orden,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido conector que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1029 a 1036 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

El ácido nucleico de la presente invención no está particularmente limitado siempre que codifique la proteína quimérica relacionada con la presente invención, y tenga una acción de inducir inmunidad tipo Th1 con respecto al alérgeno seleccionado entre el grupo compuesto por Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7, cuando el ácido nucleico se administra a un ser humano o un animal. Uno puede confirmar si un ácido nucleico tiene o no una acción de inducir inmunidad tipo TH1, cuando el ácido nucleico se administra a un humano o un animal, por el método descrito en, por ejemplo, Ejemplo 3 y/o Ejemplo 4. Además, el ácido nucleico de la presente invención puede ser un ácido nucleico que tiene una acción de inducir respuesta inmune dominante de célula Th1, cuando el ácido nucleico se administra a un humano o un animal. Uno puede confirmar si un cierto ácido nucleico tiene o no una acción de inducir respuesta inmune dominante de célula Th1, cuando el ácido nucleico se administra a un humano o un animal, por el método descrito en, por ejemplo, Ejemplo 4.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2, o una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 10 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregados en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2,

donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th1 al

alérgeno seleccionado entre el grupo que se compone por Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2 o

b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 10 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregados en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2, donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th1 a un alérgeno seleccionado del grupo compuesto por Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2, donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th1 para Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es el siguiente ácido nucleico:

a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2 o

b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos en donde 1 a 10 aminoácidos son suprimidos, sustituidos, insertados y/o agregados en la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2, donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th1 a Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención son los siguiente ácidos nucleicos:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2 significa la secuencia de nucleótidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 1.

Basado en la secuencia de nucleótidos, el ácido nucleico de la presente invención puede ser fácilmente preparado por aquellos con experiencia en el arte usando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, el ácido nucleico de la presente invención puede ser sintetizado usando métodos de síntesis de genes conocidos en el arte. Como dicho método de síntesis de genes, varios métodos conocidos por aquellos con experiencia en el arte tal como un método para sintetizar un gen anticuerpo descrito en WO 90/07861 se puede usar.

Una vez que está sintetizado, el ácido nucleico de la presente invención puede ser fácilmente replicado por aquellos con experiencia en el arte usando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, el ácido nucleico de la presente invención puede ser replicado por el método que se describe más tarde en Método para producir el ácido nucleico de la presente invención y ácido nucleico

que puede producirse por el método.

Vector de expresión de la presente invención

El vector de expresión de la presente invención incluye un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la presente invención.

El vector de expresión usado para expresar una proteína quimérica del ácido nucleico de la presente invención no está particularmente limitado siempre que pueda expresar la proteína quimérica del ácido nucleico de la presente invención en las células animales. En una realización, el vector de expresión usado para expresar una proteína quimérica del ácido nucleico de la presente invención es un vector de expresión que puede ser usado para expresar la proteína quimérica en un cuerpo humano. Ejemplos del vector de expresión usado en la presente invención incluyen un vector plásmido, un vector viral (por ejemplo, adenovirus, retrovirus, virus adeno-asociado) y similares. En una realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” significa el vector de plásmidos.

El vector de expresión de la presente invención incluye puede comprender un promotor operativamente unido al ácido nucleico de la presente invención. Ejemplos del promotor para expresar la proteína quimérica del ácido nucleico de la presente invención en células animales incluyen un promotor que proviene de virus tal como CMV (citomegalovirus), RSV (virus respiratorio sincitial), y SV40 (virus del simio 40), un promotor de actina, promotor 1 α del EF (factor de elongación), un promotor de choque térmico y similares. En una realización, el promotor comprendido en el vector de expresión de la presente invención es un promotor de CMV. El vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de inicio y un codón de terminación. En este caso, una

secuencia mejoradora, una región no traducida, una unión de empalme, un sitio de poliadenilación, o una unidad replicable pueden estar incluidos.

En una realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-órgano de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido conector que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1029 a 1036 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos

de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2 en este orden,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende el siguiente ácido nucleico:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2 en este orden,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido conector que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1029 a 1036 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección

endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2.

En una realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 1.

En una realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 3.

Célula huésped de la presente invención

La célula huésped de la presente invención incluye una célula huésped transformada con el ácido nucleico de la presente invención. En una realización, la célula huésped de la presente invención es una célula huésped transformada con el vector de expresión de la presente invención. En una realización, la célula huésped de la presente invención es una célula huésped transformada con el vector de expresión de la presente invención que es un vector de plásmidos.

La célula huésped transformada con el ácido nucleico de la presente invención no está particularmente limitado, y cualquier célula conocida en el arte puede ser seleccionada siempre que sea una célula que puede ser usada para replicación de ácido nucleico.

Ejemplos de la célula huésped que se puede usar para replicación de ácido nucleico incluye varias células tal como células naturales o células establecidas artificialmente comúnmente usadas en el campo técnico de la presente invención

(por ejemplo, células animales (por ejemplo, células CHOK1SV), células de insectos (por ejemplo, Sf9), bacterias (por ejemplo, *E. coli*), y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*)). En una realización, se puede usar *E. coli* como una célula huésped. La propia transformación puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos.

Método para producir el ácido nucleico de la presente invención y ácido nucleico que puede producirse por el método.

Ejemplos del método para producir el ácido nucleico de la presente invención incluye un método para producir un ácido nucleico o un vector de expresión, que comprende un paso de cultivar células huésped transformadas con el ácido nucleico o el vector de expresión de la presente invención. En una realización, el método para producir el ácido nucleico de la presente invención comprende un paso de cultivar la célula huésped transformada con el ácido nucleico de la presente invención, y replicar el ácido nucleico de la presente invención. En una realización, el método para producir el ácido nucleico de la presente invención comprende un paso de cultivar la célula huésped transformada con el vector de expresión de la presente invención, y replicar el vector de expresión de la presente invención.

En una realización, la célula huésped usada en el método para producir el ácido nucleico de la presente invención es *E. coli*. Para cultivo de *E. coli*, un medio de cultivo apropiado tal como medio LB, medio M9, medio Terrific Caldo, medio SOB, medio SOC, o medio 2 × YT pueden ser seleccionados. Además, el cultivo de *E. coli* puede ser llevado a cabo en un entorno donde carbono (no está particularmente limitado siempre que sea un compuesto carbono asimilable; por ejemplo, polioles tal como glicerina, o ácidos orgánicos tal como ácido pirúvico, ácido succínico, o ácido cítrico), nitrógeno (no está particularmente limitado siempre que sea un compuesto nitrógeno que puede ser usado por *E. coli*; por

ejemplo, peptona, extracto de carne, extracto de levadura, hidrolisato de caseína, extracto alcalino de harina de soja, o amoníaco o una de sus sales), inorgánicos y iones inorgánicos (no está particularmente limitado, y sus ejemplos incluyen fosfato, carbonato, sulfato, magnesio, calcio, potasio, hierro, manganeso y zinc), una fuente de vitamina, y un agente antiespumante son controlados a una concentración apropiada. Además, el control de cultivo incluye control de parámetros tal como pH, temperatura, agitación, flujo de aire y oxígeno disuelto. En una realización, las condiciones de cultivo incluyen pH de 6,7 hasta 7,5, temperatura de 20°C hasta 37°C, y una velocidad de agitación de 200 hasta 300 rpm.

El método para producir el ácido nucleico de la presente invención puede comprender un paso de obtener lisado a partir de soluciones de cultivo recolectadas. El lisado puede ser obtenido, por ejemplo, tratando las soluciones de cultivo recolectadas con un método de lisis alcalina o método de ebullición. También, el paso de obtener el lisado puede incluir un paso de filtración estéril de un material lisado final.

El método para producir el ácido nucleico de la presente invención puede además comprender un paso de purificar ácido nucleico o un vector de expresión del lisado. Cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrofóbica se pueden usar para purificar el ácido nucleico o el vector de expresión del lisado. El paso de purificar el ácido nucleico o el vector de expresión del lisado puede incluir un paso de ultrafiltración y/o diafiltración. Además, como un tratamiento final del paso de purificación, un paso de filtración estéril puede estar incluido.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico producido por el método para producir el ácido nucleico de la presente invención.

En una realización, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión producido por el método para producir el ácido nucleico de la presente invención.

Composición farmacéutica de la presente invención

La composición farmacéutica de la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el vector de la presente invención y el excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención puede ser preparada por un método generalmente usado con un excipiente generalmente usado en el campo, es decir, un excipiente farmacéutico, un portador farmacéutico o similar. Ejemplos de formas de dosificación de estas composiciones farmacéuticas incluyen, por ejemplo, agentes parenterales tal como inyecciones y agentes de goteo, que se pueden administrar mediante administración intravenosa, administración subcutánea, administración intradérmica, y administración intramuscular. En el proceso de formulación, excipientes, portadores, aditivos, y similares pueden ser usados de acuerdo con estas formas de dosificación dentro del rango farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico o el vector de expresión de la presente invención y el excipiente farmacéuticamente aceptable.

Mientras que la cantidad de administración del ácido nucleico de la presente invención o el vector de expresión varía dependiendo del grado de síntomas y edad del paciente, y la forma de dosificación de la preparación usada, por ejemplo, la cantidad en un rango de 0,001 mg/kg hasta 100 mg/kg pueden

usarse. Además, es posible preparar una formulación agregando el ácido nucleico o el vector de expresión de la presente invención en una cantidad que corresponde a dicha cantidad de administración.

La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como un agente para prevenir o tratar alergia provocada por un alérgeno seleccionado entre Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como un agente para prevención o tratamiento de alergia a los ácaros.

La presente invención incluye una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende el ácido nucleico de la presente invención. Además, la presente invención incluye un método para prevenir o tratar alergia, que comprende administrar una cantidad profilácticamente efectiva o terapéuticamente efectiva del ácido nucleico de la presente invención. La presente invención también incluye el ácido nucleico de la presente invención para usar para prevenir o tratar alergia. Además, la presente invención incluye el uso del ácido nucleico de la presente invención para la elaboración de una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia. En una realización, la alergia anteriormente descrita es alergia provocada por un alérgeno seleccionado entre el grupo que se compone por Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7. Además, en una realización, la alergia anteriormente descrita es alergia que afecta un paciente con alergia que tiene un anticuerpo que responde a un alérgeno seleccionado entre el grupo que se compone por Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7. Además, en una realización, la alergia anteriormente descrita es alergia a los ácaros.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende el

siguiente ácido nucleico y un excipiente farmacéuticamente aceptable:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende el siguiente ácido nucleico y un excipiente farmacéuticamente aceptable:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-órgano de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgico que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2 en este orden,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende un siguiente ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que

codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2 y un excipiente farmacéuticamente.

La presente invención incluye una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende el vector de expresión de la presente invención. Además, la presente invención incluye un método para prevenir o tratar alergia, que comprende administrar una cantidad profilácticamente efectiva o terapéuticamente efectiva del vector de expresión de la presente invención. La presente invención también incluye el vector de expresión de la presente invención para usar para prevenir o tratar alergia. Además, la presente invención incluye el uso del vector de expresión de la presente invención para la elaboración de una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia. En una realización, la alergia anteriormente descrita es alergia provocada por un alérgeno seleccionado entre el grupo que se compone por Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7. Además, en una realización, la alergia anteriormente descrita es alergia que afecta un paciente con alergia que tiene un anticuerpo que responde a un alérgeno seleccionado entre el grupo que se compone por Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7. Además, en una realización, la alergia anteriormente descrita es alergia a los ácaros.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende un vector de expresión que comprende el siguiente ácido nucleico y un excipiente farmacéuticamente aceptable:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se

compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende un vector de expresión que comprende el siguiente ácido nucleico y un excipiente farmacéuticamente aceptable:

un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden:

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que se

compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 27 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra-orgánulo de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 28 a 380 de SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2, Der p2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2, Der p3 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2, y Der p7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2 en este orden,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos específicos se proporcionan en la presente a modo de referencia a fin de obtener mayor entendimiento de la presente invención; sin embargo,

estos ejemplos tienen fin ilustrativo y la presente invención no se encuentra limitada a los mismos.

Ejemplos

[Ejemplo 1: Construcción de plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7]

Plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7 se compone de la secuencia de nucleótidos que se muestra mediante SEZ ID NO: 3 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden (es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que se compone de la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2): una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de LAMP–1 (la secuencia de aminoácidos de 1 a 27 de SEQ ID NO: 2), una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intra–orgánulo de LAMP–1 (la secuencia de aminoácidos de 28 a 380 de SEQ ID NO: 2), una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgenos que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 en este orden (la secuencia de aminoácidos de 383 a 1002 de SEQ ID NO: 2), una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de transmembrana de LAMP–1 (la secuencia de aminoácidos de 1006 a 1028 de SEQ ID NO: 2), y una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de dirección endosomal/lisosomal de LAMP–1 (la secuencia de aminoácidos de 1037 a 1040 de SEQ ID NO: 2)) fue construido. El plásmido puede ser construido insertando ADN sintético, en secuencia de reconocimiento donde Xho I se agrega a extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de nucleótidos de 1147 a 3006 de SEQ ID NO: 1 (una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p 1, Der p 2, Der p 23, y Der p 7 en este orden) y secuencia de reconocimiento Eco RI se agrega al extremo 3' de la secuencia de ácido

nucleico, en el sitio Eco RI–Xho I del plásmido que se muestra mediante SEQ ID NO: 6 de la Patente Japonesa No. 5807994. *E. coli* fue transformada con el plásmido de constructo LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7 y cultivado en un medio de cultivo. El plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7 amplificado se obtuvo mediante un método de centrifugación de la solución cultivo y recolección de las células en base a una extracción de plásmido y método de purificación (método miniprep).

[Ejemplo 2: Expresión de proteína quimérica LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7]

Expresión *in vitro* de la proteína quimérica LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7 (una proteína quimérica que se compone de una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 1 (es decir, la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2)) usando línea celular 293T derivada de riñón fetal humano fue evaluada.

(1) Cultivo celular e introducción de plásmido

Células 293 T derivadas de riñón fetal humano (Thermo Fisher Scientific, Cat. HCL4517) fueron sembradas en placas de 6 receptáculos (Cat. 3810–006 fabricada por IWAKI) a 3×10^5 células/receptáculo en medio D–MEM (Sigma–Aldrich, Cat. D5796) que contiene 10% suero bovino fetal (Hyclone, Cat. SH30070. 03) y penicilina–estreptomicina en proceso de 100 diluciones (Thermo Fisher Scientific, Cat. 15070063). Después de cultivar durante la noche de las células sembradas a 37°C en la presencia de 5% CO₂, una solución mezcla que tiene una proporción de plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7: Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific, Cat. 11668027) = 2,5 (μg) : 10 (μL) se agregó. Después de cultivo durante la noche de las células sembradas a 37°C en la presencia de 5% CO₂ nuevamente, el medio se extrajo y se lavó una vez

con PBS, y luego se realizó inmunotransferencia [western blotting].

(2) Western blotting

Pretratamiento: Células fueron lisadas en tampón RIPA (Pierce, Cat. 89900) que contiene un inhibidor de proteasa (Sigma–Aldrich, Cat. 1873580), y la concentración de proteína del sobrenadante después de centrifugación a 20.000 x g durante 5 minutos fue medida. A 5 µL del lisado celular diluido con PBS que contiene inhibidor de proteasa, 5 µL de tampón de muestreo LDS (Thermo Fisher Scientific, Cat. NP0007) que contiene 100 mM DTT se agregó de modo que la concentración de proteína sería 200 µg/mL, y tratada con calor a 70°C durante 10 minutos.

SDS–PAGE: Usando tampón de procesamiento NuPAGE (Marca registrada) MOPS SDS (Thermo Fisher Scientific, Cat. NP0001) y NuPAGE (Marca registrada) 4% - 12% Bis–Tris Gel (Thermo Fisher Scientific, Cat. NP0323), el lisado pretratado antes mencionado se aplicó al gel y se realizó electroforesis a un voltaje constante de 200 V.

Transferencia (Blotting): Se realizó blotting poniendo membrana PVDF (Thermo Fisher Scientific, Cat. LC2005) en contacto con el gel después de SDS–PAGE, y electrificando durante 90 minutos a 180 mA en Módulo XCell II Blot (Thermo Fisher Scientific, Cat. EI9051) relleno con Tampón de Transferencia NuPAGE (Marca registrada) (Thermo Fisher Scientific, Cat. NP0006) que contiene 20% de metanol.

Bloqueador: La membrana después de electrificación se sometió a inmersión en Bloqueador Uno (Nacalai Tesque, Cat. 03953–95) y se agitó a temperatura ambiente durante una hora.

Anticuerpo primario: Anticuerpo anti–LAMP–1 humanos (Sino biological, Cat. 11215–RP01) se agregó a un proceso de 1000 diluciones en tampón TBS Tween–20 (Thermo Fisher Scientific, Cat. 28360) que contiene 10% de

Bloqueador Uno. La membrana se sometió a inmersión en este tampón y se agitó durante la noche a 4°C.

Anticuerpo secundario: La membrana se lavó con tampón TBS Tween-20. Anti IgG de conejo (cadena H + L) pAb-HRP (MBL, Cat. 458) se agregó a un proceso de 3000 diluciones en tampón TBS Tween-20 que contiene 10% de Bloqueador Uno. La membrana se sumergió en este tampón y se agitó a temperatura ambiente durante una hora.

Detección: La membrana se lavó con tampón TBS Tween-20. La membrana se sumergió en reactivo de detección de western blotting cebador ECL (GE Healthcare, Cat. RPN2232), y se detectó una imagen con LumiVision PRO 400EX (Aisin Seiki Co., Ltd.). En la imagen, una banda que responde al anticuerpo anti LAMP-1 humano que corresponde a la proteína quimérica fue detectada.

Como el resultado de los ensayos anteriormente mencionados, se confirmó que proteína quimérica LAMP-Der p 1-Der p 2-Der p 23-Der p 7 en la célula fue expresada introduciendo el plásmido LAMP-Der p 1-Der p 2-Der p 23-Der p 7 a la línea celular 293T derivada de riñón fetal humano.

[Ejemplo 3: Inducción de producción IgG2a mediante administración de plásmido LAMP-Der p 1-Der p 2-Der p 23-Der p 7]

Se realizó evaluación de inducción de producción de anticuerpo *in vivo*. En ocho ejemplos en cada grupo, 25 µL de una solución PBS que contiene 50 µg de plásmido LAMP-Der p 1-Der p 2-Der p 23-Der p 7 fue administrada en la oreja de ratones hembra BALB/c de 7 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) al inicio de administración intradérmica tres veces cada semana (Día 0, 7 y 14). Una semana después de administración final, se tomó sangre y se obtuvieron muestras de plasma (Día 21). Como un control, plásmido LAMP-Der p 23-Der p 7-Der p 2-Der p 1 (un vector de expresión que comprende un ácido

nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1 a 380 de SEQ ID NO: 2 (en adelante, denominada terminal N de LAMP-1 en Ejemplos 3 y 4), una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende Der p 23 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 732 a 800 de SEQ ID NO: 2 (en adelante, denominada dominio Der p 23 en Ejemplos 3 y 4), Der p 7 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 805 a 1002 de SEQ ID NO: 2 (en adelante, denominada dominio Der p 7 en Ejemplos 3 y 4), Der p 2 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 599 a 727 de SEQ ID NO: 2 (en adelante, denominada dominio Der p 2 en Ejemplos 3 y 4), y Der p 1 que se compone de la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 383 a 594 de SEQ ID NO: 2 (en adelante, denominada dominio Der p 1 en Ejemplos 3 y 4) en este orden, y una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de aminoácidos números 1006 a 1040 de SEQ ID NO: 2 (en adelante, denominada terminal C de LAMP-1 en Ejemplos 3 and 4)); una mezcla de plásmido LAMP-Der p 1-Der p 2 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica terminal N de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende dominio Der p 1 y dominio Der p 2 en este orden, y una secuencia de nucleótidos que codifica terminal C de LAMP-1) y plásmido LAMP-Der p 23-Der p 7 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica terminal N de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica dominio alérgeno que

comprende dominio Der p 23 y dominio Der p 7 en este orden, y una secuencia de nucleótidos que codifica terminal C de LAMP-1); y una mezcla de plásmido LAMP-Der p 1 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende unas secuencias de nucleótidos que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica terminal N de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende dominio Der p 1, y una secuencia de nucleótidos que codifica terminal C de LAMP-1), plásmido LAMP-Der p 2 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica terminal N de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende dominio Der p 2, y una secuencia de nucleótidos que codifica terminal C de LAMP-1), plásmido LAMP-Der p 7 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica terminal N de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende dominio Der p 7, y una secuencia de nucleótidos que codifica terminal C de LAMP-1), y plásmido LAMP-Der p 23 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica terminal N de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio alérgeno que comprende dominio Der p 23, y una secuencia de nucleótidos que codifica terminal C de LAMP-1) fueron preparados. Cada plásmido control puede ser preparado por el mismo método que el método que se describió en Ejemplo 1. Se administró a ratones, 25 μ L de solución PBS que

contiene 50 μg del plásmido anterior o la mezcla de plásmido anterior o 25 μL de PBS. Se midió una titulación de anticuerpo mediante ELISA usando muestra de plasma a un proceso de 100 o 1000 diluciones, y se midió la absorbancia a 450 nm. Mediciones ELISA fueron realizadas en base a un método ELISA general usando F96 MAXISORP NUNC–IMMUNO PLATE (Nunc, Cat. 439454) como placa de ensayo. Der p 1 que es una proteína purificada (Indoor biotechnologies, NA–DP1–1, lote: 38052), Der p 2 que es una proteína purificada (Indoor biotechnologies, NA–DP2–1, lote: 36118), Der p 7 que es una proteína recombinante purificada (Indoor biotechnologies, RP–DP7–1, lote: 34033), o Der p 23 que es una proteína recombinante purificada (Sysmex, UniProtKB: A0A0K2DQU8) se prepara a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con PBS, agregado a 50 $\mu\text{L}/\text{receptáculo}$ y se deja reposar durante la noche a 4°C. Después de lavar una placa de ensayo tres veces con un tampón de lavado (tampón PBS Tween–20; Thermo Fisher Scientific, Cat. 28352), 100 $\mu\text{L}/\text{receptáculo}$ de PBS que contiene 1% de BSA (Sigma–Aldrich, Cat. A8022) se agregó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces con tampón de lavado, 50 $\mu\text{L}/\text{receptáculo}$ de una muestra de plasma en proceso de 100 o 1000 diluciones en PBS que contiene 1% de BSA se agregó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces con tampón de lavado, 50 $\mu\text{L}/\text{receptáculo}$ de un anticuerpo secundario en proceso de 50000 diluciones, Conjugado HRP de cabra anti IgG2a de ratón (Bethyl Laboratories, Cat. A90–107P), en PBS que contiene 1% de BSA se agregó, y la placa de ensayo se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar tres veces con el tampón de lavado, 50 $\mu\text{L}/\text{receptáculo}$ de Sistema de Sustrato de Peroxidasa de Microreceptáculos TMB (SeraCare Life Sciences, Inc., Cat.50–76–03) que es una solución sustrato se agregó y la placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos con bloqueo de luz. Una solución de

fin de reacción (2N H₂SO₄) se agregó a 50 µL/receptáculo y se midió absorbancia a 450 nm.

Como el resultado de los ensayos antes mencionados, la producción de IgG2a Der p 1, Der p 2, Der p 23 y Der p 7 específica fue detectada administrando plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7 (Der p1–p2–p23–p7) a ratones (Fig. 1). Por otro lado, incluso cuando plásmido LAMP–Der p 23–Der p 7–Der p 2–Der p 1 (Der p23–p7–p2–p1), una mezcla de plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2 y plásmido LAMP–Der p 23–Der p 7 (Der p1–p2 + Der p23–p7), y una mezcla de plásmido LAMP–Der p 1, plásmido LAMP–Der p 2, plásmido LAMP–Der p 7 y plásmido LAMP–Der p 23 (mezcla de 4 plásmidos) fueron administrados a los ratones, la producción de IgG2a específica de Der p 1 no fue detectada. Adicionalmente, cuando una mezcla de plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2 y plásmido LAMP–Der p 23–Der p 7 (Der p1–p2 + Der p23–p7) se administra a ratones, la producción de IgG 2a Der p 2 específica tampoco fue detectada. Es decir, fue solamente el plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7 en que la producción de IgG2a específica para todos los alérgenos codificados en el plásmido fue detectada. A partir de los resultados anteriores, se ha sugerido que entre los plásmidos ensayados, solamente plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7 induce respuestas inmunes Th1 para todos los alérgenos y produce cambio de clase de células B activadas al isotipo IgG2a.

[Ejemplo 4: Inducción de producción IFN- γ y IL-4 mediante plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7]

Evaluación de inducción de producción de citosina luego de estimulación con alérgeno fue realizada sobre esplenocitos recogidos de ratones administrados con plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7. Se prepararon esplenocitos de acuerdo a un método general a partir de los ratones usados en Ejemplo 3 y los ratones administrados con un plásmido control (un vector de

expresión que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica terminal N de LAMP-1 y una secuencia de nucleótidos que codifica terminal C de LAMP-1) con el mismo protocolo que en Ejemplo 3 en Día 63. El plásmido control se puede preparar eliminado sitio Eco RI-Xho I del plásmido que se muestra mediante SEQ ID NO: 6 de la Patente Japonesa No. 5807994. Esplenocitos fueron sembrados en placas de 96 receptáculos (Cat. 3860-096 fabricada por IWAKI) a 8×10^5 células/receptáculo en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Cat. R8758) que contiene suero bovino fetal 10% (Hyclone, Cat. SH30070.03) y penicilina-estreptomicina en proceso de 100 diluciones (ThermoFisher Scientific, Cat. 15070063). Der p 1 (Indoor biotechnologies, NA-DP1-1, lote: 38052), Der p 2 (Indoor biotechnologies, NA-DP2-1, lote: 36118), Der p 7 (Indoor biotechnologies, RP-DP7-1, lote: 34033), o Der p 23 (Sysmex, UniProtKB: A0A0K2DQU8) fueron agregadas de modo tal que sus concentraciones finales fueron respectivamente 3, 3, 3, y 1,3 $\mu\text{g/mL}$. Se realizó cultivo a 37°C bajo 5% de CO₂ durante 72 horas. Las concentraciones de IFN- γ y IL-4 en el sobrenadante de cultivo fueron medidas mediante método ELISA. Una muestra de sobrenadante diluida en 10 veces con TBS que contiene 0,1% BSA y 0,05% Tween 20 se usó para la medición de IFN- γ , y una muestra no diluida de sobrenadante se usó para la medición de IL-4. Se usó una placa de ensayo para medición ELISA, F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE (Nunc, Cat. 439454). La medición fue llevada a cabo usando IFN- γ DuoSet ELISA de ratón (R&D Systems, Cat. DY485) y IL-4 DuoSet ELISA de ratón (R&D Systems, Cat. DY 404) de acuerdo con protocolo adjunto. Como el resultado del ensayo antes mencionado, una producción IFN- γ específica de alérgeno derivada de ácaros se indujo administrando 50 μg de plásmido LAMP-Der p 1-Der p 2-Der p 23-Der p 7 (Der p 1-p2-p 23-p 7) a ratones tres veces

(Fig. 2). También, incluso en un caso donde plásmido LAMP–Der p 23–Der p 7–Der p 2–Der p 1 (Der p23–p7–p2–p1), una mezcla de plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2 y plásmido LAMP–Der p 23–Der p 7 (Der p1–p2 + Der p23–p7), y una mezcla de plásmido LAMP–Der p 1, plásmido LAMP–Der p 2, plásmido LAMP–Der p 7 y plásmido LAMP–Der p 23 (mezcla de 4 plásmidos) fueron administrados a los ratones tres veces, se indujo producción IFN- γ específica de alérgeno derivada de ácaros comparable. Por otro lado, en los ratones administrados tres veces con 50 μ g de plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7 (Der p 1–p2–p23–p7), la producción IL–4 específica de alérgeno derivada de ácaros fue el límite inferior de detección (Fig. 3). Incluso en un caso donde plásmido LAMP–Der p 23–Der p 7–Der p 2–Der p 1 (Der p23–p7–p2–p1), una mezcla de plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2 y plásmido LAMP–Der p 23–Der p 7 (Der p1–p2 + Der p23–p7), y una mezcla de plásmido LAMP–Der p 1, plásmido LAMP–Der p 2, plásmido LAMP–Der p 7, y plásmido LAMP–Der p 23 (mezcla de 4 plásmidos) fueron administrados a los ratones tres veces, la producción IL–4 específica de alérgeno derivada de ácaros estaba debajo del límite inferior de detección.

Como el resultado de los ensayos anteriores, una mezcla de plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7, plásmido LAMP–Der p 23–Der p 7–Der p 2–Der p 1, plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2, y plásmido LAMP–Der p 23–Der p 7, y una mezcla de plásmido LAMP–Der p 1, plásmido LAMP–Der p 2, plásmido LAMP–Der p 7, y plásmido LAMP–Der p 23 han mostrado que inducen respuestas inmunes dominantes de célula Th1.

Aplicabilidad Industrial

El ácido nucleico de la presente invención se espera que sea útil para la prevención o tratamiento de alergia a los ácaros. Además, el método para producir el ácido nucleico de la presente invención es útil para producir el ácido

nucleico.

Texto Libre Listado de Secuencias

El encabezado numérico <223> en el listado de secuencias que sigue describe la descripción de “Secuencia Artificial”. Específicamente, la secuencia de nucleótidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias es una secuencia de nucleótidos que codifica proteína quimérica LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7, y la secuencia de aminoácidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias es la secuencia de aminoácidos codificada mediante SEQ ID NO: 1. Además, la secuencia de nucleótidos que se muestra mediante SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de plásmido LAMP–Der p 1–Der p 2–Der p 23–Der p 7.