

DESCRIPCIÓN

Título de la Invención: **ÁCIDO NUCLEICO PARA TRATAR LA ALERGIA A LOS MARISCOS**

Campo Técnico

[0001]

La presente invención se relaciona con un ácido nucleico el cual se espera que sea útil como un ingrediente activo de una composición farmacéutica, por ejemplo, un ácido nucleico el cual se espera que sea útil para tratar la alergia a los mariscos.

Estado Actual de la Tecnología

[0002]

La alergia a alimentos se refiere a un “fenómeno que produce síntomas adversos a organismos a través de un mecanismo inmunológico, específico de antígeno, ocasionado por un alimento”, el cual se caracteriza por síntomas tales como urticaria, eccema, diarrea, tos, y similares, debido a la ingesta de alimentos. La alergia a los mariscos es una de las principales alergias a los alimentos en adultos y, como alergenos que producen la alergia a los mariscos, se conoce una amplia variedad de alergenos, que incluyen Lit v 1 y Pen m 1 clasificados en tropomiosina, Lit v 2 y Pen m 2 clasificados en arginina cinasa, Lit v 3 y Pen m 3 clasificados en cadena ligera de la miosina, y Lit v 4 y Pen m 4 clasificados en proteína de fijación de calcio sarcoplásmica, y similares (Documentos Distintos de Patente 1 a 4).

[0003]

En la actualidad, no existe un método de tratamiento fundamental para la alergia a los mariscos, y la evitación de la ingestión de alergenos eliminando el alimento alérgico es la única manera de evitar un síntoma de alergia a los mariscos tal como la anafilaxia. Aunque se han estudiado la inmunoterapia específica del alergeno (ASIT - *allergen specific immunotherapy*), los plásmidos de ADN, la inmunoterapia a base de péptidos (PIT - *peptide-based immunotherapy*), y similares, todavía no se han desarrollado métodos de tratamiento clínicamente efectivos y, en consecuencia, se siguen requiriendo métodos de tratamiento efectivos (Documento Distinto de Patente 4, European Annals of Allergy and Clinical Immunology, 2017, Vol. 49, p. 252-256).

[0004]

La enfermedad alérgica se produce en los siguientes pasos: 1) alergenos

incorporados en un organismo se fagocitan por células presentadoras de antígeno y se presentan a linfocitos T vírgenes, 2) los linfocitos T vírgenes se diferencian en linfocitos Th2, 3) se produce citocina tal como IL-4 de una célula inmunitaria tal como el linfocito Th2, 4) los linfocitos B producen IgE por IL-4, y 5) IgE que se fija a los alérgenos se une a los mastocitos. Es ampliamente conocido que, en pacientes alérgicos, el equilibrio entre inmunidad tipo Th-1 que involucra linfocitos Th1 que producen IFN- γ o similares y la inmunidad tipo Th2 que involucra linfocitos Th2 que producen IL-4 o similares cambia (*shifts*) a dominante tipo Th2, lo cual resulta en una respuesta inmunitaria inflamatoria tipo Th2 (Middleton's Allergy Seventh edition Principles & Practice, 2009). Por consiguiente, IFN- γ puede usarse como un indicador de inmunidad tipo Th-1, e IL-4 puede usarse como un indicador de inmunidad tipo Th2. Por lo demás, en ratones, IFN- γ produce una conmutación preferencial de clase al isotipo IgG2a en linfocitos B activados, mientras suprime las respuestas a todos los demás isotipos. Es decir, la producción de anticuerpo IgG2a puede usarse igualmente como un indicador de inmunidad tipo Th-1. Por ejemplo, es ampliamente conocido que la producción de anticuerpo IgG2a se promueve en ratones con deficiencia de IL-4 y que la producción del anticuerpo IgG2a se suprime en ratones con deficiencia de IFN- γ (Arthritis Res., 2002, Vol. 4, p. 54-58). Existe así mismo un informe de que los anticuerpos producidos por linfocitos B se encuentran involucrados en el mecanismo de acción de la inmunoterapia de alérgenos. Por ejemplo, es ampliamente conocido que, en humanos, la IgG antagoniza la fijación de IgE a un alérgeno para inhibir la formación del complejo alérgeno-IgE e inhibir así la liberación de histamina de los mastocitos (Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017, Vol. 140, p. 1485-1498).

[0005]

Como una de las técnicas para vacunas de ácidos nucleicos, se han estudiado vacunas de ácidos nucleicos para tratar alergia usando proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP - *lysosome-associated membrane proteins*). Adicionalmente, se construyó un plásmido que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica que comprende LAMP-1, la cual es un miembro de la familia LAMP, y Cry J1 y/o Cry J2, que son alérgenos de *Cryptomeria japonica* (Documento de Patente 1 y Documento Distinto de Patente 5). Se ha señalado que tal plásmido no ocasiona la liberación sistémica de alérgeno libre, el cual produce anafilaxia, pero induce una respuesta inmunitaria tipo Th1. Por otro lado, se ha informado que un plásmido que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica que comprende LAMP-1 y alérgenos del cacahuete Ara H1, Ara H2 y Ara H3 redujo la producción de IgE en un modelo murino (Documento de Patente 2). Sin embargo, todavía no se ha informado de una vacuna

de ácido nucleico para tratar la alergia a los mariscos.

Tecnología Relacionada

Documento de Patente

[0006]

[Documento de Patente 1] WO 2013/187906

[Documento de Patente 2] WO 2015/200357

Documento Distinto de Patente

[0007]

[Documento Distinto de Patente 1] "Allergo Journal International", (Germany), 2016; 25(7): 210-218.

[Documento Distinto de Patente 2] "The Journal of Allergy and Clinical Immunology", (USA), 2009; 124(1): 114-120.

[Documento Distinto de Patente 3] "The Journal of Allergy and Clinical Immunology", (USA), 2008; 122(4): 795-802.

[Documento Distinto de Patente 4] "Clinical Reviews in Allergy and Immunology", (USA), 2015; 49(2): 203-216.

[Documento Distinto de Patente 5] "Journal of Immunology Research", (Egypt), 2016; Article ID 4857869

Divulgación de la Invención

Problema Técnico

[0008]

Un objeto de la presente invención es proveer un ácido nucleico el cual se espera que sea útil para tratar la alergia a los mariscos.

Medios para Resolver los Problemas

[0009]

Como resultado de una investigación repetida, aunada a una creatividad considerable en la preparación de ácidos nucleicos para tratar la alergia a los mariscos, los presentes inventores obtuvieron un plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 (Ejemplo 1), confirmaron que una proteína quimérica se expresa del plásmido (Ejemplo 2), y descubrieron que se induce una respuesta inmunitaria tipo Th1 en ratones, a los cuales se administra el plásmido (Ejemplos 3 y 4). Como resultado, se provee un ácido nucleico el cual se espera que sea útil para tratar la alergia a los mariscos y, como consecuencia, se realizó la presente invención. Adicionalmente, se descubrió que los síntomas alérgicos, causados por la exposición al antígeno del camarón, se alivian en ratones a los que se administró

el plásmido (Ejemplo 5).

[0010]

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,

en 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 intraorganelo de LAMP;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana; y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP.

[2]

Un ácido nucleico que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica,

en 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 intraorganelo de LAMP;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3 en este orden;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana; y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP.

[3]

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

[4]

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

[5]

El ácido nucleico descrito en uno cualquiera de [1] a [4], en donde el péptido señal está conformado por una secuencia de aminoácidos de los números de

aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2, el dominio de estabilización intraorganelo está conformado por una secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2, el dominio de alérgeno es un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1 conformado por una secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, Lit v 4 conformado por una secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y Lit v 3 conformado por una secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2, el dominio transmembrana está conformado por una secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2, y el dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico está conformado por una secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[6]

Un ácido nucleico que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica conformada por una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad con una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2, en donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th-1 a un alérgeno seleccionado del grupo conformado por Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3.

[7]

Un ácido nucleico que comprende:

a) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica conformada por una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2; o

b) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica conformada por una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 10 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan, y/o agregan en la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2, en donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th-1 a un alérgeno seleccionado del grupo conformado por Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3.

[8]

Un ácido nucleico que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica conformada por una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2.

[9]

Un vector de expresión que comprende:

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

[10]

Un vector de expresión que comprende:
el ácido nucleico descrito en [8].

[11]

Una célula hospedera transformada con el ácido nucleico descrito en uno cualquiera de [1] a [8].

[12]

Un método para producir un ácido nucleico, que comprende:
cultivar una célula hospedera transformada con el ácido nucleico descrito en uno cualquiera de [1] a [8].

[13]

Una composición farmacéutica que comprende:
el vector de expresión descrito en [10] y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[14]

La composición farmacéutica descrita en [13], la cual es una composición farmacéutica para prevenir o tratar la alergia a los mariscos.

[15]

Un método para prevenir o tratar la alergia a los mariscos, 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 uso en prevenir o tratar la alergia a los mariscos.

[17]

Uso del vector de expresión descrito en [10] para la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar la alergia a los mariscos.

Efectos de la Invención

[0011]

El ácido nucleico de la presente invención puede usarse para prevenir o tratar la alergia a los mariscos.

Breve Descripción de los Dibujos

[0012]

[Fig. 1] Fig. 1 es un diagrama que ilustra la producción de anticuerpo IgG2a específico de Lit v 1, Lit v 3, y Lit v 4, el cual se induce cuando el ácido nucleico de la presente invención se administró a un ratón. El eje vertical indica el valor cuantitativo de anticuerpos en el plasma (mU/mL), y el eje horizontal indica cada

grupo de administración. La línea punteada representa un límite de detección, y la línea horizontal representa el valor de la media geométrica de cada grupo de administración.

[Fig. 2] Fig. 2 es un diagrama que ilustra la producción de IFN- γ cuando esplenocitos del ratón al que se administró el ácido nucleico de la presente invención se estimularon con una solución de extracto de camarón que tenía una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$ o una proteína Lit v 1 que tenía una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$. El eje vertical indica la concentración de IFN- γ en el sobrenadante del cultivo (pg/mL), y el eje horizontal indica cada grupo de administración. La línea punteada representa el límite de detección, y la línea horizontal representa el valor de la media aritmética de cada grupo de administración.

[Fig. 3] Fig. 3 es un diagrama que ilustra la producción de IL-4 cuando esplenocitos del ratón al cual se administró el ácido nucleico de la presente invención se estimularon con una solución de extracto de camarón que tenía una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$ o una proteína Lit v 1 que tenía concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$. El eje vertical indica la concentración de IL-4 en el sobrenadante del cultivo (pg/mL), y el eje horizontal indica cada grupo de administración. La línea punteada representa el límite de detección, y la línea horizontal representa el valor de la media aritmética de cada grupo de administración.

[Fig. 4] Fig. 4 ilustra puntajes de variaciones en la temperatura corporal y síntomas alérgicos luego de la administración intraperitoneal de antígeno de camarón cuando el ácido nucleico de la presente invención se administra a un ratón sensibilizado con antígeno de camarón. La variación en la temperatura corporal indica la variación de la temperatura corporal a partir de la administración previa en los puntos inmediatamente antes de la administración intraperitoneal de antígeno de camarón, así como después de 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, y 60 minutos. El eje vertical indica la variación en la temperatura rectal ($^{\circ}\text{C}$), y el eje horizontal indica el tiempo. La curva indica el valor de la media aritmética dentro de la misma prescripción en cada punto de tiempo, y la línea vertical indica un error estándar. El síntoma alérgico indica el puntaje de cada ratón en el cual el síntoma observado 60 minutos después de la administración intraperitoneal del antígeno de camarón se determinó con base en los criterios de un documento (The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013, Vol. 131, p. 213-221). El eje vertical indica un puntaje de síntoma anafiláctico, y el eje horizontal indica cada grupo de administración. La línea horizontal indica un valor de la mediana de cada grupo de administración. ++ indica que un valor P es menor que 0,01 en la prueba de diferencia significativa por la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para un

grupo no sensibilizado, y ** indica que un valor P es menor que 0,01 en la prueba de diferencia significativa por la prueba de comparaciones múltiples de Steel para un grupo sensibilizado.

[Fig. 5] Fig. 5 ilustra una concentración de proteasa 1 de mastocitos de ratón (mMCPT-1 - *mouse mast cell protease 1*) en el plasma cuando el ácido nucleico de la presente invención se administró al ratón sensibilizado con antígeno de camarón. El eje vertical indica la concentración de mMCPT-1 (pg/mL), y el eje horizontal indica cada grupo de administración. La línea horizontal indica un valor de la media geométrica de cada grupo de administración, ++ indica que un valor P es menor que 0,01 en la prueba de diferencia significativa por la prueba t con muestras no emparejadas para el grupo no sensibilizado luego de la transformación logarítmica, y ** indica que un valor P es menor que 0,01 en la prueba de diferencia significativa por la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett para un grupo sensibilizado luego de la transformación logarítmica.

Modalidades para Llevar a Cabo la Invención

A partir de ahora, la presente invención se describirá en detalle.

[0014]

<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, en 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 intraorganelo de LAMP;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana; y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP.

[0015]

En la presente invención, el ácido nucleico es un polímero que se forma por polimerización de nucleótidos y está conformado por una secuencia de nucleótidos con una longitud arbitraria. Los nucleótidos pueden incluir desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o sus análogos. El ácido nucleico de la presente invención es

ADN, ARN o un ácido nucleico modificado de los anteriores. En una modalidad, el ácido nucleico de la presente invención es ADN.

[0016]

En una modalidad, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico introducido en un vector de expresión. En una modalidad, el ácido nucleico de la presente invención es un ácido nucleico introducido en un vector plasmídico.

[0017]

En el capítulo descriptivo, “proteína quimérica” significa una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos en la cual dos o más genes se fusionan usando tecnología de recombinación genética. El ácido nucleico de la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica que comprende un péptido señal, un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP, un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3, un dominio transmembrana, y un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP en este orden (designada, en lo sucesivo, como una “proteína quimérica relacionada con la presente invención”).

[0018]

LAMP es una proteína bien conocida por los expertos en la materia (J Biol Chem., 1991, Vol. 266, p. 21327-21330). En el presente capítulo descriptivo, LAMP no está limitada particularmente, pero sus Ejemplos incluyen LAMP-1, LAMP-2, CD63/LAMP-3, DC-LAMP, y LIMP II, y sus homólogos, ortólogos, parálogos, variantes, y proteínas modificadas. En una modalidad de la presente invención, LAMP es LAMP-1. En la presente invención, un animal del cual se deriva LAMP no está limitado particularmente, pero en una modalidad, LAMP es LAMP humana. En una modalidad, LAMP humana es LAMP-1 humana. Ejemplos de una secuencia de aminoácidos de LAMP-1 humana incluyen una secuencia de aminoácidos en la cual la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 1047 a 1082 del SEQ ID NO: 2 se une a un C-terminal de la secuencia de aminoácidos representada por los números de aminoácidos 1 a 380 del SEQ ID NO: 2.

[0019]

La estructura general del péptido señal es bien conocida por los expertos en la materia (Annu Rev Biochem., 2003, Vol. 72, p. 395-447). El péptido señal tiene una función de dirigir el transporte y la localización de una proteína. Como el péptido señal usado en la presente invención, puede seleccionarse cualquier péptido señal apropiado siempre y cuando tenga una función de dirigir el transporte y la localización de la proteína. En una modalidad, el péptido señal usado en la presente invención es un péptido señal de LAMP. En una modalidad, el péptido señal de LAMP usado en la presente invención es un péptido señal de LAMP-1.

[0020]

En una modalidad, el péptido señal usado en la presente invención está conformado por la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

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

(b) la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 3 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2.

[0021]

El término de “identidad” en el presente capítulo descriptivo 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 como sigue.

Gap Open Penalty = 10

Gap Extend Penalty = 0,5

Matrix = EBLOSUM62

End Gap Penalty = false

[0022]

En una modalidad, el péptido señal usado en la presente invención está conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2.

[0023]

La secuencia del dominio de estabilización intraorganelo de LAMP es bien conocida por los expertos en la materia (WO 2013/187906). El dominio de estabilización intraorganelo de LAMP tiene una función de proteger el dominio de alérgeno de proteasas, pH bajo, y otras sustancias y condiciones que desestabilizan una proteína. Como el dominio de estabilización intraorganelo de LAMP usado en la presente invención, puede seleccionarse cualquier dominio apropiado de estabilización dentro intraorganelo de LAMP siempre y cuando tenga una función de proteger el dominio de alérgeno de proteasas, pH bajo, y otras sustancias y condiciones que desestabilizan una proteína. En una modalidad, el dominio de estabilización intraorganelo de LAMP usado en la presente invención es un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP-1.

[0024]

En una modalidad, el dominio de estabilización intraorganelo de LAMP usado en la presente invención está conformado por la siguiente secuencia de

aminoácidos de (a) o (b):

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

(b) la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 10 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2.

[0025]

En una modalidad, el dominio de estabilización intraorganelo de LAMP usado en la presente invención está conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2.

[0026]

El dominio de alérgeno usado en la presente invención incluye Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3 como alérgenos. Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3 son alérgenos que se observan ampliamente en mariscos (Documento Distinto de Patente 1). Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3 usados en la presente invención pueden ser variantes de los anteriores siempre y cuando tengan antigenicidad. La antigenicidad de cualquier proteína puede confirmarse, por ejemplo, observando que la administración a un animal suscita la producción de anticuerpos o la respuesta de linfocitos T a esa proteína (Bioanalysis., 2012, Vol. 4, p. 397-406).

[0027]

En una modalidad, Lit v 1 está conformado por la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 10 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2.

[0028]

En una modalidad, Lit v 1 está conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2.

[0029]

En una modalidad, Lit v 4 está conformado por la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad

con la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 10 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2.

[0030]

En una modalidad, Lit v 4 está conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2.

[0031]

En una modalidad, Lit v 3 está conformado por la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 10 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2.

[0032]

En una modalidad, Lit v 3 está conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2.

[0033]

En una modalidad, el dominio de alérgeno usado en la presente invención incluye Lit v1, Lit v 4 y Lit v 3 en cualquier orden. Así mismo, en una modalidad, el dominio de alérgeno usado en la presente invención incluye Lit v1, Lit v 4 y Lit v 3 en este orden.

[0034]

En una modalidad, el dominio de alérgeno usado en la presente invención está conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 1044 del SEQ ID NO: 2.

[0035]

La estructura general del dominio transmembrana es bien conocida por los expertos en la materia (Annu Rev Biochem., 2007, Vol. 76, p. 125 a 140). El dominio transmembrana tiene una función de anclar proteínas a membranas biológicas. Como el dominio transmembrana usado en la presente invención, puede seleccionarse cualquier proteína de dominio transmembrana siempre y cuando tenga una función de anclar proteínas a membranas biológicas. En una modalidad,

el dominio transmembrana usado en la presente invención es un dominio transmembrana de LAMP. En una modalidad, el dominio transmembrana de LAMP usado en la presente invención es un dominio transmembrana de LAMP-1.

[0036]

En una modalidad, el dominio transmembrana usado en la presente invención está conformado por la siguiente secuencia de aminoácidos de (a) o (b):

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2; o

(b) la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 2 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o agregan en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2.

[0037]

En una modalidad, el dominio transmembrana usado en la presente invención está conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2.

[0038]

La estructura del dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP es bien conocida por los expertos en la materia (WO 1994/017192). El dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP tiene una función de transportar una proteína a un lisosoma. Como el dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP usado en la presente invención, puede seleccionarse cualquier dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico apropiado de LAMP siempre y cuando tenga una función de transportar la proteína al lisosoma. En una modalidad, el dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP usado en la presente invención es un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP-1.

[0039]

En una modalidad, el dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP usado en la presente invención está conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos en la cual 1 aminoácido se elimina, sustituye, inserta y/o agrega en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0040]

En una modalidad, el dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP usado en la presente invención está conformado por una secuencia de

aminoácidos en un intervalo de números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0041]

En la proteína quimérica relacionada con la presente invención, el péptido señal, el dominio de estabilización intraorganelo de LAMP, cada alérgeno comprendido en el dominio de alérgeno, el dominio transmembrana, y el dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP puede enlazarse directamente o puede enlazarse indirectamente mediante un péptido enlazador. El péptido enlazador que se usará puede seleccionarse apropiadamente por los expertos en la materia. En una modalidad, el péptido enlazador está conformado por 10 o menos aminoácidos. En una modalidad, un péptido enlazador usado entre el dominio de estabilización intraorganelo de LAMP y el dominio de alérgeno, entre alérgenos, y entre el dominio de alérgeno y el dominio transmembrana es un péptido enlazador seleccionado del grupo conformado por LeuGlu, GlyGlyGlyGly, y GluPheThr. En una modalidad, el péptido enlazador usado entre el dominio transmembrana y el dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP es un péptido enlazador conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1071 a 1078 del SEQ ID NO: 2.

[0042]

En una modalidad, 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, en 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 intraorganelo de LAMP;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3;

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

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP.

[0043]

En una modalidad, 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, en 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 intraorganelo de LAMP-1,
- una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3;
- una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana de LAMP-1, y
- una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de la LAMP-1.

[0044]

En una modalidad, 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, en 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 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, Lit v 4 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y Lit v 3 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0045]

En una modalidad, 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, en 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 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, Lit v 4 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y Lit v 3 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido enlazador conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1071 a 1078 del SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0046]

En una modalidad, 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, en 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 intraorganelo de LAMP;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que

comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3 en este orden,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana; y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP.

[0047]

En una modalidad, 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, en 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 intraorganelo de LAMP;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3 en este orden,

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

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP.

[0048]

En una modalidad, 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, en 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 intraorganelo de LAMP-1,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3 en este orden,

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

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de la LAMP-1.

[0049]

En una modalidad, 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, en 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 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, Lit v 4 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y Lit v 3 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2, en este orden;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0050]

En una modalidad, 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, en 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 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de

aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, Lit v 4 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y Lit v 3 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2, en este orden;

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido enlazador conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1071 a 1078 del SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0051]

El ácido nucleico de la presente invención no está limitado particularmente siempre y cuando codifique la proteína quimérica relacionada con la presente invención, y tenga una acción de inducir inmunidad tipo Th-1 con respecto al alérgeno seleccionado del grupo conformado por Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3, cuando el ácido nucleico se administra a un humano o un animal. Se puede confirmar si un determinado ácido nucleico tiene o no una acción de inducir inmunidad tipo Th-1 con respecto al alérgeno descrito más arriba, cuando el ácido nucleico se administra a un humano o un animal, por el método descrito en, verbigracia, Ejemplo 3 y/o Ejemplo 4. Adicionalmente, el ácido nucleico de la presente invención puede ser un ácido nucleico que tiene la acción de inducir una respuesta inmunitaria dominante de linfocitos Th1, cuando el ácido nucleico se administra a un humano o un animal. Se puede confirmar si un determinado ácido nucleico tiene o no una acción de inducir una respuesta inmunitaria dominante de linfocitos Th1, cuando el ácido nucleico se administra a un humano o un animal, por el método descrito en, verbigracia, Ejemplo 4.

[0052]

En una modalidad, 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 conformada por una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2.

[0053]

En una modalidad, 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 conformada por una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2.

[0054]

En una modalidad, 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 conformada por la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2, o una proteína quimérica conformada por una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 10 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan, y/o agregan en la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2.

[0055]

En una modalidad, 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 conformada por una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad con una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2,

en donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th-1 al alérgeno seleccionado del grupo conformado por Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3.

[0056]

En una modalidad, 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 conformada por una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2; o

b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica conformada por una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 10 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan, y/o agregan en la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2, en donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th-1 a un alérgeno seleccionado del grupo conformado por Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3.

[0057]

En una modalidad, 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 conformada por una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad con una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2, en donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th-1 a Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3.

[0058]

En una modalidad, 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 conformada por una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2; o

b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica conformada por una secuencia de aminoácidos en la cual 1 a 10 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan, y/o agregan en la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2, en donde el ácido nucleico tiene una acción de inducir inmunidad tipo Th-1 a Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3.

[0059]

En una modalidad, 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 conformada por una secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2.

[0060]

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica conformada por la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2 significa la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 1.

[0061]

Basado en la secuencia de nucleótidos, el ácido nucleico de la presente invención puede obtenerse fácilmente por los expertos en la materia usando los métodos conocidos en la tecnología. Por ejemplo, el ácido nucleico de la presente invención puede sintetizarse usando métodos de síntesis génica conocidos en la tecnología. Como tal método de síntesis génica, pueden usarse diferentes métodos conocidos por los expertos en la materia tal como un método para sintetizar un gen de un anticuerpo descrito en WO 90/07861.

[0062]

Una vez sintetizado, el ácido nucleico de la presente invención puede replicarse fácilmente por los expertos en la materia usando los métodos conocidos en la tecnología. Por ejemplo, el ácido nucleico de la presente invención puede

replicarse por el método descrito más adelante en <Método para producir el ácido nucleico de la presente invención y ácido nucleico que puede producirse por el método>.

[0063]

<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.

[0064]

El vector de expresión usado para expresar una proteína quimérica del ácido nucleico de la presente invención no está limitado particularmente siempre y cuando pueda expresar la proteína quimérica del ácido nucleico de la presente invención en células animales. En una modalidad, el vector de expresión usado para expresar una proteína quimérica del ácido nucleico de la presente invención es un vector de expresión que puede usarse para expresar la proteína quimérica en un organismo humano. Ejemplos del vector de expresión usado en la presente invención incluyen un vector plasmídico, un vector vírico (por ejemplo, adenovirus, retrovirus, virus adeno-asociado) y similares. En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención es un vector plasmídico. En el presente capítulo descriptivo, "plásmido" significa el vector plasmídico.

[0065]

El vector de expresión de la presente invención puede comprender un promotor enlazado operacionalmente 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 derivado de un virus tal como CMV (citomegalovirus), RSV (*respiratory syncytial virus* - virus sincitial respiratorio), y SV40 (virus símico 40), un promotor de actina, promotor 1 α EF (factor de elongación - *elongation factor*), un promotor de choque térmico y similares. En una modalidad, el promotor comprendido en el vector de expresión de la presente invención es un promotor CMV. El vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de inicio y un codón de parada. En este caso, pueden estar comprendidos una secuencia potenciadora, una región no traducida, un punto de empalme (*a splicing junction*), un sitio de poliadenilación, o una unidad replicable o similares.

[0066]

En una modalidad, 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, en 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 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, Lit v 4 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y Lit v 3 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0067]

En una modalidad, 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, en 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 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, Lit v 4 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y Lit v 3 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos

868 a 1044 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido enlazador conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1071 a 1078 del SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0068]

En una modalidad, 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 conformada por la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2.

[0069]

En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 1.

[0070]

En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención es un vector de expresión que comprende un ácido nucleico conformado por la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 3.

[0071]

<Célula hospedera de la presente invención>

La célula hospedera de la presente invención incluye una célula hospedera transformada con el ácido nucleico de la presente invención. En una modalidad, la célula hospedera de la presente invención es una célula hospedera transformada con el vector de expresión de la presente invención. En una modalidad, la célula hospedera de la presente invención es una célula hospedera transformada con el vector de expresión de la presente invención, el cual es un vector plasmídico.

[0072]

La célula hospedera transformada con el ácido nucleico de la presente invención no está limitada particularmente, y puede seleccionarse cualquier célula conocida en la tecnología siempre y cuando la célula sea una célula que pueda usarse para la replicación del ácido nucleico.

[0073]

Ejemplos de la célula hospedera que pueden usarse para la replicación del

ácido nucleico incluyen varias células tales como células naturales o células obtenidas artificialmente usadas comúnmente en el campo técnico de la presente invención (por ejemplo, células animales (por ejemplo, células CHOK1SV y similares), células de insecto (por ejemplo, Sf9 y similares), bacterias (por ejemplo, E. coli y similares), y levaduras (por ejemplo, Saccharomyces, Pichia, y similares), y similares). En una modalidad, E. coli puede usarse como una célula hospedera. La transformación en sí misma puede llevarse a cabo por métodos conocidos.

[0074]

<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 incluyen un método para producir un ácido nucleico o un vector de expresión, el cual comprende un paso de cultivar células hospederas transformadas con el ácido nucleico o el vector de expresión de la presente invención. En una modalidad, el método para producir el ácido nucleico de la presente invención comprende un paso de cultivar la célula hospedera transformada con el ácido nucleico de la presente invención, y replicar el ácido nucleico de la presente invención.

En una modalidad, el método para producir el ácido nucleico de la presente invención comprende un paso de cultivar la célula hospedera transformada con el vector de expresión de la presente invención, y replicar el vector de expresión de la presente invención.

[0075]

En una modalidad, la célula hospedera usada en el método para producir el ácido nucleico de la presente invención es E. coli. Para el cultivo de E. coli, puede seleccionarse un medio de cultivo apropiado tal como medio LB, medio M9, medio Terrific Broth, medio SOB, medio SOC, o medio 2 × YT. Adicionalmente, el cultivo de E. coli puede llevarse a cabo en un ambiente en el que carbono (este no está limitado particularmente siempre y cuando sea un compuesto de carbono asimilable; por ejemplo, polioles tales como glicerina, o ácidos orgánicos tales como ácido pirúvico, ácido succínico, o ácido cítrico), nitrógeno (este no está limitado particularmente siempre y cuando sea un compuesto de nitrógeno que pueda ser usado por E. coli; por ejemplo, peptona, extracto de carne, extracto de levadura, hidrosilato de caseína, extracto alcalino de harina de soya, o amoníaco o una sal del mismo), iones orgánicos e inorgánicos (estos no están limitados particularmente, y sus ejemplos incluyen fosfato, carbonato, sulfato, magnesio, calcio, potasio, hierro, manganeso y cinc), una fuente de vitamina, un agente antiespumante, y similares, se controlan a una concentración apropiada. Por lo demás, el control del cultivo

incluye el control de parámetros tales como pH, temperatura, agitación, flujo de aire y oxígeno disuelto. En una modalidad, las condiciones de cultivo incluyen un pH de 6,7 a 7,5, una temperatura de 20°C a 37°C, y una velocidad de agitación de 200 a 300 rpm.

[0076]

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

[0077]

El método para producir el ácido nucleico de la presente invención puede comprender además un paso de purificar ácido nucleico o un vector de expresión del lisado. Cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrófoba pueden usarse 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. Adicionalmente, como un tratamiento final del paso de purificación, puede estar comprendido un paso de filtración estéril.

[0078]

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

[0079]

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

[0080]

<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 modalidad, 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 prepararse por un método utilizado generalmente con un excipiente usado generalmente en el campo, es decir, un excipiente farmacéutico,

un vehículo farmacéutico o similares. Ejemplos de presentaciones farmacéuticas de estas composiciones farmacéuticas incluyen, por ejemplo, agentes parenterales tales como inyecciones y agentes de goteo, los cuales pueden aplicarse mediante administración intravenosa, administración subcutánea, administración intradérmica, administración intramuscular, y similares. En la formulación, excipientes, vehículos, aditivos, y similares pueden usarse de acuerdo con estas formas farmacéuticas dentro del intervalo farmacéuticamente aceptable.

[0081]

En una modalidad, 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.

[0082]

Aunque la cantidad de administración del ácido nucleico de la presente invención o el vector de expresión varía dependiendo del grado de los síntomas y la edad del paciente, la presentación farmacéutica de la preparación usada, y similares, por ejemplo, puede usarse la cantidad en el intervalo de 0,001 mg/kg a 100 mg/kg. Además, es posible preparar una formulación agregando el ácido nucleico o el vector de expresión de la presente invención en una cantidad correspondiente a tal cantidad de administración.

[0083]

La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como un agente para prevenir o tratar alergia causada por un alergeno seleccionado de Lit v 1, Lit v 4 y Lit v 3. La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse igualmente como un agente para prevenir o tratar la alergia a los mariscos.

[0084]

La presente invención incluye una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende el ácido nucleico de la presente invención. La presente invención incluye así mismo 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 incluye también el ácido nucleico de la presente invención para uso en prevenir o tratar alergia. Adicionalmente, la presente invención incluye uso del ácido nucleico de la presente invención para fabricar una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia. En una modalidad, la alergia ya descrita es alergia causada por un alergeno seleccionado del grupo conformado por Lit v 1, Lit v 4 y Lit v 3. Además, en una modalidad, la alergia ya descrita es alergia que afecta a un paciente con alergia que tiene un anticuerpo que responde a un alergeno seleccionado del grupo

conformado por Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3. Por otro lado, en una modalidad, la alergia ya descrita es alergia a los mariscos.

[0085]

En una modalidad, 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, en 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 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, Lit v 4 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y Lit v 3 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0086]

En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica conformada por la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0087]

La presente invención incluye una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia, que comprende el vector de expresión de la presente invención. Adicionalmente, 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 incluye igualmente el vector de expresión de la presente invención para uso en prevenir o tratar alergia. Además, la presente invención incluye uso del vector de expresión de la presente invención para fabricar una composición farmacéutica para prevenir o tratar alergia. En una modalidad, la alergia ya descrita es alergia causada por un alérgeno seleccionado del grupo conformado por Lit v 1, Lit v 4 y Lit v 3. Aparte de eso, en una modalidad, la alergia ya descrita es alergia que afecta a un paciente con alergia que tiene un anticuerpo que responde a un alérgeno seleccionado del grupo conformado por Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3. Por lo demás, en una modalidad, la alergia ya descrita es alergia a los mariscos.

[0088]

En una modalidad, 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, en 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 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 27 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 28 a 380 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, Lit v 4 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y Lit v 3 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2,

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1070 del SEQ ID NO: 2, y

una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP conformado por la secuencia de aminoácidos de

los números de aminoácidos 1079 a 1082 del SEQ ID NO: 2.

[0089]

En una modalidad, 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 conformada por la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0090]

Ejemplos específicos se proveen aquí para referencia con el fin de obtener un entendimiento más detallado de la presente invención; no obstante, estos Ejemplos son para el propósito de ilustración y la presente invención no se limita a ellos.

[Ejemplos]

[0091]

A menos que se especifique lo contrario, los pasos descritos en los siguientes Ejemplos pueden implementarse de acuerdo con métodos conocidos. Más aún, en un caso de usar un reactivo disponible en el comercio, kit, o similares, los pasos ya mencionados pueden implementarse de acuerdo con el manual de instrucciones de un producto de obtención en el comercio.

[0092]

[Ejemplo 1: Construcción de un plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3]

Se construyó el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 conformado por la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ 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 conformada por la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2): una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3 en este orden, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana de LAMP-1, y una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP-1). El plásmido puede construirse insertando ADN sintético, en el cual la secuencia de reconocimiento Xho I se añade al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de 1147 a 3132 del SEQ ID NO: 1 (una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3 en este orden) y la

secuencia de reconocimiento Eco RI se añade al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos, en el sitio Eco RI-Xho I del plásmido representada por el SEQ ID NO: 6 de la Patente Japonesa n.º 5807994. E. coli se transformó con el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 construido, y se cultivó en un medio líquido. El plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 amplificado se obtuvo por un método de centrifugar la solución de cultivo y recolectando las células basándose en un método general de extracción y purificación (método miniprep).

[0093]

[Ejemplo 2: Expresión de la proteína quimérica LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3]

Se evaluó la expresión *in vitro* de la proteína quimérica LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 (una proteína quimérica conformada por una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 1 (es decir, la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2)) usando la estirpe celular 293T derivada de riñón embrionario humano.

[0094]

(1) Cultivo celular e introducción del plásmido

Células 293T derivadas de riñón embrionario humano (Thermo Fisher Scientific, Cat. HCL4517) se suspendieron en medio D-MEM (Sigma-Aldrich, Cat. D5796) que contenía 10% suero fetal bovino (Hyclone, Cat. SH30070.03) y penicilina – estreptomycin diluida por un factor de dilución de 100 (Thermo Fisher Scientific, Cat. 15070063), y se cultivaron en placas de 6 pocillos (Cat. 3810-006 fabricadas por IWAKI) con 3×10^5 células/pocillo. Luego de cultivar durante la noche a 37°C en la presencia de 5% CO₂, se añadieron 250 µL de una solución mixta que tenía una relación de plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3: Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific, Cat. 11668027) = 2,5 (µg):10 (µL). Adicionalmente, luego de cultivar durante la noche a 37°C nuevamente en presencia de 5% CO₂, se retiró el medio y se lavó una vez con PBS, y a continuación se realizó transferencia western (*western blotting*).

[0095]

(2) Transferencia Western

Preparación de la muestra: Las células se desintegraron mediante lisinas con una solución tampón RIPA (Pierce Cat. 89900) que contenía un inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics Cat. 11873580), se centrifugaron a 20.000 xg durante 5 minutos, y luego de la centrifugación, se cuantificó una concentración de la proteína de un sobrenadante usando un kit II de ensayo de proteína DC (Bio-Rad Cat. 500-0112). A 5 µL del sobrenadante diluido con PBS que contenía inhibidor de proteasa, de manera que la concentración de proteína fuera 200 µg/mL, se añadieron 5 µL de solución tampón de muestra LDS (Thermo Fisher Scientific, Cat.

NP0007) que contenía 100 mM DTT, y se trataron con calor a 70°C durante 10 minutos con el fin de preparar una muestra para someterla a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

[0096]

SDS-PAGE: Las muestras ya descritas se aplicaron a 4%-12% Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific, Cat. NP0323) NuPAGE (marca registrada) y se realizó electroforesis a un voltaje constante de 200 V en solución tampón de migración SDS MOPS NuPAGE (marca registrada) (Thermo Fisher Scientific, Cat. NP0001). Transferencia: La transferencia se efectuó poniendo una membrana de PVDF (Thermo Fisher Scientific, Cat. LC2005) en contacto con el gel después de la SDS-PAGE, y transferencia electroforética durante 70 minutos a 180 mA en XCell II Blot Module (Thermo Fisher Scientific, Cat. EI9051) lleno con solución tampón de transferencia NuPAGE (marca registrada) (Thermo Fisher Scientific, Cat. NP0006) que contenía 20% de metanol.

Bloqueo: La membrana, luego de la electroforesis, se bloqueó con Blocking One (Nacalai Tesque, Cat. 03953-95) durante una hora a temperatura ambiente.

Anticuerpo primario: La membrana se incubó con una solución de anticuerpo LAMP-1 anti-humano (Sino biological, Cat. 11215-RP01) diluido con un factor de dilución de 1.000 con solución tampón TBS Tween-20 (Thermo Fisher Scientific, Cat. 28360) que contenía 10% de Blocking One, y se agitó durante la noche a 4°C.

Anticuerpo secundario: La membrana se lavó con solución tampón TBS Tween-20. La membrana se incubó con una solución de pAb-HRP (cadena H + L) IgG anti-conejo (MBL, Cat. 458) diluida con un factor de dilución de 3.000 con solución tampón TBS Tween-20 que contenía 10% de Blocking One y se agitó a temperatura ambiente durante una hora.

Detección: La membrana se lavó con solución tampón TBS Tween-20. Los immunoblots se desarrollaron por reactivo de detección ECL prime western blotting (GE Healthcare, Cat. RPN2232), y se detectó una imagen con LumiVision PRO 400EX (Aisin Seiki Co., Ltd.). En la imagen, se detectó una banda sensible al anticuerpo LAMP-1 anti-humano correspondiente a la proteína quimérica.

[0097]

Como resultado del ensayo ya descrito, introduciendo el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 en la estirpe celular 293T derivada de riñón embrionario humano, se comprobó que la proteína quimérica LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 se expresó en las células.

[0098]

[Ejemplo 3: Inducción de la producción de anticuerpo IgG2a mediante administración del plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3]

La evaluación *in vivo* de la inducción de la producción de anticuerpo IgG2a se efectuó en ratones. En ocho ejemplos en cada grupo, se administraron 25 μ L de una solución PBS que contenía 5 μ g de plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3, en un grupo de plásmido multivalente, en la oreja de un ratón hembra BALB/c de seis semanas de nacido, lo cual se produce al inicio de la administración (Charles River Laboratories Japan, Inc.), intradérmicamente tres veces cada semana (Día 0, 7, y 14). Tres semanas después de la última dosis (Día 35), se recogió sangre, y se obtuvieron muestras de plasma. Con fines de comparación, como un grupo mixto de plásmido monovalente, se administraron 25 μ L de solución PBS que contenía una mezcla de 5 μ g de plásmido LAMP-Lit v 1 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos incluyendo las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1 a 380 del SEQ ID NO: 2 (designada, en lo sucesivo, como un N-terminal de LAMP-1 en Ejemplos 3 y 4), una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno Lit v 1 conformado por los números de aminoácidos 383 a 666 del SEQ ID NO: 2, y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 1048 a 1082 del SEQ ID NO: 2 (designado, en lo sucesivo, como un C-terminal de LAMP-1)), plásmido LAMP-Lit v 3 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos incluyendo las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica un N-terminal de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno Lit v 3 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 868 a 1044 del SEQ ID NO: 2, y una secuencia de nucleótidos que codifica un C-terminal de LAMP-1, y un plásmido LAMP-Lit v 4 (un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos incluyendo las siguientes secuencias de nucleótidos en este orden: una secuencia de nucleótidos que codifica un N-terminal de LAMP-1, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno Lit v 4 conformado por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 671 a 863 del SEQ ID NO: 2, y una secuencia de nucleótidos que codifica un C-terminal de LAMP-1 (designada, en lo sucesivo, como un plásmido monovalente), y 25 μ L de PBS como un grupo de control. Se midió un valor cuantitativo de anticuerpos por un método ELISA usando una muestra de plasma diluida con un factor de dilución de 10, 100 o 1.000 con PBS que contenía 1% BSA (Sigma-Aldrich, Cat. A8022). El valor cuantitativo de anticuerpos se calculó usando plasma estándar, el cual contiene una elevada cantidad de anticuerpos específicos de Lit v 1, Lit v 3, y Lit v 4 preparados de un ratón inmunizado con un

antígeno de camarón (Greer, Cat. RMF34P), y el citado plasma estándar se diluyó serialmente para preparar una curva de calibración. En ese momento, el valor cuantitativo de los anticuerpos IgG2a específico de cada alérgeno en el plasma estándar se fijó en 100 U/mL. La cuantificación ELISA se efectuó con base en un método ELISA general usando F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE (Nunc, Cat. 439454) como placa de ensayo. Lit v 1 que es una proteína natural extraída y purificada de camarón (INDOOR Biotechnologies, Cat. NA-STM-1) se preparó a 1 µg/mL con PBS, y proteína purificada recombinante Lit v 4 (Sysmex, Uniprot KB: C7A639) y Lit v 3 (Sysmex, Uniprot KB: B7SNI3) se prepararon a 2 µg/mL con PBS, luego se añadieron a la placa de ensayo a 50 µL/pocillo, y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar una placa de ensayo tres veces con solución tampón de lavado (PBS Tween-20 buffer, Thermo Fisher Scientific, Cat. 28352), se añadieron 100 µL/pocillo de PBS que contenía 1% de BSA y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Luego de lavar la placa de ensayo tres veces con la solución tampón de lavado, la muestra de plasma se añadió a 50 µL/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar la placa de ensayo tres veces con la solución tampón de lavado, se añadieron 50 µL/pocillo de un anticuerpo secundario diluido con un factor de dilución de 50.000 Anticuerpo de Detección de IgG2a anti-ratón (Bethyl Laboratories, Cat. A90-107P) en PBS que contenía 1% de BSA, y la placa de ensayo se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar la placa de ensayo tres veces con la solución tampón de lavado, se añadió una solución sustrato TMB Microwell Peroxidase Substrate System (Ceracare, Cat. 50-76-03) a 50 µL/pocillo, Lit v 1 se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, Lit v 3 se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y Lit v 4 se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos y, a continuación, se añadió una solución de terminación de la reacción (2M H₂SO₄) a 50 µL/pocillo con el fin de cuantificar la absorbancia a 450 nm.

[0099]

Como resultado del ensayo ya mencionado, administrando el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 (plásmido multivalente) a ratones, se confirmó (Fig. 1) la producción de anticuerpos IgG2a específicos de Lit v 1, Lit v 3, y Lit v 4, los cuales son similares a los de la administración mixta del plásmido monovalente. A partir de los resultados anteriores, se ha sugerido que el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 induce respuestas inmunitarias Th1 para todos los alérgenos codificados con el plásmido y produce la conmutación de clase de los linfocitos N activados al isotipo IgG2a.

[0100]

[Ejemplo 4: Inducción de la producción de IFN-γ e IL-4 por el plásmido

LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3]

Se evaluó la inducción de la producción de IFN- γ e IL-4 luego de la estimulación con alérgeno de esplenocitos recolectados de ratones a los que se administró el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3. Los ratones a los que se administró el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 usado en el Ejemplo 3 se sacrificaron 3 semanas después de la administración final (Día 35), y se recolectó el bazo. Se prepararon esplenocitos del bazo de acuerdo con un método general. Los esplenocitos preparados se suspendieron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Cat. R8758) que contenía 10% suero fetal bovino (Hyclone, Cat. SH30070.03) y penicilina – estreptomycin diluida con un factor de dilución de 100 (ThermoFisher, Cat. 15070063), y se cultivaron en placas de 96 pocillos a 8×10^5 células/pocillo. Para la estimulación del alérgeno, se utilizó una solución de extracto de camarón (extracto de punción alérgica para diagnóstico, Torii, número de aprobación (40A) 4688) o Lit v 1 (INDOOR Biotechnologies, Cat. NA-STM-1). La estimulación del alérgeno se condujo añadiendo la solución de extracto de camarón o Lit v 1 en pocillos en una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$ o 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, y se cultivó a 37°C bajo 5% CO_2 durante 72 horas. A continuación, se cuantificó la concentración de IFN- γ e IL-4 liberados de los esplenocitos en el sobrenadante de cultivo luego de la estimulación por el método ELISA. Una muestra de sobrenadante diluida con un factor de dilución de 10 con solución tampón TBS que contenía 0,1% BSA y 0,05% Tween 20 se usó para la cuantificación de IFN- γ , y una muestra de sobrenadante diluida con un factor de dilución de 3 con solución tampón PBS que contenía 1% BSA se usó para la cuantificación de IL-4. Como placa de ensayo para la cuantificación ELISA, se utilizó F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE. Como un kit ELISA, se utilizó IFN- γ DuoSet ELISA (R&D Systems, Cat. DY485) e IL-4 de ratón DuoSet ELISA (R&D Systems, Cat. DY 404). El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo anexo al kit ELISA. En el ensayo ya mencionado, la administración del plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 (plásmido multivalente) indujo la producción de IFN- γ específico de Lit v 1 o la solución de extracto de camarón en la misma medida que la administración de la mezcla de plásmido monovalente (Fig. 2). Por el contrario, la cantidad de IL-4 inducido en la solución de extracto de camarón o Lit v 1 administrando el plásmido multivalente y la mezcla de plásmidos monovalentes al ratón se situó bajo el límite inferior de detección (Fig. 3). Partiendo de los resultados ya indicados, se sugirió que el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 induce una respuesta inmunitaria del tipo Th1 en la cual son dominantes los linfocitos Th1.

[0101]

[Ejemplo 5: Efecto supresor del síntoma anafiláctico inducido por el antígeno de

camarón por el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3]

Con el fin de determinar el efecto terapéutico del plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 sobre la alergia, se evaluó el efecto supresor de los síntomas anafilácticos por el método descrito en detalle a continuación.

[0102]

(1) Sensibilización transdérmica del antígeno de camarón

El pelaje de la espalda de un ratón hembra BALB/c de 7 semanas de nacido (Japan Charles River) se rasuró con una maquinilla de cortar el pelo, y 60 µL de 4% SDS (Invitrogen, Cat. 15553035) preparado con agua milliQ se aplicaron a la espalda del ratón anestesiado mediante una pipeta. Después de regresarlo a la jaula y secarlo con aire, un antígeno de camarón (GREER, Cat. RNF34P) preparado con 1,5% NaHCO₃/PBS con una concentración de proteína de 5 mg/mL se aplicó en la espalda del ratón anestesiado mediante una pipeta en una cantidad de 0,3 mg/60 µL. Como control, seis ejemplos de ratones se bañaron con 60 µL de 1,5% de NaHCO₃/PBS en lugar del antígeno de camarón. Esta serie de operaciones se llevó a cabo tres veces en una semana durante dos semanas a partir de la fecha de inicio de la aplicación (Día 0, 2, 4, 7, 9, y 11). Con el fin de uniformar el nivel de sensibilización de cada grupo, se recolectaron muestras de plasma el Día 14, y se midieron los valores cuantitativos de anticuerpos IgE, IgG1, e IgG2 específicos de Lit v 1 de acuerdo con el método descrito en Ejemplo 3 y el método de cuantificación general descrito en un libro (immunoassay, from basic to advanced, Biochemical Assay Research Group, Norihiro Kobayashi, 2014), y se efectuó agrupamiento por el método de números iguales.

[0103]

(2) Inmunidad intradérmica con el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3

En las orejas de ocho ratones sensibilizados con antígeno de camarón agrupados en (1), 0,5 µg, 5 µg, 50 µg de plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 en 20 µL de PBS o 20 µL de PBS como control se administraron intradérmicamente cuatro veces por semana (Día 21, 28, 35, y 42). Análogamente, veinte µL de PBS se administraron intradérmicamente a seis ejemplos de ratones no sensibilizados.

[0104]

(3) Inducción de síntomas alérgicos por antígeno de camarón

El Día 50, el antígeno de camarón preparado a 0,5 mg/mL con 1,5% NaHCO₃/PBS se administró por vía intraperitoneal a 0,1 mg/200 µL por ratón, se midieron las temperaturas rectales antes de la administración, y 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, y 60 minutos después de la administración del antígeno usando un termómetro para ratones (A&D Company, Cat. AD-1687). Más aún, el síntoma alérgico observado 60 minutos después de la administración del antígeno

se calificó de 1 a 5. El diagnóstico del síntoma se llevó a cabo basándose en los criterios escritos en el documento (The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013, Vol. 131, p. 213-221).

[0105]

Con el fin de medir un grado de desgranulación de mastocitos, se recolectaron los plasmas 60 minutos después de la inducción de los síntomas alérgicos, y se cuantificó la concentración del plasma de la proteasa 1 en los mastocitos de ratón (mMCPT-1). Como el kit ELISA, se utilizó MCPT-1 Uncoated ELISA de ratón (Thermo Fisher Scientific, Cat. 88-7503), y la medición se realizó de acuerdo con el protocolo anexo. Como una placa de ensayo para la cuantificación ELISA, se utilizó F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE. Como valores de medición, se utilizaron para la cuantificación muestras de plasma diluidas con un factor de dilución de 10, 200, y 40.000 con un diluyente contenido en el kit, y se seleccionaron los resultados en un intervalo de curva de calibración de muestra estándar contenido en el kit.

[0106]

A partir de los resultados del ensayo ya indicado, se demostró que el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 suprimió la caída en la temperatura corporal debido a la administración del antígeno de camarón y alivió los síntomas alérgicos, comparado con el grupo de control en ratón (Fig. 4). Adicionalmente, se confirmó que la desgranulación en el plasma 60 minutos después de la inducción de síntomas se suprimió por la administración del plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 (Fig. 5). Estos resultados indican que el plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3 puede utilizarse para un tratamiento terapéutico.

Posibilidad de Aplicación Industrial

[0107]

Se espera que el ácido nucleico de la presente invención sea útil para la prevención o el tratamiento de alergia a los mariscos. Por lo demás, el método para producir el ácido nucleico de la presente invención es útil para producir el ácido nucleico.

Texto Libre del Listado de Secuencias

[0108]

El encabezado numérico <223> en el siguiente listado de secuencias ilustra la descripción de "Artificial Sequence". Específicamente, la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias es una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit

v 3, y la secuencia de aminoácidos representada por el SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias es la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos del plásmido LAMP-Lit v 1-Lit v 4-Lit v 3.

Resumen

[Resumen]

[Problema] Proveer un ácido nucleico del que se espera que sea útil para tratar la alergia a los mariscos.

[Medios a resolverse] Se provee un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de estabilización intraorganelo de LAMP, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de alérgeno que comprende Lit v 1, Lit v 4, y Lit v 3, una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana y una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de LAMP en este orden.

[Figura Seleccionada] Ninguna