

(22) Data de pedido: **2007.06.11**

(30) Prioridade(s): **2006.06.09 US 812145 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.05.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.08.31**  
**210/2011**

(73) Titular(es):

**NOVARTIS AG**

**LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL**

**CH**

(72) Inventor(es):

**DOMENICO MAIONE**

**US**

**NATHALIE NORAIS**

**US**

**GUIDO GRANDI**

**US**

**VINCENZO NARDI-DEI**

**IT**

(74) Mandatário:

**MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA**

**AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA**

**PT**

(54) Epígrafe: **CONFÓRMEROS DE ADESINAS BACTERIANAS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO DIZ RESPEITO A CONFÓRMEROS DE ADESINA BACTERIANA, ISOLADOS OU PURIFICADOS, DE PREFERÊNCIA COM MELHOR ESTABILIDADE E/OU IMUNOGENICIDADE. DE ACORDO COM UM ASPECTO PREFERENCIAL, A INVENÇÃO DIZ RESPEITO A UM CONFÓRMERO F ISOLADO DE ADESINA BACTERIANA. A INVENÇÃO PROPORCIONA TAMBÉM PROCESSOS PARA ISOLAR E/OU SEPARAR TAIS CONFÓRMEROS DE ADESINA. AS COMPOSIÇÕES PODEM CONTER UM OU VÁRIOS POLIPÉPTIDOS IMUNOGÉNICOS, QUER POR SI SÓS QUER CONJUNTAMENTE COM OUTROS COMPONENTES ANTIGÉNICOS. POR EXEMPLO, OS POLIPÉPTIDOS IMUNOGÉNICOS PODEM SER COMBINADOS COM OUTROS ANTIGÉNIOS BACTERIANOS PARA PROPORCIONAREM COMPOSIÇÕES TERAPÊUTICAS COM ESPECTRO DE APLICAÇÃO MAIS AMPLO.

**RESUMO****"CONFÓRMEROS DE ADESINAS BACTERIANAS"**

A invenção diz respeito a confórmeros de adesina bacteriana, isolados ou purificados, de preferência com melhor estabilidade e/ou imunogenicidade. De acordo com um aspecto preferencial, a invenção diz respeito a um confórmero F isolado de adesina bacteriana. A invenção proporciona também processos para isolar e/ou separar tais confórmeros de adesina. As composições podem conter um ou vários polipéptidos imunogénicos, quer por si sós quer conjuntamente com outros componentes antigénicos. Por exemplo, os polipéptidos imunogénicos podem ser combinados com outros antigénios bacterianos para proporcionarem composições terapêuticas com espectro de aplicação mais amplo.

## DESCRIÇÃO

### "CONFÓRMEROS DE ADESINAS BACTERIANAS"

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção diz respeito a confórmeros de adesinas bacterianas isoladas ou purificadas, de preferência com melhor estabilidade e/ou imunogenicidade. De acordo com um aspecto preferencial, a invenção diz respeito a um confórmero F de uma adesina bacteriana isolada, em que a adesina bacteriana isolada é a GB580.

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

As proteínas são polímeros biológicos que se dobras em estruturas tridimensionais complexas. A hierarquia clássica da estrutura das proteínas tem quatro níveis, designadamente: (i) a estrutura primária - a sequência de aminoácidos que constituem a proteína, (ii) a estrutura secundária - a estrutura tridimensional local do esqueleto peptídico que pode compreender hélices  $\alpha$ , folhas  $\beta$ , hélices  $3_{10}$  e hélices  $\Pi$ , (iii) a estrutura terciária - a estrutura tridimensional global de toda a proteína ou de uma subunidade proteica (isto é, todos os átomos) e (iv) a estrutura quaternária - a relação tridimensional de subunidades ou proteínas num complexo proteico. Cada proteína pode existir em conformações múltiplas (ou "confórmeros"), consoante as condições locais, podendo co-existir em equilíbrio múltiplos confórmeros. O exemplo mais simples de confórmeros proteicos são as conformações

dobradas e desdobradas de uma proteína. Há inúmeras proteínas com conformações múltiplas dobradas. Por exemplo, a tubulina  $\alpha$  e a tubulina  $\beta$  são subunidades que podem polimerizar para formarem microtúbulos. Tal polimerização modifica a estrutura quaternária da tubulina e representa, conseqüentemente, um conformero alternativo de tubulina. Além disso, há determinadas proteínas que têm conformações com diferentes estruturas secundárias, tais como determinadas proteínas amilóides que se convertem de proteínas solúveis, com uma estrutura secundária predominantemente helicoidal  $\alpha$ , em fibrilhas compridas e insolúveis com uma estrutura secundária predominantemente em folha  $\beta$ .

Ao fazer-se a purificação de proteínas provenientes de um organismo hospedeiro, é normalmente difícil separar os diferentes conformeros de uma proteína, uma vez que as propriedades físicas dos diferentes conformeros são bastante semelhantes. Quando se procura resolver o problema da expressão de proteínas heterólogas, isso pode ser exacerbado pelo facto de ao organismo heterólogo lhe faltarem as necessárias chaperoninas que ajudam a fazer o dobramento, enzimas que modifiquem a proteína após a tradução e outros co-factores que ajudem a fazer a interconversão entre conformeros, tais como cinases que acrescentam grupos fosfato à proteína, de modo a que esta passe de uma forma inactiva para uma forma activa ou vice-versa. Os problemas potenciais existentes são o dobramento incorrecto, a instabilidade, a insolubilidade (formação dos chamados corpos de inclusão) e inaptidão para a geração de determinados conformeros sem co-expressão de co-factores. Mesmo no caso em que o organismo heterólogo consegue

expressar o confórmero relevante, também podem ser expressos outros confórmeros, o que faz com que seja difícil fazer a separação do confórmero relevante, dadas as propriedades biofísicas semelhantes.

A conformação das proteínas é particularmente importante para a produção de proteínas terapêuticas e de proteínas como componentes de vacinas. Na produção industrial, recentemente implementada, de proteínas terapêuticas elegíveis ou de vacinas recombinantes elegíveis, com elevada produtividade e elevado rendimento, são agora vulgarmente utilizados sistemas de expressão à base de *E. coli*. As vantagens principais destes sistemas são a velocidade, a simplicidade e o baixo custo de produção de proteínas recombinantes, mais o conhecimento exaustivo dos processos celulares básicos deste microrganismo hospedeiro. Este hospedeiro permite uma manipulação fácil da expressão proteica e proporciona a possibilidade de interferência operacional para melhorar o rendimento e a qualidade das proteínas que irão ser expressas. Mais ainda, apesar da similaridade geral da biosíntese proteica para todas as espécies vivas, a estirpe *E. coli* não é um hospedeiro universal que consiga produzir grandes quantidades de todas as proteínas derivadas de outras espécies, devido às diferenças entre as maquinarias traduccionais e/ou pós-traduccionais que conseguem afectar as conformações proteicas produzidas, conforme explicitado anteriormente.

As dificuldades na expressão e na purificação de proteínas em conformações desejadas são particularmente importantes no caso das proteínas destinadas a serem utilizadas como componentes de vacinas. A antigenicidade de

uma proteína não depende necessariamente da estrutura tridimensional dessa proteína, por exemplo, quando são encontradas porções antigénicas de uma proteína numa região fechada que não dependa da estrutura tridimensional geral ou quando a antigenicidade relevante depende da apresentação de fragmentos peptídicos por moléculas do MHC. No entanto, em alguns casos, as propriedades antigénicas de um antigénio dependem da forma tridimensional que possa ser encontrada em apenas uma conformação ou num número limitado de conformações da proteína. Assim sendo, para se maximizar a antigenicidade de tais componentes proteicos de vacinas, é pois necessário identificar a conformação ou as conformações que sejam mais antigénicas e determinar protocolos para purificar ou isolar preparações de proteínas enriquecidas com a conformação ou as conformações desejadas.

Para o desenvolvimento de uma vacina considera-se particularmente preferível a classe de antigénios representada pela classe de adesinas. As adesinas são um grupo de antigénios expostos à superfície, implicados na adesão e colonização de tecidos hospedeiros.

As requerentes identificaram anteriormente locais de ilhas de adesinas num genoma de *Streptococcus agalactiae* ("GBS"). Os polipéptidos codificados por estes locais são úteis em composições para o tratamento ou para a prevenção de uma infecção com GBS. Foram identificadas sequências semelhantes em outras bactérias gram-positivas, as quais podem ser utilizadas em composições imunogénicas para o tratamento ou para a prevenção de uma infecção com bactérias gram-positivas. As proteínas identificadas na superfície das ilhas de adesinas apresentam-se normalmente

montadas em estruturas poliméricas de elevado peso molecular, tais como os *pili*. Demonstrou-se que a GBS 80, uma das adesinas identificadas no microrganismo GBS, é altamente protectora, em estudos imunológicos.

Nos últimos 20 anos o GBS foi a causa principal de sépsis e meningite neonatal, afectando entre 0,5-3 crianças por cada 1000 nados-vivos, e é uma causa importante de morbidade entre o grupo de idade mais avançada, afectando entre 5-8 por cada 100 000 pessoas. As estratégias actuais de combate à doença assentam na administração de antibióticos intraparto e na monitorização neonatal, o que permitiu reduzir os casos de mortalidade neonatal desde mais de 50% por volta de 1970 para menos de 10% por volta de 1990. No entanto, continua a haver uma morbidade e uma mortalidade consideráveis e o combate a esta doença é dispendioso. Entre 15-35% das mulheres grávidas são portadoras assintomáticas, havendo o risco elevado de transmitirem a doença aos seus bebés. O risco de infecção neonatal está associado a uma quantidade diminuta de anticorpos maternos específicos do serotipo, admitindo-se que concentrações elevadas sejam protectoras. Além disso, a doença invasiva provocada por GBS tem vindo a ser identificada com maior frequência em adultos idosos com doenças subjacentes, tais como diabetes e cancro.

A letra "B" em "GBS" refere-se à classificação de Lancefield que se baseia na antigenicidade de um hidrato de carbono que seja solúvel num ácido diluído, ao qual se chama hidrato de carbono C. Lancefield identificou 13 tipos de hidratos de carbono C designados pelas letras de A a O, que podem ser serologicamente diferenciados; os organismos que mais frequentemente infectam os seres humanos são os

dos grupos A, B, D e G. As estirpes do grupo B podem ser divididas pelo menos em 9 serotipos (Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII e VIII) com base na estrutura das suas cápsulas polissacarídicas. No passado, os serotipos Ia, Ib, II e III foram igualmente dominantes no corrimento vaginal normal e no aparecimento precoce de sépsis em recém-nascidos. No entanto, o GBS de tipo V surgiu como causa importante de infecção por GBS nos EUA, tendo as estirpes dos tipos VI e VIII passado a ser dominantes entre as mulheres japonesas.

Foi já publicada a sequência do genoma de uma estirpe 2603 V/R do serotipo V (Tettelin et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10.1 073/pnas. 182380799) e foram já identificados diversos polipéptidos utilizáveis como antigénios vacinais (WO02/34771). Todavia, as vacinas vulgarmente utilizadas em ensaios clínicos baseiam-se em antigénios polissacarídicos. Há, neste caso, os inconvenientes da especificidade serotípica e fraca imunogenicidade, pelo que é necessário procurar vacinas eficazes contra as infecções provocadas por *S. agalactiae*. O documento WO 05/028618 descreve composições vacinais que compreendem combinações de antigénios de GBS que incluem a GBS 80.

Constitui um objectivo da presente invenção proporcionar mais e melhores composições que confirmam imunidade contra doenças e/ou infecções provocadas por bactérias patogénicas, incluindo *S. agalactiae*. De acordo com um aspecto da invenção, as composições baseiam-se no isolamento de confórmeros de adesinas que possuam melhor estabilidade, conformação e imunogenicidade, estando prevista a sua utilização em composições terapêuticas ou profiláticas.

**DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO**

O presente pedido de patente de invenção identifica simultaneamente um problema - as adesinas bacterianas são expressas em conformações múltiplas que possuem diferentes antigenicidades - e apresenta a solução de proporcionar processos para isolar e fazer a interconversão dos confórmeros. Assim, em termos gerais, pode dizer-se que um aspecto da invenção reside no facto de as isoformas de GBS 80 possuírem, preferencialmente, uma melhor estabilidade e/ou imunogenicidade.

As referidas isoformas preferenciais, aqui designadas por "confórmero F", têm propriedades estruturais distintas e podem ser isoladas a partir de outras isoformas associadas, recorrendo a diferentes técnicas cromatográficas. A adesina GBS 80, um membro representativo da família de adesinas de *S. agalactiae*, pode ser separada em qualquer uma de duas isoformas por cromatografia de permuta aniónica. Mais concretamente, o confórmero F mais estável é purificado a partir da isoforma menos estável "confórmero A", tirando proveito da sua inaptidão para ficar retido numa coluna de 'Q-Sepharose' de permuta de iões, sendo retido por hidroxapatite. De acordo com uma forma de realização, um confórmero F de GBS 80 purificado caracteriza-se pelo facto de ser separado facilmente como banda única por electroforese não desnaturante em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Ainda de acordo com uma outra forma de realização, efectua-se a eluição de um confórmero F de GBS 80 isolado sob a forma de um pico singular monodisperso, por cromatografia de exclusão

dimensional (SEC). De acordo com uma outra forma de realização, um confórmero F de GBS 80 isolado apresenta maior resistência à digestão com proteases do que o confórmero A.

De acordo com um seu aspecto, a presente invenção proporciona a GBS 80 isolada e/ou separada, compreendendo o confórmero F ou o confórmero A, em que o confórmero de GBS 80, preferencialmente, é capaz de gerar uma resposta imune num indivíduo. Em formas de realização preferenciais, a adesina bacteriana irá ser um homólogo de GBS 80 ou, mais preferencialmente, um ortólogo ou um parólogo. De preferência, a homologia de tal homólogo, ortólogo ou parólogo irá corresponder pelo menos a uma identidade de cerca de 60%, pelo menos uma identidade de cerca de 70%, pelo menos uma identidade de cerca de 80%, pelo menos uma identidade de cerca de 85%, pelo menos uma identidade de cerca de 90%, pelo menos uma identidade de cerca de 92,5%, pelo menos uma identidade de cerca de 95%, pelo menos uma identidade de cerca de 96%, pelo menos uma identidade de cerca de 97%, pelo menos uma identidade de cerca de 98% ou pelo menos uma identidade de cerca de 99%. Em diversas formas de realização, a GBS 80 pode ser produzida por via recombinante, de preferência por expressão bacteriana, tal como a expressão em *E. coli*. Em algumas formas de realização, a GBS 80 em confórmero F pode apresentar uma ou várias das características seguintes: não ser retida numa coluna de 'Q-Sepharose', ser retida por uma coluna de hidroxiapatite, apresentar-se como uma banda singular com peso molecular aparente menor em SDS-PAGE na ausência de desnaturação térmica, comparativamente com a adesina bacteriana após a desnaturação térmica, sendo mais

resistente à digestão com proteases do que a GBS 80 em confórmero A, decorrendo a sua eluição, a partir de uma coluna de cromatografia de exclusão dimensional, sob a forma de um pico singular monodisperso. Em formas de realização preferenciais, o confórmero de GBS 80 irá estar praticamente isento de outros confórmeros, incluindo, a título de exemplo, mas sem qualquer limitação, a GBS 80 em confórmero F substancialmente isenta de GBS 80 em confórmero A que irá ser preferencialmente inferior pelo menos a cerca de 20% de confórmero A, inferior pelo menos a cerca de 15% de confórmero A, inferior pelo menos a cerca de 10% de outros confórmeros, pelo menos cerca de 5% de outros confórmeros, pelos menos cerca de 2% de outros confórmeros ou pelo menos cerca de 1% de outros confórmeros da proteína. De acordo com outras formas de realização, a GBS 80 pode não estar totalmente isenta de outros confórmeros, referindo-se, a título de exemplo, que a GBS 80 em confórmero F pode ter entre cerca de 20% e cerca de 1%, entre cerca de 15% e cerca de 1%, entre cerca de 10% e cerca de 1%, entre cerca de 5% e cerca de 1% ou entre cerca de 2% e cerca de 1% de GBS 80 em confórmero A.

Em formas de realização preferenciais, a GBS 80 da presente invenção irá ser capaz de gerar uma resposta imune num organismo destinatário, tal como uma ave ou um mamífero, de preferência um ser humano. Mais preferencialmente, a GBS 80 irá conferir a um organismo destinatário uma imunidade passiva e/ou uma imunidade activa.

Em algumas formas de realização, as composições de GBS 80 da presente invenção podem conter, suplementarmente, outros polipéptidos imunogénicos obtidos a partir de GBS 80

(incluindo, sem nenhuma limitação, polipéptidos e polissacarídeos) ou outros agentes patogénicos.

De acordo com um outro seu aspecto, a presente invenção proporciona processos para separar ou isolar a GBS 80 de um confórmero particular. Uma forma de realização preferencial de tais processos consiste em arranjar uma amostra que contenha uma mistura de GBS 80 em dois ou mais confórmeros e separar os dois ou vários confórmeros, recorrendo a uma tecnologia de separação escolhida entre o grupo constituído por uma tecnologia de separação de permuta aniónica, uma tecnologia de separação à base de hidroxiapatite e uma tecnologia de separação com base no coeficiente de atrito. Como exemplos de tecnologias de separação com base no coeficiente de atrito refere-se a electroforese em gel, a cromatografia de exclusão dimensional, fraccionamento de fluxo do processo e centrifugação de sedimentação a alta velocidade.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a anticorpos que se ligam especificamente a qualquer GBS 80 da presente invenção, ou que a reconhecem. Em determinadas formas de realização, tais anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais. Em algumas formas de realização, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo totalmente humano. Em algumas formas de realização, o anticorpo pode ligar-se especificamente a um confórmero e a mais nenhum outro, por exemplo, pode ocorrer a ligação ao confórmero F e não ao confórmero A. Descreve-se adiante, de maneira mais minuciosa, outras formas de realização, tomando em consideração anticorpos, processos de preparação, processos

de análise e pesquisa e processos para a utilização de tais anticorpos.

Conforme adiante se descreve mais minuciosamente, há outros aspectos da presente invenção que abrangem processos para a utilização das adesinas bacterianas, anteriormente mencionadas, como (a) medicamentos para tratar ou prevenir infecções provocadas por bactérias *Streptococcus*; (b) exames de diagnóstico ou de imunodiagnóstico para a detecção da presença de bactérias *Streptococcus* ou de anticorpos criados e desenvolvidos contra bactérias *Streptococcus*; e/ou (c) reagentes que possam levar à produção de anticorpos contra bactérias *Streptococcus*.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a processos para analisar e pesquisar e/ou testar péptidos de adesinas bacterianas num confórmero particular para a geração de uma resposta imune, para a imunização activa ou para a imunização passiva num organismo destinatário. Em alguns aspectos, o texto descrito prevê que se faça contactar ou que se administre a composição de GBS 80 da presente invenção ao organismo destinatário e a detecção de anticorpos nesse organismo destinatário que reconheçam a composição de adesinas bacterianas. Em alguns aspectos, o organismo destinatário irá ser estimulado com bactérias *Streptococcus* para se determinar se tal organismo destinatário tem imunidade activa ou imunidade passiva. Tais processos de análise e pesquisa podem ser aplicados a qualquer uma das composições da presente invenção, incluindo, sem nenhuma limitação, anticorpos de GBS 80 para GBS 80 e composições farmacêuticas para imunogenicidade ou antigenicidade. Um aspecto preferencial de tais processos de análise e pesquisa consiste em arranjar as adesinas

bacterianas e analisar e pesquisar o polipeptido para se investigar a antigenicidade ou a imunogenicidade. No caso de se pretender analisar e pesquisar mais do que uma adesina bacteriana, é possível recorrer a um critério que permita escolher uma ou várias adesinas bacterianas para utilização posterior. Tais critérios podem servir para escolher entre duas ou mais adesinas bacterianas, três ou mais adesinas bacterianas, cinco ou mais adesinas bacterianas, dez ou mais adesinas bacterianas ou vinte ou mais adesinas bacterianas.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, esta proporciona composições farmacêuticas que contêm a GBS 80 ou anticorpos da presente invenção numa quantidade terapeuticamente eficaz (ou numa quantidade imunologicamente eficaz numa vacina). Em determinadas formas de realização, as composições farmacêuticas irão ser vacinas. As vacinas farmacêuticas também podem incorporar veículos farmacêuticamente aceitáveis, incluindo adjuvantes.

### **DESCRIÇÃO MINUCIOSA DA INVENÇÃO**

Na prática da presente invenção irão ser utilizados, salvo quando especificado de outro modo, os processos convencionais da química, bioquímica, biologia molecular, imunologia e farmacologia, conhecidos pelos especialistas na matéria. Tais técnicas estão descritas e explicadas exaustivamente na literatura. Ver, *v.g.*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19<sup>a</sup> Edição (1995); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); e Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C.

Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed. (Ausubel et al. eds., 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters and Dalrymple, Fields Virology (2ª ed), Fields et al. (eds.), B.N. Raven Press, New York, NY.

Tal como aqui utilizado, o termo "confórmero" designa isoformas isoladas de uma adesina bacteriana, tal como a GBS 80, e seus fragmentos que tenham as mesmas sequências de aminoácidos ou sequências semelhantes, mas propriedades biofísicas distintas e/ou diferente imunogenicidade, conforme determinado, por exemplo, por cromatografia de exclusão dimensional (SEC).

Tal como aqui utilizado, o termo "adesinas bacterianas" designa proteínas pertencentes ao conjunto de proteínas bacterianas expostas à superfície que estejam implicadas na adesão ao tecido do hospedeiro e na colonização.

Tal como aqui utilizado, o termo "adesinas bacterianas gram-positivas" designa adesinas bacterianas de bactérias gram-positivas. As bactérias gram-positivas preferíveis são *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *C. difficile*, *L. monocytogenes* ou *C. diphtheriae*.

Tal como aqui utilizado, o termo "homólogo da adesina bacteriana GBS 80 " designa a proteína GBS 80 e todas as proteínas conotadas com a GBS 80 por descenderem de uma

sequência de ADN ancestral comum que codifica a proteína ancestral. O termo "homólogo" pode ser aplicado à relação entre genes separados por um caso de evolução das espécies e à relação entre genes separados pelo caso de duplicação genética. Um especialista na matéria sabe como reconhecer facilmente homólogos de GBS 80, com base na comparação das sequências de aminoácidos ou das sequências de ácidos nucleicos que codificam as proteínas. De preferência, essa homologia irá ser pelo menos correspondente a uma identidade de cerca de 60%, pelo menos uma identidade de cerca de 70%, pelo menos uma identidade de cerca de 80%, pelo menos uma identidade de cerca de 85%, pelo menos uma identidade de cerca de 90%, pelo menos uma identidade de cerca de 92,5%, pelo menos uma identidade de cerca de 95%, pelo menos uma identidade de cerca de 96%, pelo menos uma identidade de cerca de 97%, pelo menos uma identidade de cerca de 98% ou pelo menos uma identidade de cerca de 99%.

Tal como aqui utilizado, o termo " ortólogo da adesina bacteriana GBS 80" refere-se à proteína GBS 80 e a todas as proteínas de outras espécies bacterianas que tenham evoluído a partir de um gene ancestral comum, por fenómenos de evolução das espécies. Tais ortólogos irão conservar a mesma função no decurso da evolução. Um especialista na matéria sabe como reconhecer facilmente ortólogos de GBS 80, enquanto homólogos noutras espécies bacterianas que possuam uma homologia muito elevada com a GBS 80. De preferência, essa homologia irá corresponder a uma identidade pelo menos igual a cerca de 60%, a uma identidade pelo menos igual a cerca de 70%, a uma identidade pelo menos igual a cerca de 80%, a uma identidade pelo menos igual a cerca de 85%, a uma

identidade pelo menos igual a cerca de 90%, a uma identidade pelo menos igual a cerca de 92,5%, a uma identidade pelo menos igual a cerca de 95%, a uma identidade pelo menos igual a cerca de 96%, a uma identidade pelo menos igual a cerca de 97%, a uma identidade pelo menos igual a cerca de 98% ou a uma identidade pelo menos igual a cerca de 99%.

Tal como aqui utilizado, o termo "parólogo da adesina bacteriana GBS 80 " refere-se à proteína GBS 80 e a todas as proteínas da mesma espécie bacteriana que tenham evoluído a partir de um gene ancestral comum por duplicação de genes. Tais parálogos são genes conotados entre si por duplicação no interior de um genoma e consequentemente irão ter e desempenhar papéis funcionais bastante semelhantes, mas frequentemente distintos. Um especialista na matéria sabe como reconhecer facilmente os parálogos de GBS 80, enquanto homólogos noutra espécie bacteriana que tenha uma homologia muitíssimo elevada com a GBS 80. De preferência, essa homologia irá corresponder a uma identidade pelo menos igual a cerca de 60%, uma identidade pelo menos igual a cerca de 70%, uma identidade pelo menos igual a cerca de 80%, uma identidade pelo menos igual a cerca de 85%, uma identidade pelo menos igual a cerca de 90%, uma identidade pelo menos igual a cerca de 92,5%, uma identidade pelo menos igual a cerca de 95%, uma identidade pelo menos igual a cerca de 96%, uma identidade pelo menos igual a cerca de 97%, uma identidade pelo menos igual a cerca de 98% ou uma identidade pelo menos igual a cerca de 99%. A título de exemplo, mas sem nenhuma limitação, a GBS 59 é um parólogo da adesina bacteriana GBS 80.

As definições apresentadas para homólogos da adesina bacteriana GBS 80, ortólogos da adesina bacteriana GBS 80 e parálogos da adesina bacteriana GBS 80 são definições representativas das adesinas bacterianas aqui descritas e as proteínas GBS 59, GBS 104 e GBS 67 têm definições correspondentes que podem ser utilizadas em vez das definições da GBS 80 ao longo da presente memória descritiva. A título de exemplo, sem nenhuma limitação, o termo "homólogo da adesina bacteriana GBS 80", tal como utilizado no capítulo 'Descrição Abreviada da Invenção' pode ser substituído pelo termo "homólogo da adesina bacteriana GBS 59".

#### ADESINAS

Conforme se disse anteriormente, a invenção diz respeito aos confórmeros de GBS 80, aos processos para separar e isolar esses confórmeros e às aplicações de tais confórmeros. As adesinas constituem uma grande classe heterogênea de proteínas da superfície, implicadas na adesão e colonização dos tecidos hospedeiros por bactérias gram-positivas e gram-negativas. A aderência aos tecidos hospedeiros é um determinante fundamental da virulência para bactérias patogênicas, sendo conhecidos na especialidade muitos mecanismos de adesão.

Há um aparelho de adesão particularmente eficaz que é representado em diversos agentes patogênicos por fímbrias ou *pili*. Estes componentes são organelos bacterianos adesivos que habilitam as bactérias a fixarem-se em tecidos hospedeiros especiais e a colonizá-los. São estruturas superficiais compridas e filiformes produzidas pela montagem ordenada de diferentes elementos constituintes,

incluindo as adesinas. A exposição superficial e o papel fundamental que estas proteínas têm na patogénese faz com que sejam uma opção particularmente atractiva para composições imunogénicas e vacinas. Há muitas destas vacinas conhecidas na especialidade. Os *pili*, sobre os quais se sabe desde há muito tempo que são importantes para as bactérias gram-negativas capsuladas, tais como *Neisseria spp.*, foram também assinalados e descritos em bactérias gram-positivas, tais como *Corynebacterium diphtheriae*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus pyogenes*. Nestas espécies, os *pili* são formados pela reticulação covalente de subunidades proteicas, devido à acção de enzimas sortases que clivam proteínas que contenham o motivo sequencial LPXTG entre os resíduos T e G e que depois ligam a proteína clivada ao grupo amino  $\epsilon$  de uma lisina conservada num motivo pilina (VYPKN) nos próprios componentes da pilina. As enzimas sortases também catalisam o acoplamento covalente de proteínas LPXTG à parede celular dos peptidoglicanos. As subunidades de adesina desta família são observadas frequentemente numa forma aglomerada, constituindo uma ilha genómica.

#### GBS 80

A GBS 80 é uma adesina bacteriana preferencial da presente invenção. O termo 'GBS 80' designa uma proteína putativa da família ancorada à superfície da parede celular e é uma das subunidades constituintes de uma estrutura de *pilus*. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos da adesina GBS 80, obtidas a partir da estirpe 2603 V/R

isolada de serotipo V podem ser encontradas no documento WO04041157. Estas sequências também estão explicitadas adiante com as designações de SEQ ID NOS 1 e 2:

**SEQ ID NO. 1**

ATGAAATTATCGAAGAAGTTATTGTTTTCGGCTGCTGTTTTAAACAATGGTGGCGGGGTCAACTGTTGAACCAG  
TAGCTCAGTTTTCGACTGGAATGAGTATGTAAAGAGCTGCAGAAGTGTACACAAGAACCCAGCGAAAACAAC  
AGTAAATATCTATAAATTACAAGCTGATAGTTATAAATCGGAAATTACTTCTAATGGTGGTATCGAGAATAAA  
GACGGCGAAGTAATATCTAACTATGCTAACTTGGTGACAATGTAAAAGGTTGCAAGGTGTACAGTTTAAAC  
GTTATAAAGTCAAGACGGATATTTCTGTGATGAATTGAAAAAATTGACAACAGTTGAAGCAGCAGATGCAAA  
AGTTGGAACGATTCTTGAAGAAGGTGTCAGTCTACCTCAAAAACTAATGCTCAAGGTTTGGTCGTCGATGCT  
CTGGATTCAAAAAGTAATGTGAGATACTTGTATGTAGAAGATTTAAAGAATTCACCTTCAAACATTACCAAAG  
CTTATGCTGTACCGTTTGTGTTGGAATTACCAGTTGCTAATCTACAGGTACAGGTTCCCTTTCTGAAATTAA  
TATTTACCCATAAAAACGTTGTAACFGATGAACCAAAAACAGATAAAGATGTTAAAAAATTAGGTGAGGACGAT  
GCAGGTTATACGATTGGTGAAGAATTCAAATGGTCTTGAATCTACAATCCCTGCCAATTTAGGTGACTATG  
AAAAATTTGAAATTACTGATAAATTTGCAGATGGCTTGACTTATAAATCTGTTGGAAAAATCAAGATTGGTTC  
GAAAACACTGAATAGAGATGAGCACTACACTATTGATGAACCAACAGTTGATAACCAAAAATACATTAATAAAT  
ACGTTTAAACCAGAGAAATTTAAAGAAATGCTGAGCTACTTAAAGGAATGACCCCTGTTAAAAATCAAGATG  
CTCTTGATAAAGCTACTGCAAATACAGATGATGCGGCATTTTTGGAAATTCAGTTGCATCAACTATTAATGA  
AAAAGCAGTTTTAGGAAAAGCAATGAAAATACTTTTGAACCTCAATATGACCATACTCCTGATAAAGCTGAC  
AATCCAAAACCATCTAATCCTCCAAGAAAACAGAAGTTCATACTGGTGGGAAACGATTTGTAAAGAAAGACT  
CAACAGAAACACAAACACTAGGTGGTGGTGTGAGTTTGGCTTCTGATGGGACAGCAGTAAAATGGAC  
AGATGCTCTTATAAAGCGAATACTAATAAAAACTATATTGCTGGAGAAGCTGTTACTGGGCAACCAATCAA  
TTGAAATCACATACAGACGGTACGTTTGAGATTAAGGTTTGGCTTATGCAGTTGATGCGAATGCAGAGGGTA  
CAGCAGTAACCTACAAATTAAGAAACAAAAGCACCAGAAGTTATGTAATCCCTGATAAAGAAATCGAGTT  
TACAGTATCACAAACATCTTATAATACAAAACCAACTGACATCACGGTTGATAGTCTGATGCAACACCTGAT  
ACAATTAAAAACAACAAACGTCCTTCAATCCCTAATACTGGTGGTATTGGTACGGCTATCTTTGTGCTATCG  
GTGCTGCGGTGATGGCTTTTGTGTTAAGGGGATGAAGCGTCTACAAAAGATAAC

**SEQ ID NO: 2**

MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSOERPAKTTVNIYKLQADSYKSEITSNNGGIENK  
DGEVINSYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAOGLVDDA  
LDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNIKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDPEKTDKDVKKLGQDD  
AGYTI GEEFKWFLKSTIPANLGDYEFKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKI  
TFKPEKFEIAELLKGM TLVKNQDALDKATANTDDAFL EIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKRAD  
NPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGA EFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIK  
LKSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAPEGYVVPDKEIEFTVVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD  
TIKNNRPS IPNTGGIGTAIFVAIGAAVMAFAVKGMKRRTKDN

Há aspectos da invenção que podem abranger fragmentos de GBS 80, tais como os descritos na publicação U.S. Prov. Ser. App. No. 60/812 145. Em alguns casos, a remoção de um ou vários domínios, tais como uma região de uma sequência líder ou de uma sequência de sinal, uma região transmembrana, uma região citoplásmica ou um motivo de ancoragem à parede celular, pode facilitar a clonagem do

gene que codifica o antigénio e/ou a expressão recombinante da proteína GBS. Além disso, os fragmentos que compreendam epítomos imunogénicos de antigénios de GBS podem ser utilizados nas composições da invenção.

A proteína GBS 80 contém uma região da sequência líder ou de sinal do terminal N que está indicada pela sequência sublinhada no início da sequência SEQ ID NO: 2, *supra*. De acordo com uma forma de realização, remove-se um ou vários aminoácidos da região da sequência líder ou de sinal da GBS 80. Como exemplo de um tal fragmento de GBS 80 indica-se adiante o que é designado por SEQ ID NO: 3:

**SEQ ID NO: 3**

AEVSQERPAAKTTVNIYKQLQADSYKSEITSNGGIENKDGCEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDEL  
 KKLTTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDALDSKSNVRYLYVEDLKNPSNITKAYAVPFVLELPVA  
 NSTGTGFLSEINIYPKNVVTDPEKTDKDVKKLGQDDAGYTGEEFKWFLKSTIPANLGDYKFEITDKFADGL  
 TYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKITFKPEKFEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAA  
 FLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKADNPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAED  
 LLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIKLSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAP  
 EGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPSIPNTGGIGTAIFVAIGAAMFAVAVKGMK  
 RRTKDN

A proteína GBS 80 contém uma região transmembranar do terminal C que está indicada pela sequência sublinhada junto à extremidade final da SEQ ID NO: 2, *supra*. De acordo com uma forma de realização, remove-se um ou vários aminoácidos da região transmembranar e/ou uma região citoplásmica. Como exemplo de um tal fragmento de GBS 80 indica-se o que é designado adiante por SEQ ID NO: 4:

**SEQ ID NO: 4**

MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSQERPAAKTTVNIYKQLQADSYKSEITSNGGIENK  
 DGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKKLTTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVD  
 LDSKSNVRYLYVEDLKNPSNITKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDPEKTDKDVKKLGQDD  
 AGYTGEEFKWFLKSTIPANLGDYKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKI  
 TFKPEKFEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKAD  
 NPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIK  
 LKSHDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAP EGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD  
 TIKNNKRPSIPNTG

A proteína GBS 80 contém um motivo de aminoácidos indicativo de uma âncora da parede celular: SEQ ID NO: 5 "IPNTG" (indicado a itálico na SEQ ID NO: 2, *supra*). Em alguns sistemas de células hospedeiras recombinantes, pode ser preferível remover este motivo para facilitar a secreção de uma proteína GBS 80 recombinante, para fora de célula hospedeira. Assim sendo, num fragmento preferencial de GBS 80, para utilização na presente invenção, remove-se para fora da GBS 80 as regiões transmembranares e/ou citoplásmicas e o motivo de ancoragem à parede celular. Como exemplo de tal fragmento de GBS 80 indica-se o que é designado adiante por SEQ ID NO: 6.

**SEQ ID NO: 6**

MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSOERPAKTTVNIYKLOADSYKSEITSNGGIENK  
DGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDA  
LDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTKDKVKKLGQDD  
AGYTIGEEFKWFLKSTIPANLGDYEKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKI  
TFKPEKFKIEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLIIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKAD  
NPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIK  
LKSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKLETKAPEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD  
TIKNNKRPS

Em alternativa, em alguns sistemas de células recombinantes, pode ser preferível utilizar o motivo de ancoragem à parede celular para ancorar à parede celular a proteína expressa por via recombinante. O domínio extracelular da proteína expressa pode ser clivado durante a purificação ou então é possível deixar a proteína recombinante acoplada quer às células hospedeiras inactivadas quer às membranas celulares, na composição final.

De acordo com uma forma de realização, a região da sequência líder ou de sinal, as regiões transmembranares e citoplásmicas e o motivo de ancoragem à parede celular são

removidos da sequência da GBS 80. Como exemplo de um tal fragmento de GBS 80 indica-se o que é identificado a adiante por SEQ ID NO: 7.

**SEQ ID NO: 7**

AEVSQERPAKTTVNIYKQLQADSYKSEITSNGGIENKDGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDEL  
 KKLTTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDALDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVA  
 NSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIPANLGDYEFKFEITDKFADGL  
 TYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNLTIKITFKPEKFKIEAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAA  
 FLEIPVASTINEKAVLGKAIENFELQYDHTPDKADNPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFD  
 LLASDGTAVKWTDALIKANTKNYIAGEAVTGQPIKLSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAP  
 EGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPS

As requerentes identificaram um fragmento da proteína GBS 80 particularmente imunogénico. Este fragmento imunogénico está localizado para o lado do terminal N da proteína e está sublinhado na SEQ ID NO: 2 da GBS 80, adiante apresentada. O fragmento sublinhado está explicitado adiante pela SEQ ID NO: 8.

**SEQ ID NO: 2**

MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSQERPAKTTVNIYKQLQADSYKSEITSNGGIENK  
DGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKKLTTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVDA  
LDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDD  
AGYTI GEEFKWFLKSTIPANLGDYEFKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNLTIKI  
TFKPEKFKIEAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENFELQYDHTPDKAD  
 NPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTKNYIAGEAVTGQPIK  
 LKSHDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAP EGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD  
 TIKNNKRPSIPNTGGIGTAIFVAIGAAMFAVKGMRRTKDN

**SEQ ID NO: 8**

AEVSQERPAKTTVNIYKQLQADSYKSEITSNGGIENKDGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDEL  
 KKLTTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVVDALDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELPVA  
 NSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDDAGYTI GEEFKWFLKSTIPANLGDYEFKFEITDKFADGL  
 TYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNLTIKITFKPEKFKIEAELLKGM

CONFÓRMERO F

Os inventores concluíram que os antigénios da família das adesinas podem ser isolados como duas isoformas

principais distintas: (a) o confórmero F e (b) o confórmero A. Estas isoformas, apesar de partilharem sequências de aminoácidos iguais ou semelhantes, podem ser separadas pelas suas propriedades biofísicas diferenciais, praticando passos de purificação de proteínas, tais como a separação cromatográfica. Por exemplo, o confórmero A, na cromatografia de permuta de iões, caracteriza-se pelo facto de ser adsorvido pela 'Q-Sepharose', ao passo que o confórmero F é objecto de eluição. Também é possível praticar um processo para isolar e purificar o confórmero F por cromatografia com hidroxapatite, conforme descrito, neste caso, no exemplo 1. As suas isoformas apresentam regimes de processamento com pesos moleculares aparentes diferentes (MW) durante a electroforese não desnaturante em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE), ao passo que apresentam o mesmo peso molecular aparente (MW) depois de terem sido desnaturadas por via térmica. Quando o processamento tem lugar numa coluna de cromatografia por exclusão dimensional, são necessários volumes de eluição maiores para o confórmero F, comparativamente com o confórmero A. As duas isoformas também apresentam estabilidade e imunogenicidade diferentes, sendo o confórmero F a forma mais estável e imunogénica. Na realidade, ao longo do tempo, um lote purificado de confórmero A irá apresentar outras isoformas, incluindo o confórmero F. A imunização com um confórmero F purificado determina uma melhor resposta imunitária, comparativamente com uma imunização feita como confórmero A ou com uma mistura de isoformas em que o confórmero F seja apenas uma fracção menor. O confórmero F apresenta também uma maior resistência à digestão com proteases.

Em algumas formas de realização, os confórmeros têm a sequência de aminoácidos de uma proteína GBS 80 de comprimento completo. Noutras formas de realização, estes confórmeros têm a sequência de aminoácidos dos fragmentos de GBS 80 que podem ser encontrados no confórmero F. Tais fragmentos podem ser identificados facilmente, praticando processos conhecidos pelos especialistas na matéria e aqui descritos.

Por exemplo, os inventores concluíram que o fragmento recombinante de GBS 80 explicitado e designado por SEQ ID NO: 7 pode ser realmente purificado sob a forma de um dos dois confórmeros descritos *supra*, e demonstraram que o confórmero F possui melhor imunogenicidade do que o confórmero A. A espectrometria de massa (EM) pelo protocolo MALDI e a sequenciação do terminal amino confirmaram que as sequências de aminoácidos das duas isoformas são coincidentes. Num protocolo não desnaturante por SDS-PAGE, o confórmero F apresenta um peso molecular menor, comparativamente com o confórmero A, mas as duas isoformas, quando as amostras são fervidas, aparecem com o mesmo peso molecular aparente (MW). Correspondentemente, observa-se uma anomalia semelhante quando a preparação proteica é aplicada a uma coluna de filtração através de gel em que a eluição do confórmero F ocorre sob a forma de um pico monodisperso, para um volume de eluição mais elevado. Este comportamento é consistente com o menor peso molecular aparente observado num protocolo não desnaturante em SDS-PAGE. Conforme se explica mais minuciosamente adiante, testes de estabilidade reforçam a indicação de que a eluição de uma preparação de GBS 80, recuperada a partir da fracção adsorvida em 'Q-Sepharose', ocorre numa coluna de

filtração em gel, sob a forma de um pico polidisperso ao longo do tempo, indicando isso que são geradas outras isoformas. O pico máximo observado com o menor volume de eluição corresponde ao confórmero F.

Ao longo do tempo, qualquer confórmero A residual pode converter-se em confórmero F. De preferência, quando as composições imunogénicas da invenção se destinam a ser administradas a um mamífero, então tais composições estão substancialmente isentas de confórmero A.

### Sistemas de expressão

O confórmero F de adesina bacteriana pode ser produzido por via recombinante, recorrendo a um conjunto de diferentes sistemas de expressão, por exemplo, os utilizados com células de mamíferos, baculovírus, plantas, bactérias e leveduras.

#### *i. Sistemas de mamíferos*

Os sistemas de expressão de mamíferos são conhecidos na especialidade. Um promotor de mamífero é qualquer sequência de ADN capaz de se ligar à polimerase do ARN de um mamífero e de iniciar a transcrição, a jusante (3') de uma sequência codificadora (v.g., gene estrutural), em ARNm. Um promotor irá ter uma região de início da transcrição que irá estar normalmente colocada próximo da extremidade 5' da sequência codificadora, e um bloco TATA localizado normalmente 25-30 pares de bases (pb) a montante do local de início da transcrição. Admite-se que o bloco TATA comande a polimerase 11 de ARN para que comece a

síntese do ARN no local correcto. Um promotor de mamífero também irá conter o elemento promotor a montante, localizado normalmente a menos de 100 a 200 pb a montante do bloco TATA. Um elemento promotor a montante determina a velocidade com que é iniciada a transcrição e pode actuar em qualquer sentido (Sambrook *et al.* (1989) *Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells*. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> ed.).

Os genes virais de mamíferos são expressos, frequentemente, com grande intensidade e para eles há um conjunto amplo de hospedeiros; deste modo, as sequências que codificam os genes virais de mamíferos constituem sequências de promotores particularmente úteis. Como exemplos refere-se o promotor inicial de SV40, o promotor LTR do vírus do tumor mamário de murganho, o promotor final principal de adenovírus (Ad MLP) e o promotor de vírus do herpes simplex. Além disso, as sequências obtidas a partir de genes não virais, tais como o gene da metalotioneína do murino, constituem também sequências de promotores úteis. A expressão pode ser constitutiva ou regulada (induzível), dependendo disso do facto de o promotor poder ser induzido com glucocorticóides nas células responsivas às hormonas.

A presença de um elemento intensificador (intensificador), combinadamente com os elementos promotores descritos *supra*, irá aumentar, normalmente, os níveis de expressão. Um intensificador é uma sequência de ADN reguladora que consegue estimular a transcrição até 1000 vezes mais quando ligado a promotores homólogos ou heterólogos, começando a síntese no local normal de início do ARN. Os intensificadores também são activos quando estão colocados a montante ou a jusante do local do início da

transcrição, com orientação normal ou inversa, ou a uma distância de mais de 1000 nucleótidos do promotor (Maniatis *et al.* (1987) *Science* 236:1237; Alberts *et al.* (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2ª ed.). Os elementos intensificadores obtidos a partir de vírus podem ser particularmente úteis, uma vez que, normalmente, o seu conjunto de hospedeiros é mais amplo. Como exemplos refere-se o intensificador do gene inicial de SV40 (Dijkema *et al.* (1985) *EMBO J.* 4:7611) e os intensificadores/promotores obtidos a partir da repetição do terminal comprido (LTR) do Vírus do Sarcoma de Rous (Gorman *et al.* (1982b) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:6777) e do citomegalovírus dos seres humanos (Boshart *et al.* (1985) *Cell* 41:5211). Além disso, alguns intensificadores podem ser reguláveis e apenas se tornam activos na presença de um indutor, tal como uma hormona ou um ião metálico (Sassone-Corsi e Borelli (1986) *Trends Genet.* 2:215; Maniatis *et al.* (1987) *Science* 236:1237).

Uma molécula de ADN pode ser expressa intracelularmente em células de mamíferos. É possível ligar directamente uma sequência promotora à molécula de ADN, caso em que o primeiro aminoácido no terminal N da proteína recombinante irá ser sempre metionina que é codificada pelo codão iniciador ATG. Se desejado, é possível clivar o terminal N a partir da proteína, por incubação *in vitro*, utilizando para tal brometo de cianogénio.

Em alternativa, as proteínas exógenas também podem ser segregadas a partir da célula, para dentro dos meios de desenvolvimento, sendo para tal criadas moléculas de ADN quimérico que codificam uma proteína de fusão constituída por um fragmento de uma sequência líder que favorece a secreção da proteína exógena em células de mamíferos. De

preferência, há locais de processamento codificados entre o fragmento da sequência líder e o gene exógeno que podem ser clivados *in vivo* ou *in vitro*. O fragmento da sequência líder codifica, normalmente, um péptido de sinal constituído por aminoácidos hidrofóbicos que comandam a secreção da proteína a partir da célula. A sequência líder tripartida do adenovírus é um exemplo de uma sequência líder que favorece a secreção de uma proteína exógena em células de mamíferos.

Normalmente, as sequências de terminação da transcrição e de poliadenilação, reconhecidas pelas células de mamíferos, são as regiões reguladoras localizadas do lado de 3' relativamente ao codão de paragem da tradução e, conseqüentemente, em conjunto com os elementos promotores, flanqueiam a sequência codificadora. O terminal 3' do ARNm maduro é formado por clivagem pós-transcricional específica do local e por poliadenilação (Bimstiel *et al.* (1985) *Cell* 41:349; Proudfoot e Whitelaw (1988) *Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA*. Em 'Transcription and splicing' (ed. B.D. Hames and D.M, Glover); Proudfoot (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14:1051). Estas sequências comandam a transcrição de um ARNm que pode ser traduzido no polipeptido codificado pelo ADN. Como exemplos de sinais de terminação de transcrição/poliadenilação refere-se os obtidos a partir de SV40 (Sambrook *et al.* (1989) 'Expression of cloned genes in cultured mammalian cells'. Em 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual').

Normalmente, os componentes descritos *supra*, compreendendo um promotor, um sinal de poliadenilação e uma sequência de terminação da transcrição são colocados conjuntamente em construções de expressão. Se desejado,

também é possível incorporar na construção de expressão intensificadores, intrões com locais de junção funcionais dadores e aceitadores e sequências líderes. As construções de expressão são mantidas, normalmente, num replicão, tal como um elemento extracromossómico (v.g., plasmídeos) capaz de se manter estável num hospedeiro, tal como células de mamíferos ou bactérias. Os sistemas de replicação de mamíferos compreendem os que são obtidos a partir de vírus de animais, os quais necessitam de factores de transacção para se replicarem. Por exemplo, os plasmídeos que contêm os sistemas de replicação dos papovavirus, tais como SV40 (Gluzman (1981) Cell 23:1751) ou poliomavirus, replicam-se com um número de cópias extremamente elevado na presença do antigénio T viral adequado. Como outros exemplos de replicões de mamíferos refere-se os obtidos a partir do papilomavirus de bovinos e do vírus de Epstein-Barr. Além disso, o replicão pode ter dois sistemas de replicação, permitindo-lhe assim que seja mantido, por exemplo, em células de mamíferos para expressão e num hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. Como exemplos de tais vectores de trânsito de tipo bactérias-mamíferos refere-se o vector pMT2 (Kaufman *et al.* (1989) Mol. Cell. Biol. 9:946) e o vector pHEBO (Shimizu *et al.* (1986) Mol. Cell. Biol. 6:10741). O procedimento de transformação utilizado depende do hospedeiro a ser transformado. Os processos para a introdução de polinucleótidos heterólogos em células de mamíferos são perfeitamente conhecidos na especialidade e compreendem a transfecção mediada por dextrano, a precipitação com fosfato de cálcio, a fusão de protoplastos, a electroporação, a encapsulação dos

polinucleótidos em undecapossomas (11 possomas) e a microinjecção directa do ADN nos núcleos.

As linhagens de células de mamíferos disponíveis como hospedeiras para expressão são perfeitamente conhecidas na especialidade e compreendem muitas linhagens de células imortalizadas que podem ser obtidas na Colecção Americana de Culturas Tipo (ATCC), incluindo, mas sem nenhuma limitação, as células de ovário do criceto chinês (CHO), as células HeLa, as células de rim do criceto bebé (BHK), as células do rim de macaco (COS), as células do carcinoma hepatocelular humano (v.g., Hep G2) e um conjunto vasto de outras linhagens de células

#### ii. Sistemas de baculovírus

Também é possível inserir um polinucleótido que codifique o confórmero F num vector adequado de expressão de insectos funcionalmente ligado aos elementos de controlo dentro desse vector. Para a construção do vector são utilizadas técnicas perfeitamente conhecidas na especialidade. De um modo geral, os componentes do sistema de expressão compreendem um vector de transferência, normalmente um plasmídeo bacteriano, que contém simultaneamente um fragmento do genoma do baculovírus e um local de reconstrução conveniente para a inserção do gene ou genes heterólogos que irão ser expressos; um baculovírus de tipo característico natural, com uma sequência homóloga à do fragmento específico do baculovírus no vector de transferência (isto permite a recombinação homóloga do gene heterólogo no genoma do baculovírus); e células hospedeiras adequadas de insectos e meios de crescimento. Após a inserção da sequência de ADN que

codifica a proteína no vector de transferência, este vector e o genoma viral de tipo característico natural são transfectados para uma célula hospedeira de um insecto onde irá ter lugar a recombinação do vector e do genoma viral. O vírus recombinante condicionado é expresso e as placas recombinantes são identificadas e purificadas. Os materiais e os processos para os sistemas de expressão de baculovírus/células de insectos estão disponíveis nos circuitos comerciais sob a forma de estojos, *inter alia*, os da Invitrogen, San Diego CA (estorjo "MaxBac"). Estas técnicas são vulgarmente conhecidas pelos especialistas na matéria e estão perfeitamente descritas na obra de Summers e Smith, 'Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)' (doravante designada por "Summers e Smith").

Antes de se inserir a sequência de ADN que codifica a proteína no genoma do baculovírus, os componentes descritos *supra*, compreendendo um promotor, uma sequência líder (se desejado), uma sequência codificadora relevante e a sequência de terminação da transcrição, são normalmente montados numa construção intermédia de translocação (vector de transferência). Esta construção pode conter um só gene e elementos reguladores funcionalmente ligados; genes múltiplos, cada um deles com o seu conjunto próprio de elementos reguladores funcionalmente ligados; ou genes múltiplos, regulados pelo mesmo conjunto de elementos reguladores. As construções intermédias de translocação são mantidas, normalmente, num replicão, tal como um elemento extracromossómico (*v.g.*, plasmídeos) capaz de se manter estavelmente num hospedeiro, tal como uma bactéria. O replicão irá ter um sistema de replicação, permitindo assim

que este se mantenha num hospedeiro conveniente para clonagem e amplificação.

Presentemente, o vector de transferência mais vulgarmente utilizado para introduzir genes exógenos no AcNPV é o pAc373. Também foram já concebidos e delineados muitos outros vectores conhecidos pelos especialistas na matéria. Como exemplo de tais vectores refere-se o pVL985 (que altera o codão iniciador da poliedrina, de ATG para ATT, e que introduz um local de clonagem de BamHI à distância de 32 pares de bases a jusante do ATT (Luckow e Summers, *Virology* (1989) 17:31).

O plasmídeo também contém, normalmente, o sinal de polidenilação da poliedrina (Miller *et al.* (1988) *Ann. Rev. Microbiol.*, 42:177), um gene procariótico de resistência à ampicilina (amp) e uma origem de replicação para selecção e propagação em *E. coli*.

Os vectores de transferência de baculovírus contêm, normalmente, um promotor de baculovírus. Um promotor de baculovírus é uma sequência de ADN capaz de se ligar a uma polimerase do ARN de baculovírus e de iniciar a transcrição a jusante (de 5' para 3') de uma sequência codificadora (*v.g.*, um gene estrutural), para dar origem a ARNm. Um promotor irá ter uma região de início da transcrição, que é colocada normalmente em posição proximal da extremidade 5' da sequência codificadora. Esta região de início da transcrição compreende, normalmente, um local de ligação da polimerase de ARN e um local de início da transcrição. Um vector de transferência de baculovírus também pode possuir um segundo domínio, designado por intensificador, que, se estiver presente, está normalmente em posição distal

relativamente ao gene estrutural. A expressão pode ser regulada ou constitutiva.

Os genes estruturais, abundantemente transcritos em momentos tardios num ciclo de infecção viral, proporcionam sequências promotoras particularmente úteis. Como exemplos refere-se as sequências obtidas a partir do gene que codifica a proteína poliedrina viral (Friesen *et al.*, (1986) The Regulation of Baculovirus Gene Expression, em: The Molecular Biology of Baculoviruses (ed. Walter Doerfler); EPO Publ. Nos. 127 839 e 155 476) e o gene que codifica a proteína p10 (Vlak *et al.*, (1988), J. Gen. Virol. 69:765).

O ADN que codifica sequências de sinal convenientes pode ser obtido a partir de genes para proteínas de baculovírus ou segregadas por insectos, tais como o gene da poliedrina de baculovírus (Carbonell *et al.* (1988) Gene, 73:409). Em alternativa, uma vez que os sinais para as modificações pós-traduccionais em células de mamíferos (tais como a clivagem de um péptido de sinal, a clivagem proteolítica e fosforilação) parecem ser reconhecidos pelas células de insectos, e os sinais necessários para a secreção e acumulação nuclear também parecem ser conservados entre células de invertebrados e células de vertebrados, então as sequências líderes com origem diferente dos insectos, tais como as obtidas a partir de genes que codificam o interferão  $\alpha$  humano (Maeda *et al.*, (1985), Nature 315:592), o péptido libertador da gastrina humana (Lebacqz-Verheyden *et al.*, (1988), Molec. Cell. Biol. 8:3129), a IL-2 humana (Smith *et al.*, (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82:8404), a IL-3 de murganho (Miyajima *et al.*, (1987) Gene 58:273), e a glucocerebrosidase humana

(Martin *et al.* (1988) *DNA*, 7:99) também podem ser utilizados para favorecer a secreção em insectos.

Uma poliproteína ou um polipeptido recombinante pode ser expresso intracelularmente ou, se for expresso com as sequências reguladoras convenientes, pode ser segregado. Uma boa expressão intracelular de proteínas exógenas não fundidas exige, normalmente, a utilização de genes heterólogos que possuam, idealmente, uma sequência líder curta que contenha sinais adequados de início da tradução, precedendo um sinal iniciador de ATG. Se desejado, o resíduo metionina no terminal N pode ser clivado para fora da proteína madura por incubação *in vitro* com brometo de cianogénio.

Em alternativa, as proteínas ou poliproteínas recombinantes, que não sejam naturalmente segregadas, podem ser segregadas a partir de células de insectos, mediante a criação de moléculas de ADN quimérico que codifiquem uma proteína de fusão constituída por um fragmento de uma sequência líder que favoreça a secreção da proteína exógena em insectos. O fragmento da sequência líder codifica, normalmente, um péptido de sinal constituído por aminoácidos hidrofóbicos, que comanda a translocação da proteína para dentro do retículo endoplásmico.

Após a inserção da sequência de ADN e/ou do gene que codifica o precursor do produto de expressão da proteína, uma célula de insecto hospedeira é co-transformada com o ADN heterólogo do vector de transferência e com o ADN genómico do baculovírus de tipo característico natural - normalmente por co-transfecção. A sequência do promotor e de terminação da transcrição da construção irá compreender, normalmente, uma secção de 2 a 5 kb do genoma do

baculovírus. Os processos para introduzir ADN heterólogo no local desejado no baculovírus são conhecidos na especialidade (Ver Summers e Smith *supra*; Ju *et al.* (1987); Smith *et al.*, Mol. Cell. Biol. (1983) 3:2156; e Luckow e Summers (1989)). Por exemplo, a inserção pode ser feita num gene, tal como o gene da poliedrina, por recombinação duplamente cruzada homóloga; a inserção também pode ser feita num local de uma enzima de restrição manipulada artificialmente no gene do baculovírus desejado (Miller *et al.*, (1989), Bioessays 4:91). A sequência de ADN, quando clonada em vez do gene da poliedrina no vector de expressão, é flanqueada tanto em 5' como em 3' pelas sequências específicas da poliedrina e fica colocada a jusante do promotor da poliedrina.

O vector de expressão de baculovírus recém-formado é depois acondicionado num baculovírus recombinante infeccioso. A recombinação homóloga ocorre com uma frequência baixa (entre cerca de 1% e cerca de 5%); assim, na sua maioria, os vírus produzidos após a co-transfecção continuam a ser vírus de tipo característico natural. Deste modo, é necessário um processo para identificar vírus recombinantes. Uma vantagem do sistema de expressão é uma pesquisa visual que permita distinguir vírus recombinantes. A proteína poliedrina, que é produzida pelo vírus natural, é produzida com níveis muito elevados nos núcleos das células infectadas, em momentos tardios após a infecção viral. A proteína poliedrina acumulada forma corpos de oclusão que contêm também partículas fixadas. Estes corpos de oclusão, com dimensões de 15  $\mu\text{m}$ , são muitíssimo refrácteis, o que lhes dá um aspecto brilhante e polido que é facilmente visualizado ao microscópio óptico. Às células

infectadas com vírus recombinantes faltam-lhes os corpos de oclusão. Para se distinguir entre vírus recombinantes e vírus de tipo característico natural, aplica-se o sobrenadante de transfecção sobre placas numa monocamada de células de insectos, por meio de técnicas perfeitamente conhecidas pelos especialistas na matéria. Concretamente, as placas são vistas e analisadas ao microscópio óptico para se pesquisar a presença (sinal indicativo de vírus de tipo característico natural) ou a ausência (sinal indicativo de vírus recombinantes) de corpos de oclusão (Current Protocols in Microbiology, Vol. 2 (Ausubel *et al.* eds) em 16.8 (Supp. 10, 1990); Summers e Smith, *supra*; Miller *et al.* (1989)).

Foram desenvolvidos vectores de expressão de baculovírus recombinantes para infecção de diversas células de insectos. Por exemplo, foram desenvolvidos baculovírus recombinantes, *inter alia*, para as seguintes espécies: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* (WO 89/046699; Carbonell *et al.*, (1985) J. Virol. 56:153; Wright (1986) Nature 321:718; Smith *et al.*, (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156; e ver, de uma forma geral, Fraser *et al.* (1989) In Vitro Cell. Dev. Biol. 25:225).

As células e os meios de cultura de células estão disponíveis nos circuitos comerciais, tanto para a expressão directa como para a expressão por fusão de polipéptidos heterólogos num sistema de expressão/baculovírus; a tecnologia de cultura de células é, geralmente, conhecida pelos especialistas na matéria. Ver, *v.g.*, Summers e Smith *supra*.

As células de insectos modificadas podem ficar depois a desenvolver-se num meio nutriente conveniente que permita uma manutenção estável dos plasmídeos presentes nos insectos hospedeiros modificados. Se o gene, produto de expressão, estiver sob controlo induzível, o hospedeiro pode ficar a desenvolver-se até atingir uma elevada densidade e a expressão ser induzida. Em alternativa, se a expressão for constitutiva, irá ter lugar continuamente a expressão do produto no meio e por isso o meio nutriente tem de circular continuamente enquanto se vai removendo o produto relevante e acrescentando os nutrientes consumidos. O produto pode ser purificado por técnicas tais como as cromatográficas, *v.g.*, HPLC, cromatografia de afinidade, cromatografia de permuta de iões, etc.; por electroforese; por centrifugação em gradiente de densidade; por extracção com solventes e não só. Conforme apropriado, o produto pode ser ainda mais purificado, na medida do necessário, por forma a remover-se praticamente todas as proteínas de insectos que também são segregadas no meio ou que resultem da destruição das células dos insectos, de modo a obter-se um produto que esteja pelo menos praticamente isento de resíduos do hospedeiro, *v.g.*, proteínas, lípidos e polissacarídeos.

Para se obter a expressão de proteínas mantém-se as células hospedeiras recombinantes, obtidas a partir dos transformantes, a incubar em condições que permitam a expressão da sequência que codifica a proteína recombinante. Estas condições irão variar em função da célula hospedeira seleccionada. No entanto, as condições são facilmente determináveis pelos especialistas na matéria, com base em preceitos conhecidos na especialidade.

iii. Sistemas vegetais

São conhecidos na especialidade inúmeros sistemas de culturas de células vegetais e sistemas de expressão genética de plantas inteiras. Como exemplos de sistemas de expressão genética de células vegetais refere-se os descritos em patentes de invenção tais como: US 5 693 506, US 5 659 122 e US 5 608 143. Outros exemplos de expressão genética em culturas de células de plantas são os que foram descritos por Zenk, *Phytochemistry* 30:3861- 3863 (1991). Para além das referências indicadas *supra*, é possível encontrar outras descrições de péptidos de sinal de proteínas de plantas nas obras de Vaulcombe *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 209:33-40 (1987); Chandler *et al.*, *Plant Molecular Biology* 3: 407-418 (1984); Rogers, *J. Biol. Chem.* 260:3731-3738 (1985); Rothstein *et al.*, *Gene* 55:353-356 (1987); Whittier *et al.*, *Nucleic Acids Research* 15:2515-2535 (1987); Wirsel *et al.*, *Molecular Microbiology* 3:3-14 (1989); e Yu *et al.*, *Gene* 122:247-253 (1992). É possível encontrar uma descrição da regulação da expressão do gene vegetal pela hormona vegetal, do ácido gibrélico e das enzimas segregadas induzidas pelo ácido gibrélico na obra de R.L. Jones e J. MacMillin, *Gibberellins: em: Advanced Plant Physiology*, Malcolm B. Wilkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, London, pp. 21-52. Referências que descrevem outros genes regulados metabolicamente: Sheen, *Plant Cell*, 2:1027-1038 (1990); Maas *et al.*, *EMBO J.* 9: 3447-3452 (1990); Benkel e Hickey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:1337-1339(1987)

Tipicamente, utilizando técnicas conhecidas na especialidade, insere-se uma sequência polinucleotídica desejada numa cassete de expressão que compreenda elementos reguladores genéticos concebidos e delineados para funcionamento em plantas. A cassete de expressão é inserida num vector de expressão desejado, com sequências companheiras a montante e a jusante da cassete de expressão adequada para expressão num hospedeiro vegetal. As sequências companheiras irão ser de origem plasmídica ou viral e irão proporcionar as características necessárias ao vector para permitir que os vectores desloquem ADN de um hospedeiro de clonagem original, tal como uma bactéria, para o hospedeiro vegetal desejado. A construção básica bacteriana/vector vegetal irá proporcionar, preferencialmente, um conjunto vasto de origens de replicação de hospedeiros procariotas; um marcador seleccionável procariota; e, para transformações com *Agrobacterium*, sequências de ADN T para transferências, mediadas por *Agrobacterium*, para cromossomas das plantas. Se não for fácil manipular o gene heterólogo para efeitos de detecção, a construção irá ter também, preferencialmente, um gene marcador seleccionável adequado para determinar se uma célula vegetal foi transformada. Uma obra genérica sobre marcadores adequados, por exemplo, para os membros da família das gramíneas, é a de Wilink e Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Repr*, 11 (2): 165-185.

Também são recomendadas as sequências adequadas para permitir a integração da sequência heteróloga no genoma vegetal. Tais sequências podem compreender as sequências do transposão e semelhantes para recombinação homóloga, e também as sequências de Ti que permitem a inserção aleatória de uma cassete de expressão heteróloga num genoma

vegetal. Os marcadores seleccionáveis de procariotas adequados compreendem os da resistência aos antibióticos, tais como a ampicilina ou a tetraciclina. Conforme é sabido na especialidade, também podem estar presentes no vector outras sequências de ADN codificadoras de outras funções.

As moléculas de ácidos nucleicos que codificam o objecto da invenção podem ser incluídas numa cassette de expressão para a expressão das proteínas relevantes. Normalmente, irá haver apenas uma cassette de expressão, embora sejam possíveis duas ou mais. A cassette de expressão recombinante irá conter, para além da sequência codificadora da proteína heteróloga, os elementos seguintes: uma região promotora, sequências vegetais não traduzidas de 5', um codão iniciador, dependendo disso da possibilidade de o gene estrutural estar ou não equipado com um, e uma sequência de terminação da transcrição e tradução. Os locais exclusivos das enzimas de restrição nas extremidades 5' e 3' da cassette permitem uma inserção fácil num vector preexistente.

Uma sequência codificadora heteróloga pode sê-lo para qualquer proteína conotada com a presente invenção. A sequência que codifica a proteína relevante irá codificar um péptido de sinal que permite o processamento e a translocação da proteína, conforme adequado, e normalmente faltar-lhe-á qualquer sequência que possa determinar a ligação da proteína desejada da invenção a uma membrana. Uma vez que a região de início da transcrição, em termos essenciais, irá ser para um gene que é expresso e translocado durante a germinação, ao utilizar-se o péptido de sinal que favorece a translocação, isso vai facilitar também a translocação da proteína relevante. Deste modo, as proteínas relevantes irão ser translocadas das células onde

são expressas e podem ser facilmente colhidas. A secreção típica em sementes faz-se através da aleurona ou camada epitelial escutelar, para dentro do endoesperma da semente. Embora não seja imperativo que a proteína seja segregada a partir de células em que essa proteína é produzida, isso irá facilitar o isolamento e a purificação da proteína recombinante.

Uma vez que a expressão final do produto génico desejado irá ter lugar numa célula eucariótica, é desejável determinar se há alguma parte do gene clonado que contenha sequências que irão ser processadas como intrões pela maquinaria spliceossómica do hospedeiro. Se houver, é possível executar uma mutagénese da região do "intrão", dirigida ao local, para evitar perder uma parte da mensagem genética sob a forma de um código de intrão falso (Reed e Maniatis, *Cell* 41:95-105, 1985).

O vector pode ser microinjectado directamente em células vegetais, mediante a utilização de micropipetas adequadas para transferir mecanicamente o ADN recombinante (Crossway, *Mol. Gen. Genet.*, 202:179-185, 1985). O material genético também pode ser transferido para a célula vegetal, utilizando polietileno-glicol (Krens, *et al.*, *Nature*, 296, 72-74, 1982). Um outro processo para a introdução de segmentos de ácidos nucleicos é a penetração balística por meio de partículas pequenas a alta velocidade, com o ácido nucleico contido na matriz de partículas ou esférulas pequenas, ou sobre a superfície (Klein, *et al.*, *Nature*, 327, 70-73, 1987 and Knudsen and Muller, 1991, *Planta*, 185:330-336), estando explicitados nestas obras os preceitos para bombardear com partículas o endoesperma de cevada para a criação de cevada transgénica. Um outro

processo de introdução seria a fusão de protoplastos com outras entidades, sejam elas minicélulas, células, lisossomas ou outros corpos fundíveis recobertos com lípidos, Fraley, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1859-1863, 1982.

O vector também pode ser introduzido em células vegetais por electroporação (Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824, 1985). De acordo com esta técnica, os protoplastos vegetais são objecto de electroporação na presença de plasmídeos que contêm a construção génica. Os impulsos eléctricos de campo de elevada intensidade permeabilizam, reversivelmente, membranas que permitem a introdução dos plasmídeos. Os protoplastos vegetais que resultem da electrooporação reformam a parede celular, dividem-se e formam borreletes vegetais.

Todas as plantas a partir das quais seja possível isolar protoplastos e criá-los em cultura para se obter plantas regeneradas inteiras podem ser transformadas de acordo com a presente invenção, sendo recuperadas plantas inteiras que contêm o gene transferido. Sabe-se que praticamente todas as plantas podem ser regeneradas a partir de tecidos ou células em cultura, incluindo, mas sem nenhuma limitação, a totalidade das espécies principais de cana de açúcar, beterraba sacarina, planta do algodão, árvores de fruto e outras árvores, legumes e vegetais. Algumas plantas com interesse são, por exemplo, espécies do géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersion*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*,

*Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Hererocallis, Nemesia, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum, Sorghum e Datura.*

As metodologias para a regeneração variam de espécie para espécie de plantas, mas ministra-se primeiro, geralmente, uma suspensão de protoplastos transformados que contenham cópias do gene heterólogo. Forma-se tecido de borrelete e é possível induzir a formação de rebentos a partir do borrelete, os quais são depois enraizados. Em alternativa, é possível induzir a formação de embriões a partir da suspensão de protoplastos. Estes embriões germinam como embriões naturais para formarem plantas. Os meios de cultura irão conter geralmente diversos aminoácidos e hormonas, tais como auxina e citoquinas. Também é vantajoso acrescentar ao meio ácido glutâmico e prolina, especialmente para espécies como o milho e a luzerna. Normalmente, os rebentos e as raízes desenvolvem-se em simultaneidade. A regeneração eficiente irá depender do meio, do genotipo e da história da cultura. Se estas três variáveis estiverem controladas, então a regeneração é totalmente reproduzível e repetível.

Em alguns sistemas de culturas de células vegetais, a proteína desejada da invenção pode ser excretada ou, em alternativa, a proteína pode ser extraída a partir da planta inteira. Se a proteína desejada da invenção for segregada para dentro do meio, pode ser colhida. Em alternativa, os embriões e meias sementes sem embrião ou outros tecidos vegetais podem ser desmembrados mecanicamente para libertarem todas as proteínas segregadas entre células e tecidos. A mistura pode ser colocada em

suspensão numa solução tampão para recuperação de proteínas solúveis. Depois são praticados processos convencionais para isolar e purificar proteínas com a finalidade de se conseguir purificar a proteína recombinante. Os parâmetros de tempo, temperatura, pH, oxigênio e volume irão ser ajustados por processos vulgarmente conhecidos, para otimização da expressão e recuperação da proteína heteróloga.

#### iv. Sistemas bacterianos

As técnicas de expressão bacterianas são conhecidas na especialidade. Um promotor bacteriano é uma sequência de ADN capaz de se ligar à polimerase do ARN bacteriano e iniciar a transcrição, a jusante (3') de uma sequência codificadora (v.g., um gene estrutural), em ARNm. Um promotor irá ter uma região de início de transcrição que é colocada, normalmente, em posição proximal da extremidade 5' da sequência codificadora. Esta região de início da transcrição compreende, normalmente, um local de ligação da polimerase de ARN e um local de início da transcrição. Um promotor bacteriano também pode possuir um segundo domínio conhecido pela designação de operador que pode sobrepor-se a um local adjacente de ligação da polimerase de ARN onde começa a síntese do ARN. O operador permite a transcrição regulada negativa (induzível), uma vez que uma proteína repressora de genes pode ligar-se ao operador e inibir, consequentemente, a transcrição de um gene específico. A expressão constitutiva pode ocorrer na ausência de elementos reguladores negativos, tais como o operador. Além disso, é possível conseguir uma regulação positiva por meio

de uma sequência de ligação de uma proteína activadora de genes, a qual, se estiver presente, estará normalmente em posição proximal (5') relativamente à sequência de ligação da polimerase do ARN. Um exemplo de uma proteína activadora de um gene é a proteína activadora dos catabolitos (CAP) que ajuda a iniciar a transcrição do operão lac em *Escherichia coli* (Raibaud *et al.* (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18:173). Deste modo, a expressão regulada pode ser positiva ou negativa, pelo que poderá reforçar ou reduzir a transcrição.

As sequências que codificam as enzimas das vias metabólicas constituem e proporcionam sequências promotoras particularmente úteis. Como exemplos refere-se as sequências promotoras obtidas a partir das enzimas metabolizadoras dos açúcares, tais como galactose, lactose, (lac) (Chang *et al.* (1977) *Nature* 198:1056) e maltose. Outros exemplos são as sequências promotoras obtidas a partir de enzimas biossintéticas, tais como triptofano (trp) (Goeddel *et al.* (1980) *Nuc. Acids Res.* 8:4057; Yelverton *et al.* (1981) *Nucl. Acids Res.* 9:731; patente de invenção norte-americana nº 4 738 921; documentos EP-A-0036776 e EP-A-0121775); e o sistema promotor da  $\beta$ -lactamase (bla) (Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." Em *Interferon 3* (ed. 1. Gresser)). Os sistemas promotores de bacteriófago  $\lambda$  PL (Shimatake *et al.* (1981) *Nature* 292:128) e T5 (patente de invenção norte-americana nº 4 689 406) também proporcionam sequências promotoras úteis.

Além disso, os promotores sintéticos que não existem na natureza também funcionam como promotores bacterianos. Por exemplo, as sequências de activação da transcrição de

um promotor bacteriano ou bacteriófago podem ser unidas com as sequências dos operões de um outro promotor bacteriano ou bacteriófago, criando um promotor híbrido sintético (patente de invenção norte-americana nº 4 551 4331). Por exemplo, o promotor tac é um promotor híbrido trp-lac constituído simultaneamente pelas sequências do promotor trp e do operão lac que é regulado pelo repressor lac (Amann *et al.* (1983) *Gene* 25:167; de Boer *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:21). Além disso, um promotor bacteriano pode conter promotores que ocorram naturalmente, de origem não bacteriana, que tenham a aptidão de se ligarem à polimerase do ARN bacteriano e iniciarem a transcrição. Um promotor que ocorra naturalmente, de origem não bacteriana, também pode ser acoplado a uma polimerase de ARN compatível para produzir níveis elevados de expressão de alguns genes em procariotas. O sistema promotor/polimerase de ARN do bacteriófago T7 é um exemplo de um sistema promotor acoplado (Studier *et al.* (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; Tabor *et al.* (1985) *Proc Natl. Acad. Sci.* 82:1074). Além disso, um promotor híbrido também pode ser constituído por um promotor de bacteriófago e por uma região do operador de *E. coli* (EPO-A-0 267 851).

Para além de uma sequência promotora activa, um local de ligação ribossómico eficiente também é útil para a expressão de genes exógenos em procariotas. Em *E. coli*, o local de ligação ribossómico é designado por sequência de Shine-Dalgarno (SD) e compreende um códon iniciador (ATG) e uma sequência com um comprimento de 3 a 9 nucleótidos localizada a uma distância de 3 a 11 nucleótidos a montante do códon iniciador (Shine *et al.* (1975) *Nature* 254:34). Presume-se que a sequência de SD favoreça a ligação do ARNm

ao ribossoma pelo facto de emparelhar as bases entre a sequência de SD e a extremidade 3' do ARNr de *E. coli* 16S (Steitz *et al.* (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA." Em *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (ed. R.F. Goldberger)). Para expressão de genes eucarióticos e genes procarióticos com um local de ligação ribossómica fraca: (Sambrook *et al.* (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*." In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*).

Uma molécula de ADN pode ser expressa intracelularmente. Uma sequência promotora pode ser ligada directamente à molécula de ADN, caso em que o primeiro aminoácido no terminal N irá ser sempre metionina que é codificada pelo códão iniciador ATG. Se desejado, o aminoácido metionina no terminal N pode ser clivado a partir da proteína por incubação *in vitro* com brometo de cianogénio ou por incubação *in vivo* ou *in vitro* com uma peptidase bacteriana de metionina no terminal N (EPO-A-0 219 237).

As proteínas de fusão constituem uma alternativa à expressão directa. Normalmente, utiliza-se uma sequência de ADN, que codifica a porção do terminal N de uma proteína bacteriana endógena, ou de outra proteína estável, que é fundida com a extremidade 5' das sequências codificadoras heterólogas. Após a expressão, esta construção irá proporcionar uma fusão de duas sequências de aminoácidos. Por exemplo, o gene das células do bacteriófago  $\lambda$  pode ser ligado ao terminal 5' de um gene exógeno e expresso na bactéria. A proteína de fusão resultante conserva, preferencialmente, um local para que uma enzima de processamento (factor Xa) clive a proteína do bacteriófago

a partir do gene exógeno (Nagai *et al.* (1984) *Nature* 309:8101). Também é possível preparar proteínas de fusão com sequências provenientes dos genes *lacZ* (Jia *et al.* (1987) *Gene* 60:197), *trpE* (Allen *et al.* (1987) *J. Biotechnol.* 5:93; Makoff *et al.* (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135:11), e *Chey* (EP-A-0 324 647). A sequência de ADN na junção das duas sequências de aminoácidos pode codificar ou não um local de clivagem. Um outro exemplo é uma proteína de fusão de ubiquitina. Tal proteína de fusão é preparada com a região de ubiquitina que conserve, preferencialmente, um local para uma enzima de processamento (*v.g.*, uma protease para processamento específico de ubiquitina) para clivar a ubiquitina a partir da proteína exógena. Graças a este processo, é possível isolar a proteína exógena nativa (Miller *et al.* (1989) *Biotechnology* 7:698).

Em alternativa, as proteínas exógenas também podem ser segregadas a partir da célula, criando moléculas de ADN quimérico que codifiquem uma proteína de fusão que compreenda um fragmento de uma sequência do péptido de sinal que favoreça a secreção da proteína exógena na bactéria (patente de invenção norte-americana nº 4 336 336). O fragmento da sequência de sinal codifica, normalmente, um péptido de sinal constituído por aminoácidos hidrofóbicos que comandam a secreção da proteína a partir da célula. A proteína ou é segregada para dentro dos meios de desenvolvimento e crescimento (bactérias gram-positivas) ou para dentro do espaço periplásmico localizado entre as membranas interior e exterior da célula (bactérias gram-negativas). De preferência, há locais de processamento que podem ser clivados tanto *in vivo* como *in vitro*, codificados entre o fragmento do péptido de sinal e o gene exógeno.

O ADN que codifica sequências de sinal adequadas pode ser obtido a partir de genes para as proteínas bacterianas segregadas, tais como o gene da proteína da membrana exterior de *E. coli* (*ompA*) (Masui *et al.* (1983), em: *Experimental Manipulation of Gene Expression*; Ghrayeb *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2437) e a partir da sequência de sinal da fosfatase alcalina de *E. coli* (*phoA*) (Oka *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:7212). De acordo com um outro exemplo, a sequência de sinal do gene da  $\alpha$ -amilase, de diversas estirpes de bacilos, pode ser utilizada para segregar proteínas heterólogas a partir de *B. subtilis* (Palva *et al.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582; EP-A-0 244 042).

Normalmente, as sequências de terminação da transcrição, reconhecidas pelas bactérias, são regiões reguladoras localizadas do lado de 3' relativamente ao códon de terminação da tradução e conseqüentemente estão juntas ao promotor que flanqueia a sequência codificadora. Estas sequências comandam a transcrição de um ARNm que pode ser traduzido no polipeptido codificado pelo ADN. As sequências de terminação da transcrição compreendem frequentemente sequências de ADN com cerca de 50 nucleótidos capazes de formarem estruturas fechadas indiferenciadas que ajudam a terminar a transcrição. Como exemplos refere-se as sequências de terminação da transcrição obtidas a partir de genes com promotores fortes, tais como o gene *trp* em *E. coli* e também outros genes biossintéticos.

Normalmente, os componentes descritos *supra*, compreendendo um promotor, uma sequência de sinal (se desejado), uma sequência codificadora relevante e uma sequência de terminação da transcrição, são colocados

conjuntamente em construções de expressão. As construções de expressão são mantidas frequentemente num replicão, tal como um elemento extracromossómico (v.g., plasmídeos) capaz de se manter estavelmente num hospedeiro, tal como uma bactéria. O replicão irá ter um sistema de replicação, o que vai permitir que se mantenha num hospedeiro procariótico para expressão ou para clonagem e amplificação. Além disso, um replicão pode ser um plasmídeo de elevado ou diminuto número de cópias. Um plasmídeo de elevado número de cópias irá ter um número de cópias compreendido entre cerca de 5 e cerca de 200 e normalmente entre cerca de 10 e cerca de 150. Um hospedeiro que contenha um plasmídeo de elevado número de cópias irá conter, preferencialmente, pelo menos cerca de 10 e mais preferencialmente pelo menos cerca de 20 plasmídeos. É possível seleccionar um vector de elevado ou de diminuto número de cópias, dependendo disso do efeito do vector e da proteína exógena no hospedeiro.

Em alternativa, as construções de expressão podem ser integradas no genoma bacteriano com um vector integrador. Os vectores integradores contêm, normalmente, pelo menos uma sequência homóloga relativamente ao cromossoma bacteriano, que permite integrar o vector. Presume-se que as integrações resultem de recombinações entre ADN homólogo no vector e o cromossoma bacteriano. Por exemplo, os vectores integradores, construídos com ADN proveniente de diversas estirpes de bacilos, integram-se nos cromossomas dos bacilos (EP-A-0 127 328). Os vectores integradores também podem compreender sequências de bacteriófagos ou transposões.

Normalmente, as construções de expressão extracromossómicas e integradoras podem conter marcadores

seleccionáveis que permitam a selecção de estirpes bacterianas que tenham sido transformadas. Os marcadores seleccionáveis podem ser expressos no hospedeiro bacteriano e podem conter genes que façam com que a bactéria seja resistente a fármacos, tais como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina (neomicina) e tetraciclina (Davies *et al.* (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32:469). Os marcadores seleccionáveis também podem compreender genes biossintéticos, tais como os das vias biossintéticas de histidina, triptofano e leucina.

Em alternativa, alguns dos componentes descritos *supra* podem ser colocados conjuntamente em vectores de transformação. Os vectores de transformação são constituídos, normalmente, por um marcador seleccionável que pode ser mantido numa replicação, ou então pode ser desenvolvido num vector integrador, conforme descrito antes.

Foram já desenvolvidos vectores de expressão e transformação, tanto vectores integradores como replicões extracromossómicos, para transformação dentro de inúmeras bactérias. Por exemplo, foram desenvolvidos vectores de expressão, *inter alia*, para as bactérias seguintes: *Bacillus subtilis* (Palva *et al.* (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582; EP-A-0 036 259 e EPA-0 063 953; WO 84/04541), *Escherichia coli* (Shimatake *et al.* (1981) *Nature* 292:128; Amann *et al.* (1985) *Gene* 40: 183; Studier *et al.* (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; EP-A-0 036 776, EPA-0 136 829 e EP-A-0 136 907), *Streptococcus cremoris* (Powell *et al.* (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655), *Streptococcus lividans* (Powell *et al.* (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655) e *Streptomyces lividans* (patente de invenção norte-americana nº 4 745 056).

Os processos para introduzir ADN exógeno em hospedeiros bacterianos são perfeitamente conhecidos na especialidade e compreendem, normalmente, a transformação de bactérias tratadas com  $\text{CaCl}_2$  ou com outros agentes, tais como os catiões divalentes e DMSO. O ADN também pode ser introduzido em células bacterianas por electroporação. Os procedimentos de transformação variam, normalmente, com a espécie bacteriana que se pretende transformar. Ver, *v.g.*, (Masson *et al.* (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Palva *et al.* (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EP-A-0 036 259 e EP-A-0 063 953; WO 84/04541, *Bacillus*) (Miller *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang *et al.* (1990) J. Bacteriol. 172:949, *Campylobacter*), (Cohen *et al.* (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower *et al.* (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H.W. Boyer e S. Nicosia); Mandel *et al.* (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*), (Chassy *et al.* (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173, *Lactobacillus*), (Fiedler *et al.* (1988) Anal. Biochem 170:38, *Pseudomonas*), (Augustin *et al.* (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203, *Staphylococcus*), (Barany *et al.* (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, em: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti and R. Curtiss 111); Perry *et al.* (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powell *et al.*: (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti *et al.* (1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1:412, *Streptococcus*).

v. Expressão de leveduras

Os sistemas de expressão de leveduras também são conhecidos pelos especialistas na matéria. Um promotor de levedura é qualquer sequência de ADN capaz de se ligar à polimerase do ARN de levedura e de iniciar a transcrição a jusante, no lado de 3', de uma sequência codificadora (v.g., gene estrutural), originando ARNm. Um promotor irá ter uma região de início da transcrição que irá estar coocada, normalmente, em posição proximal relativamente à extremidade 5' da sequência codificadora. Esta região de início da transcrição compreende, normalmente, um local de ligação da polimerase de ARN (o bloco "TATA") e um local de início da transcrição. Um promotor de levedura também pode possuir um segundo domínio conhecido pela designação de sequência activadora de montante (UAS), que, no caso de estar presente, está normalmente em posição distal relativamente ao gene estrutural. A UAS permite a expressão regulada (induzível). A expressão constitutiva ocorre na ausência de uma UAS, mas pode ser melhorada com uma ou várias UAS. A expressão regulada pode ser positiva ou negativa, reforçando ou reduzindo assim a transcrição.

Uma levedura é um organismo fermentador com uma via metabólica activa, pelo que as sequências que codificam enzimas na via metabólica proporcionam sequências promotoras particularmente úteis. Como exemplos refere-se as seleccionadas entre álcool-desidrogenase (ADH) (EP-A-0 284 044), enolase, glucocinase, glucose-6-fosfato-isomerase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAP ou GAPDH), hexocinase, fosfofructocinase, 3-fosfoglicerato-mutase e piruvato-cinase (PyK) (EPO-A-0 329 203). O gene de levedura PH05,

que codifica a fosfatase acídica, proporciona também sequências promotoras úteis (Myanohara *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1).

Além disso, os promotores sintéticos que não existem na natureza funcionam também como promotores de leveduras. Por exemplo, as sequências UAS de um promotor de levedura podem ser unidas à região de activação da transcrição ou a um outro promotor de leveduras, criando um promotor híbrido sintético. Como exemplos de tais promotores híbridos refere-se a sequência reguladora de ADH ligada à região de activação de transcrição de GAP (patentes de invenção norte-americanas n.ºs 4 876 197 e 4 880 734). Como exemplos de outros promotores híbridos refere-se os promotores que são constituídos pelas sequências reguladoras de qualquer dos genes AD112, GAL4, GAL10 ou PH05, combinadas com a região de activação transcricional de um gene de uma enzima glicolítica, tal como GAP ou PyK (EP-A-0 164 556). Além disso, um promotor de levedura pode incluir promotores que ocorram naturalmente, com origem diferente de leveduras, que tenham aptidão para se ligarem à polimerase do ARN de leveduras e iniciarem a transcrição. Como exemplos de tais promotores refere-se, *inter alia*, os que constam das obras seguintes: (Cohen *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1078; Henikoff *et al.* (1981) Nature 283:835; Hollenberg *et al.* (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:119; Hollenberg *et al.* (1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*," em: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (eds. K.N. Timmis e A. Puhler); Mercerau-Puigalon *et al.* (1980) Gene 11:163; Panthier *et al.* (1980) Curr. Genet. 2:109).

Uma molécula de ADN pode ser expressa intracelularmente numa levedura. É possível ligar uma sequência promotora directamente à molécula de ADN, caso em que o primeiro aminoácido no terminal N da proteína recombinante irá ser sempre metionina que é codificada pelo códon iniciador ATG. Se desejado, a metionina do terminal N pode ser clivada para fora da proteína por incubação *in vitro* com brometo de cianogénio.

As proteínas de fusão proporcionam uma alternativa de sistemas de expressão de leveduras e também de sistemas de expressão de mamíferos, baculovírus e bacterianos. Normalmente, funde-se uma sequência de ADN codificadora da parte do terminal N de uma proteína endógena de levedura, ou de outra proteína estável, com a extremidade 5' das sequências codificadoras heterólogas. Após a expressão, esta construção irá proporcionar uma fusão das duas sequências de aminoácidos. Por exemplo, o gene de levedura, ou o gene humano de superóxido-dismutase (SOD), pode ser ligado ao terminal 5' de um gene exógeno e expresso na levedura. A sequência de ADN na junção das duas sequências de aminoácidos pode codificar ou não um local clivável. Ver, *v.g.*, o documento EP-A-0 196 056. Um outro exemplo é uma proteína de fusão de ubiquitina. Uma tal proteína de fusão é feita com a região de ubiquitina que conserva, preferencialmente, um local para uma enzima de processamento (*v.g.*, a protease de processamento específico da ubiquitina) para clivar a ubiquitina a partir da proteína exógena. Graças a este processo, é possível então isolar proteínas exógenas nativas (*v.g.*, WO88/024066).

Em alternativa, as proteínas exógenas também podem ser segregadas pela célula para dentro dos meios de

desenvolvimento, criando moléculas de ADN quimérico que codifiquem uma proteína de fusão constituída por um fragmento de sequência líder que favoreça a secreção da proteína exógena na levedura. De preferência, há locais de processamento codificados entre o fragmento da sequência líder e o gene exógeno que podem ser clivados *in vivo* ou *in vitro*. O fragmento da sequência líder codifica, normalmente, um péptido de sinal constituído por aminoácidos hidrofóbicos que comandam a secreção da proteína a partir da célula.

O ADN que codifica as sequências de sinal adequadas pode ser obtido a partir de genes de proteínas de leveduras segregadas, tais como o gene da invertase de leveduras (EP-A-0 012 873; JPO. 62,096,086) e o gene do factor A (patente de invenção norte-americana nº 4 588 684). Em alternativa, existem sequências líderes de origem diferente de leveduras, tais como uma sequência líder de interferão, que favorecem também a secreção em leveduras (EP-A-0 060 057).

Uma classe preferencial de sequências líderes de secreção é aquela que utiliza um fragmento do gene do factor  $\alpha$  de leveduras, o qual contém simultaneamente uma sequência de sinal "pre" e uma região "pro". Os tipos de fragmento de factor  $\alpha$  que podem ser utilizados compreendem a sequência líder do factor  $\alpha$  pre-pro de comprimento completo (cerca de 83 resíduos aminoácidos) e também as sequências líderes do factor  $\alpha$  truncado (contendo normalmente entre cerca de 25 e cerca de 50 resíduos aminoácidos) (patentes de invenção norte-americanas nºs 4 546 083 e 4 870 008; documento EP-A-0 324 274). Outras sequências líderes que utilizam o fragmento de sequência líder do factor  $\alpha$  que favorece a secreção compreendem as

sequências líderes do factor  $\alpha$  com uma pre-sequência de uma primeira levedura, excepto uma pró-região de um segundo factor  $\alpha$  de levedura (v.g., ver o documento W0 89/02463.) Normalmente, as sequências de terminação da transcrição reconhecidas pela levedura são regiões reguladoras localizadas para o lado do terminal 3', relativamente ao códon terminador da tradução e, conseqüentemente, em conjunto com o promotor flanqueiam a sequência codificadora. Estas sequências comandam a transcrição de um ARNm que pode ser traduzido num polipeptido codificado pelo ADN. Como exemplos de sequências terminadoras da transcrição, e de outras sequências de terminação reconhecidas pela levedura, refere-se as que codificam as enzimas glicolíticas.

Normalmente, os componentes descritos *supra*, que compreendem uma sequência líder promotora (se desejado), uma sequência codificadora relevante e uma sequência de terminação da transcrição, são montados conjuntamente em construções de expressão. As construções de expressão são mantidas frequentemente num replicão, tal como um elemento extracromossómico (v.g., plasmídeos), capaz de se manter estavelmente num hospedeiro, tal com uma levedura ou bactéria. Um replicão pode ter dois sistemas de replicação, admitindo-se assim que se mantenha, por exemplo, na levedura para expressão e num hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. Como exemplos de tais vectores bidireccionais de leveduras/bactérias refere-se YEp24 (Botstein *et al.* (1979) *Gene* 8:17-24), pCl/1 (Brake *et al.* (1984) *PNAS USA* 81:4642-4646) e YRp17 (Stinchcomb *et al.* (1982) *J. Mol. Biol.* 158:157). Além disso, um replicão pode ser um plasmídeo com um número de cópias elevado ou

diminuto. Um plasmídeo com um número de cópias elevado irá ter, geralmente, um número de cópias compreendido entre cerca de 5 e cerca de 200 e normalmente entre cerca de 10 e cerca de 150. O hospedeiro que contenha um plasmídeo com um número de cópias elevado irá ter, preferencialmente, pelo menos cerca de 10 e mais preferencialmente pelo menos cerca de 20 cópias. É possível seleccionar um vector com um número de cópias elevado ou diminuto, dependendo disso do efeito do vector e da proteína exógena sobre o hospedeiro. Ver, *v.g.*, Brake *et al.*, *supra*.

Em alternativa, as construções de expressão podem ser integradas no genoma da levedura com um vector integrador. Os vectores integradores contêm, normalmente, pelo menos uma sequência homóloga com o cromossoma da levedura, o que permite que o vector se integre, e contêm preferencialmente duas sequências homólogas que flanqueiam a construção de expressão. Presume-se que as integrações resultem de recombinações entre ADN homólogo no vector e o cromossoma da levedura (Orr-Weaver *et al.* (1983) *Methods in Enzymol.* 101:228-245). Um vector integrador pode ser orientado para um local específico na levedura, mediante a selecção da sequência homóloga conveniente para inclusão no vector. Ver Orr-Weaver *et al.*, *supra*. É possível integrar uma ou várias construções de expressão, afectando possivelmente os níveis de proteína recombinante produzida (Rine *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6750). As sequências cromossómicas incluídas no vector podem ocorrer quer sob a forma de um segmento singular no vector, de que resulta a integração do vector total, ou dois segmentos homólogos aos segmentos adjacentes no cromossoma e flanqueando a

construção de expressão no vector, de que pode resultar a integração estável apenas da construção de expressão.

Normalmente, as construções de expressão extracromossómicas e integradoras podem conter marcadores seleccionáveis que permitam a selecção de estirpes de leveduras que tenham sido transformadas. Os marcadores seleccionáveis podem compreender genes biossintéticos que possam ser expressos na levedura hospedeira, tais como os genes ADE2, HIS4, LEU2, TRPI e ALG7 e o gene de resistência a G418 que conferem respectivamente, em células de leveduras, resistência à tunicamicina e a G418. Além disso, o marcador seleccionável adequado também pode proporcionar leveduras com aptidão para se desenvolverem na presença de compostos tóxicos, tais como um metal. Por exemplo, a presença de CUP1 permite que a levedura se desenvolva na presença de iões cobre (Butt *et al.* (1987) *Microbiol, Rev.* 51:351). Em alternativa, alguns dos componentes descritos *supra* podem ser colocados conjuntamente em vectores de transformação. Os vectores de transformação são constituídos, normalmente, por um marcador seleccionável que se mantém num replicão ou que se desenvolve num vector integrador, conforme descrito *supra*.

Foram já desenvolvidos vectores de expressão e transformação, quer sejam vectores integradores ou replicões extracromossómicos, para transformação em inúmeras leveduras. Por exemplo, foram desenvolvidos vectores de expressão, *inter alia*, para as seguintes leveduras: *Candida albicans* (Kurtz, *et al.* (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142), *Candida maltosa* (Kunze, *et al.* (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141), *Hansenula polymorpha* (Gleeson, *et al.* (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp *et*

*al.* (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302), *Kluyveromyces fragilis* (Das, *et al.* (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165), *Kluyveromyces lactis* (De Louvencourt *et al.* (1983) *J. Bacteriol.* 154:737; Van den Berg *et al.* (1990) *Biol Technology* 8:135), *Pichia guillierimondii* (Kunze *et al.* (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141), *Pichia pastoris* (Cregg, *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; patentes de invenção norte-americanas n°s 4 837 148 e 4 929 555), *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen *et al.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Ito *et al.* (1983) *J. Bacteriol.* 153:163), *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse (1981) *Nature* 300:706) e *Yarrowia lipolytica* (Davidow, *et al.* (1985) *Curr. Genet.* 10:39; Gaillardin, *et al.* (1985) *Curr. Genet.* 10:49).

Os processos para introduzir ADN exógeno em leveduras hospedeiras são perfeitamente conhecidos na especialidade e compreendem, normalmente, quer a transformação de esferoplastos quer células de leveduras intactas tratadas com catiões alcalinos. Os procedimentos de transformação variam, normalmente, com a espécie de levedura que se pretende transformar. Ver *v.g.*, (Kurtz *et al.* (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142; Kunze *et al.* (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; Candida); (Gleeson *et al.* (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp *et al.* (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302; Hansenula); (Das *et al.* (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165; De Louvencourt *et al.* (1983) *J. Bacteriol.* 154:1165; Van den Berg *et al.* (1990) *BiolTechnology* 8:135; *Kluyveromyces*); (Cregg *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376; Kunze *et al.*, (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; patentes de invenção norte-americanas n°s 4 837 148 e 4 929 555; *Pichia*); (Hinnen *et al.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 75:1929; Ito *et al.* (1983) *J. Bacteriol.* 153:163; *Saccharomyces*); (Beach e Nurse (1981) *Nature* 300:706; *Schizosaccharomyces*); e (Davidow *et al.* (1985) *Curr. Genet.* 10:39; Gaillardin *et al.* (1985) *Curr. Genet.* 10:49; *Yarrowia*).

#### PURIFICAÇÃO DOS CONFÓRMEROS

Os confórmeros da presente invenção são purificados preferencialmente, até se obter uma pureza pelo menos igual a cerca de 80%, uma pureza pelo menos igual a cerca de 90%, uma pureza pelo menos igual a cerca de 95% ou uma pureza superior a 95% relativamente às macromoléculas contaminantes, particularmente outras proteínas e ácidos nucleicos e até ficarem isentos de agentes infecciosos e pirogênicos. Os confórmeros da presente invenção também podem ser purificados para se obter um estado farmacologicamente puro, o que significa uma pureza superior pelo menos a cerca de 99,5% ou preferencialmente superior pelo menos a cerca de 99,9%. Em algumas formas de realização, os confórmeros purificados ou isolados estão praticamente isentos de outros confórmeros da proteína. De preferência, o confórmero purificado ou isolado irá conter não mais de cerca de 20% de outros confórmeros, não mais de cerca de 15% de outros confórmeros, não mais de cerca de 10% de outros confórmeros, não mais de cerca de 5% de outros confórmeros, não mais de cerca de 2% de outros confórmeros ou não mais de cerca de 1% de outros confórmeros da proteína. Em algumas formas de realização, pode não ser necessário nem desejável remover a totalidade dos outros confórmeros, caso em que o confórmero purificado

ou isolado pode ter entre cerca de 20% e cerca de 1% de outros confórmeros, entre cerca de 15% e cerca de 1% de outros confórmeros, entre cerca de 10% e cerca de 1% de outros confórmeros, entre cerca de 5% e cerca de 1% de outros confórmeros ou entre cerca de 2% e cerca de 1% de outros confórmeros.

A proteína adesina bacteriana ou os seus polipéptidos podem ser purificados recorrendo a todos os processos disponíveis de fraccionamento e/ou purificação. Ver, *v.g.*, Robert K. Scopes, "Protein Purification. Principles and Practice," (4ª ed. 2000, Springer Verlag). Em geral, é possível utilizar os processos de precipitação com sulfato de amónio e extracção com um ácido ou com um agente caotrópico para o fraccionamento de amostras. Como exemplos de passos de purificação refere-se a cromatografia em hidroxapatite, a cromatografia de exclusão dimensional, a cromatografia em FPLC e a cromatografia em líquido de elevado rendimento de fase inversa. Os meios cromatográficos convenientes compreendem dextranos transformados, agarose, celulose, poliacrilamida, sílicas especialmente preparadas e não só. Os derivados de PEI, DEAE, QAE e Q são exemplos preferenciais para permuta de aniões. Como exemplos de meios cromatográficos refere-se os meios obtidos a partir de grupos fenilo, butilo ou octilo, tais como 'Phenyl-Sepharose FF' (Pharmacia), 'Toyopearl butyl 650' (Toso Haas, Montgomeryville, Pa.), 'Octyl-Sepharose' (Pharmacia) e não só; ou as resinas poliacrílicas, tais como 'Amberchrom CG 71' (Toso Haas) e não só. Os suportes sólidos convenientes são seleccionados entre esférulas de vidro, resinas à base de sílica, resinas celulósicas, esférulas de agarose, esférulas de agarose reticulada, esférulas de polistireno,

resinas de poliacrilamida reticulada e outras que sejam insolúveis nas condições em que irão ser utilizadas. Estes suportes podem ser modificados com grupos reactivos que permitam a ligação de proteínas por meio de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfidrilo, grupos hidroxilo e/ou radicais de hidratos de carbono.

Como exemplos de metodologias químicas de acoplamento refere-se a activação com brometo de cianogénio, a activação com N-hidroxi-succinimida, a activação com epóxido, a activação com sulfidrilo, a activação com hidrazida e a utilização de derivados carboxilo e amino para as metodologias químicas de acoplamento de carbodiimida. Estes e outros meios sólidos são perfeitamente conhecidos e vulgarmente utilizados na especialidade e podem ser obtidos nos circuitos comerciais. A selecção de um processo particular para isolar e purificar um polipeptido é um assunto vulgar e determina-se, em parte, pelas propriedades do suporte escolhido. Ver, por exemplo, 'Affinity Chromatography: Principles & Methods' 18-1022-29 (2002), obra que pode ser obtida em "Amersham Biosciences, e Doonan, Protein Purification Protocols" (The Humana Press 1996).

Os especialistas na matéria podem engendrar outras variações para isolar e purificar as proteínas adesinas bacterianas ou os seus polipéptidos. Por exemplo, é possível utilizar anticorpos dirigidos contra as proteínas adesinas bacterianas para isolar grandes quantidades de proteínas, por purificação por imunoafinidade.

Os polipéptidos da presente invenção podem ser isolados tirando proveitos de propriedades particulares. Por exemplo, é possível praticar a cromatografia de

adsorção de íons metálicos ionizados (IMAC) para purificar proteínas ricas em histidina, incluindo as que possuem identificadores de poli-histidina. Dito de forma abreviada, carrega-se em primeiro lugar um gel com íons metálicos divalentes para se obter um quelato (Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1 (1985)). As proteínas ricas em histidina irão ser adsorvidas por esta matriz, com afinidades diferentes, dependendo do íon metálico utilizado, e a sua eluição irá ocorrer de forma competitiva, reduzindo o valor do pH ou utilizando agentes quelantes fortes. Outros processos de purificação compreendem a purificação de proteínas glicosiladas, recorrendo à cromatografia por afinidade com lectina e à cromatografia de permuta de íons (M. Deutscher, (ed.), Meth. Enzymol. 182:529 (1990)). No contexto de outras formas de realização da presente invenção, é possível fazer a fusão do polipeptido relevante e de um identificador por afinidade (v.g., uma proteína de ligação à maltose, um domínio de imunoglobulina) para facilitar a purificação.

As proteínas adesinas bacterianas ou, especialmente, os seus polipéptidos, também podem ser preparados por meios de síntese química. As proteínas adesinas bacterianas, ou os seus polipéptidos, podem ser monómeros ou multímeros; podem ser glicosiladas ou não glicosiladas; PEGiladas ou não PEGiladas; e podem conter ou não um resíduo aminoácido metionina inicial.

#### Separação dos confórmeros

Os confórmeros de adesinas bacterianas podem ser purificados ou isolados por meio de qualquer tecnologia de

purificação ou separação que consiga fazer a diferenciação dos confórmeros com base nas suas características biofísicas diferenciais. Como exemplos preferíveis de tais tecnologias refere-se as tecnologias que fazem a diferenciação com base em coeficientes de atrito diferenciais, distribuições de cargas eléctricas diferenciais, afinidade diferencial para catiões ou aniões particulares, tais como os de cálcio ou fosfato, como sucede com a hidroxiapatite, ou apresentação diferencial sobre antigénios superficiais.

Como exemplos preferenciais de tecnologias que permitem separar os confórmeros de adesinas bacterianas, com base em diferenças nos seus coeficientes de atrito, refere-se a cromatografia de exclusão dimensional, a centrifugação de sedimentação a alta velocidade, o fraccionamento do fluxo de processo e a electroforese em gel. O coeficiente de atrito de uma molécula calcula-se em função da massa e da forma da molécula. A teoria geral desenvolvida para se compreender o transporte de moléculas em solução aquosa é designada por hidrodinâmica. A lei de Stoke descreve a relação entre o coeficiente de atrito  $f_0$  e a viscosidade  $\eta$  no meio:

$$f_0 = 6\pi\eta R$$

em que o símbolo  $R$  representa o raio de Stoke da molécula. Para moléculas esféricas, o raio de Stokes da molécula é o raio da macromolécula esférica mais o seu invólucro de solvatação. No caso de macromoléculas que não sejam esféricas, o raio de Stokes é o raio de uma molécula esférica que teria um coeficiente de atrito equivalente. As

moléculas não esféricas irão ter sempre um coeficiente de atrito superior ao de uma molécula esférica com o mesmo peso molecular e a mesma solvatação. Assim, uma molécula que se desvie de uma forma perfeitamente esférica pode ser representada pela relação  $f/f_0$ , em que o símbolo  $f$  representa o coeficiente de atrito real da molécula e o símbolo  $f_0$  representa o coeficiente de atrito de uma molécula esférica com o mesmo peso molecular e a mesma solvatação. Para moléculas esféricas temos  $f/f_0 = 1$  e para moléculas não esféricas temos  $f/f_0 > 1$ . Assim, os confórmeros com formas diferentes e consequentemente coeficientes de atrito diferentes podem ser separados com base nos seus coeficientes de atrito, conforme demonstrado no exemplo 2 subsequente.

Um processo preferencial para a separação de confórmeros de adesinas bacterianas, com base no seu coeficiente de atrito diferencial, é a cromatografia de exclusão dimensional ou a cromatografia de filtração em gel. Um especialista na matéria sabe como determinar facilmente quais as resinas adequadas e os tampões convenientes. Como exemplos de resinas adequadas de exclusão dimensional refere-se, mas sem nenhuma limitação, Superdex 75, Superose 12 e Sephacryl 100. É possível seleccionar todas as condições de tamponamento com base em condições que estabilizem convenientemente o confórmero de adesinas bacterianas, desde que a resina tolere as condições de tamponamento. Para recordar os princípios gerais da cromatografia de exclusão dimensional, incluindo as condições exploratórias iniciais, a optimização e aumentos proporcionais à escala de trabalho, ver "Gel

Filtration: Principles and Methods,"18-1022-18 (2002), obra que pode ser obtida em 'Amersham Biosciences'.

O fraccionamento do fluxo de processo (FFF) é um outro processo que pode ser utilizado para separar ou purificar os confórmers com base no coeficiente de atrito diferencial. A título de exemplo, mas sem nenhuma limitação, o processo de sedimentação por FFF pode ser utilizado sempre que o canal de fraccionamento esteja enrolado dentro de um recipiente centrífugo. A rotação do canal gera forças de aceleração diferenciais que descrevem ângulos rectos com a direcção do fluxo. O tempo de retenção no processo de sedimentação por FFF depende das dimensões e da densidade das partículas. Um outro exemplo é o escoamento de FFF que possui um conjunto vasto de aplicações. Este processo permite separar quase todas as macromoléculas, sistemas colóides e dispersões de partículas porfirizadas. No escoamento de FFF, são sobrepostas duas correntes cruzadas no mesmo canal. As paredes do canal no escoamento de FFF são permeáveis. O tamanho dos poros da membrana determina o limite dimensional inferior para a separação. A força motriz no escoamento de FFF é a força viscosa exercida sobre uma partícula pela corrente cruzada e a separação baseia-se apenas nas dimensões, sendo os tempos de retenção proporcionais ao diâmetro e à forma das partículas

Também é possível utilizar a electroforese preparativa em gel para separar ou purificar os confórmers, com base nos seus coeficientes de atrito diferenciais. De preferência, a electroforese em gel irá decorrer em condições naturais, mas é possível praticar condições desnaturantes, tais como as impostas por SDS, tendo em

conta que o confórmero F é resistente à desnaturação por SDS, conforme demonstrado no exemplo 2 subsequente. É possível utilizar qualquer gel conveniente, embora sejam preferíveis os geles de agarose ou acrilamida. Após a electroforese, é possível recuperar as proteínas por difusão passiva ou electroeluição. Para se manter a integridade das proteínas durante a electroforese, é importante conservar o equipamento arrefecido e minimizar os efeitos da desnaturação e da proteólise.

Um outro processo preferencial para separar ou isolar os confórmeros de adesinas bacterianas é a tecnologia de separação por permuta de aniões. É possível utilizar qualquer resina entre um grande número de resinas de permuta de aniões conhecidas na especialidade, incluindo, por exemplo, as resinas monoQ, Sepharose-Q, macro-prepQ, AG1-X2, HiQ, e também as resinas à base de DEAE. A eluição pode ser praticada com soluções salinas aquosas, incluindo, sem nenhuma limitação, as soluções de cloreto de potássio ou de cloreto de sódio com concentrações variáveis entre 0,01 M e 2,0 M num intervalo amplo de valores de pH. Para uma leitura sobre técnicas de separação por permuta de iões, ver a obra "Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods," 18-1114-21 (2002) que pode ser obtida em 'Amersham Biosciences'.

Uma outra tecnologia de separação preferencial para diferenciar os confórmeros de adesinas bacterianas é a tecnologia da hidroxiapatite. A hidroxiapatite é uma resina à base de fosfato de cálcio pelo que pode funcionar como resina de permuta de catiões e como resina de permuta de aniões. É possível utilizar uma grande variedade de resinas de permuta de catiões, incluindo, a título de exemplo, as

resinas à base de sulfatos, as resinas à base de carboxilatos e as resinas à base de fosfatos.

Além disso, há determinadas proteínas que se comportam, em hidroxiapatite, de uma maneira diferente do comportamento em resinas de permuta de catiões ou de permuta de aniões, devido à sua afinidade mais elevada para o cálcio ou para o fosfato. A título de exemplo, as proteínas que se ligam ao ADN ligam-se frequentemente de uma forma mais vigorosa à hidroxiapatite do que a outras resinas de permuta de catiões, devido ao facto de as proteínas que se ligam ao ADN possuírem bolsas de ligação para a estrutura fosfato do ADN. Assim sendo, para além da hidroxiapatite, podem ser utilizadas resinas à base de fosfato, tais como fosfocelulose, para separar ou isolar confórmeros de adesinas bacterianas. De igual modo, é possível praticar tecnologias de separação por afinidade com metais divalentes imobilizados, nos casos em que as proteínas tenham afinidade para os iões metálicos divalentes, tais como os iões cálcio ou magnésio.

Um outro exemplo de uma tecnologia de purificação, que permite separar confórmeros bacterianos, é a tecnologia de afinidade com anticorpos, preferencialmente anticorpos monoclonais. Conforme se demonstra nos exemplos subsequentes, os confórmeros de adesinas bacterianas possuem imunogenicidades diferentes. É provável que as diferentes imunogenicidades se devam, em parte, ao facto de os confórmeros terem antigénios diferentes expostos sobre a sua superfície, presumindo-se que possa haver diferentes acessibilidades a elos fechados ou a estruturas superficiais tridimensionais diferentes. Assim, é possível isolar anticorpos que sejam específicos para um ou para um

número limitado de confórmeros. A título de exemplo, é possível gerar anticorpos imunizando um animal com o confórmero F de uma adesina bacteriana. Posto isto, os anticorpos policlonais específicos para o confórmero F podem ser purificados isolando os anticorpos a partir do soro do animal e fazendo passar os anticorpos através do confórmero A convenientemente imobilizado sobre um suporte sólido. Os anticorpos que apenas reconheçam o confórmero F e não reconheçam o confórmero A não irão ligar-se e conseqüentemente podem ser separados para fora do suporte sólido. Em alternativa, seria possível fazer com que o animal gerasse o hibridoma produtor de anticorpos monoclonais e esses anticorpos monoclonais poderiam ser pesquisados e escolhidos pela sua aptidão para se ligarem ao confórmero F e não ao confórmero A. Tais anticorpos específicos para um confórmero podem ser utilizados para separar ou isolar o confórmero. As tecnologias de purificação de anticorpos por afinidade são perfeitamente conhecidas e facilmente praticadas.

#### PESQUISA

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a pesquisas do confórmero F de adesinas bacterianas. Tais pesquisas podem ser feitas para um conjunto amplo de finalidades, incluindo, a título de exemplo, a selecção de confórmeros mais imunogénicos para maximizar a resposta imunitária no indivíduo que irá receber a vacina, pesquisa de vacinas com multicomponentes elegíveis para uma resposta imunitária a todos os componentes, pesquisa de confórmeros imunogénicos sem efeitos secundários ou apenas com um

número limitado de efeitos secundários, e ainda quaisquer outras características que um especialista na matéria possa desejar, encontrando-se explicitados na presente memória descritiva exemplos não limitativos.

A imunogenicidade do confórmero F pode ser analisada e estudada recorrendo a quaisquer métodos perfeitamente conhecidos pelos especialistas na matéria. De uma forma típica, analisa-se a presença (ou ausência), concentração, afinidade, avidéz, etc. dos anticorpos gerados *in vivo* por meio de processos convencionais tais como, mas sem nenhuma limitação, os protocolos de ensaio ELISA que permitem analisar a imunogenicidade ou a antigenicidade na imunoglobulina presente no soro de um organismo (ou paciente). É possível aplicar outros processos, tais como os dos hibridomas geradores de células T e medição da activação na presença das células que apresentem o antigénio ("APC") e do antigénio (Surman S *et al.*, 2001 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4587-92, *infra*), examinar por cromatografia, electroforese e/ou espectroscopia de massa os péptidos apresentados por MHC, marcados ou não marcados, através de ensaios de activação de células T, tais como, mas sem nenhuma limitação, os ensaios de proliferação de células T (Adorini L *et al.*, 1988. J. Exp. Med. 168: 2091; So T. *et al.*, 1996. Immunol. Let. 49: 91-97) e produção de IL-2 por meio de ensaios de células CTLL-2 a respostas proliferativas (Gillis S *et al.*, 1978. J. Immunol. 120: 2027; So T. *et al.*, 1996. Immunol. Let. 49: 91-97) e muitos outros, para se determinar aspectos mais específicos de uma resposta imunitária, ou a falta dela, por exemplo, identificar o epítipo de células T do antigénio imunogénico.

Como exemplos específicos não limitativos, é possível efectuar ensaios analíticos com células T *in vitro*, pelo que os polipéptidos, proteínas ou complexo de proteínas podem ser processados e apresentados na risca das moléculas do MHC por células adequadas apresentadoras de antigénios (APC) para células T singeneicas. É possível medir as respostas das células T por meio de simples medições de proliferação ou medindo a libertação de citocinas específicas pelas células activadas; as APC podem ser irradiadas ou tratadas de qualquer outra maneira para se impedir a proliferação para facilitar a interpretação dos resultados de tais práticas. Para se determinar a imunogenicidade de um epítipo no contexto de diferentes alotipos de MHC, é possível praticar ensaios analíticos *in vivo* utilizando as APC singeneicas e células T de um conjunto vasto de alotipos, para testar epítopos de células T num conjunto vasto de indivíduos ou pacientes.

Em alternativa, é possível utilizar animais transgénicos que expressem moléculas do MHC de seres humanos (ou de quaisquer outras espécies relevantes) para análise e pesquisa de epítopos de células T; de acordo com uma forma de realização preferencial, este ensaio analítico efectua-se em animais transgénicos em que tenha sido suprimido o reportório de MHC endógeno e, melhor ainda, em que uma ou várias moléculas acessórias diferentes do complexo de MHC endógeno/receptor de células T tenha sido substituído por moléculas humanas (ou moléculas de qualquer outra espécie com interesse) tal como, por exemplo, a molécula CD4.

Além disso, para a detecção de anticorpos anti-proteínas/antigénios/polipéptidos imunogénicos, directamente

*in vivo*, por exemplo, em estudos clínicos e com animais, é possível recorrer a protocolos analíticos ELISA tais como, por exemplo, os protocolos de ensaio ELISA, indirectos em fase sólida que permitem pesquisar a ligação de anticorpos. De acordo com uma forma de realização específica, mantém-se placas de microtitulação a incubar com o polipeptido imunogénico relevante, numa concentração adequada e num tampão conveniente. Após diversas lavagens com uma solução adequada para lavagem, tal como, por exemplo, PBS (pH 7,4), contendo 1% de BSA e 0,05% de Tween 20, ou com qualquer outra solução considerada conveniente, efectua-se a diluição das amostras séricas, por exemplo em PBS/BSA e acrescenta-se iguais volumes das amostras em duplicado às cavidades. Mantém-se as placas a incubar e após outras lavagens, por exemplo, com PBS, acrescenta-se anticorpos anti-imunoglobulina acoplados/conjugados com um repórter, tal como um isótopo radioactivo ou fosfatase alcalina, a cada cavidade com uma concentração conveniente e mantém-se tudo a incubar. As cavidades são então lavadas outra vez e, por exemplo, no caso de se utilizar como repórter a fosfatase alcalina, efectua-se a reacção enzimática utilizando um substrato colorimétrico, tal como o fosfato de p-nitrofenilo em tampão de dietanolamina (pH 9,8), cuja absorvência pode ser lida a 405 nm, por exemplo, num leitor automático para protocolos ELISA (v.g. Multiskan PLUS; Labsystems).

A título de mais um exemplo não limitativo, para detectar anticorpos no soro de pacientes e animais é possível praticar também técnicas de imunoabsorção. De acordo com uma forma de realização específica, são utilizadas quantidades adequadas de polipeptido imunogénico

relevante para cada amostra/pista sobre geles convenientes (v.g. poliacrilamida), em condições redutoras e/ou não redutoras e depois o polipeptido é transferido para uma membrana tal como, por exemplo, uma membrana de PVDF; é possível utilizar qualquer outro processo para separar proteínas em função das suas dimensões, seguindo-se a transferência do polipeptido para uma membrana. As membranas são bloqueadas, por exemplo, utilizando uma solução de leite em pó a 5% (p/v) em PBS. De acordo com uma outra forma de realização, o polipeptido imunogénico purificado pode ser aplicado à membrana. Os produtos de absorção ficam depois a incubar com amostras de soro em diluições variáveis na solução de bloqueio (antes e após o regime de injeção) e com o anti-antigénio de contraprova, desde que estejam disponíveis tais amostras. Os produtos de absorção são lavados quatro vezes com uma solução de lavagem adequada e depois ficam a incubar com anti-imunoglobulina conjugada com o repórter em diluições adequadas/específicas durante intervalos de tempo adequados/específicos, em condições adequadas/específicas. Efectua-se a lavagem dos produtos de absorção novamente com uma solução da lavagem adequada e procede-se à visualização das bandas proteicas imunorreactivas, por exemplo, no caso de se utilizar anti-imunoglobulina conjugada com peroxidase de *Armoracia rusticana*, utilizando reagentes quimioluminescentes aperfeiçoados, marcados por Amersham (Bucks, Reino Unido).

Para se testar um efeito neutralizador dos anticorpos gerados *in vivo* (pacientes ou animais), é possível determinar uma actividade biológica relevante do agente patogénico em causa, por exemplo, praticando bioanálises

tais como, por exemplo, análises de proliferação celular ou de adesão ao hospedeiro, em concentrações variáveis de soro dos indivíduos ou animais expostos/imunizados com o polipeptido imunogénico em causa. As células do agente patogénico em crescimento exponencial são lavadas e recolocadas em suspensão até se obter uma concentração consistente e conveniente no meio de desenvolvimento, segundo uma metodologia de diluições sequenciais, sendo acrescentadas em aliquotas a cada cavidade. Para efeitos de neutralização, acrescenta-se às cavidades soro diluído sequencialmente antes e após a exposição *in vivo* (imunização). As placas ficam depois a incubar durante um intervalo de tempo conveniente (dependendo isso do agente patogénico). Determina-se para cada cavidade a velocidade de crescimento do agente patogénico.

Um processo preferencial para análise e pesquisa de imunogenicidade é o ensaio de imunização activa maternal. Conforme descrito no exemplo 1, este ensaio pode servir para medir concentrações séricas em fêmeas de murganho durante o programa de imunização e também o tempo de sobrevivência das crias após o estímulo. Um especialista na matéria sabe como utilizar outros processos para fazer pesquisas que permitam determinar a antigenicidade ou imunogenicidade dos polipéptidos imunogénicos da presente invenção, explicitados na presente memória descritiva e na literatura de especialidade para pesquisa de polipéptidos imunogénicos.

É possível utilizar os processos de pesquisa de antigenicidade ou imunogenicidade para seleccionar polipéptidos imunogénicos relevantes, a partir de grupos constituídos por dois ou mais, três ou mais, cinco ou mais,

dez ou mais ou cinquenta ou mais polipéptidos imunogénicos da presente invenção, utilizando para isso um critério. Um especialista na matéria pode aplicar qualquer critério desejado para seleccionar o polipeptido imunogénico relevante. Esse critério irá depender da finalidade a que se destina o polipeptido imunogénico relevante. A título de exemplo, mas sem qualquer limitação, o critério pode ser tão simples como seleccionar o polipeptido com o mais elevado grau de antigenicidade ou imunogenicidade. Também é possível utilizar critérios mais complicados, por exemplo, seleccionar o polipeptido com o mais elevado grau de antigenicidade ou imunogenicidade que não produza nenhuns efeitos secundários indesejáveis na imunização, ou seleccionar uma vacina de multicomponentes que compreenda o polipeptido imunogénico que possua o mais elevado grau de antigenicidade ou imunogenicidade contra um painel de agentes patogénicos. A determinação do critério é uma questão simples, resolvida por via experimental com base na utilização pretendida, e por tal motivo um especialista na matéria não irá ter nenhuma dificuldade em seleccionar critérios convenientes para qualquer situação.

#### COMBINAÇÕES

O confórmero F purificado pode ser administrado como uma vacina nos níveis adequados, por si só ou em combinação com outros antigénios, tais como proteínas ou polissacáridos não adesina.

#### Outros antigénios GBS

De acordo com outro aspecto, a invenção compreende a combinação do confórmero F GBS80 com outros antigénios GBS.

De preferência, a combinação de antigénios GBS compreende três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez antigénios GBS. Ainda mais preferencialmente, a combinação de antigénios GBS compreende três, quatro ou cinco antigénios GBS. Tais combinações podem compreender antigénios de comprimento completo e/ou fragmentos antigénicos dos respectivos antigénios e compreendem combinações em que os polipéptidos e os antigénios estão fisicamente ligados entre si e combinação em que os polipéptidos e os antigénios não estão fisicamente ligados mas que estão incluídos na mesma composição.

De preferência, as combinações da invenção proporciona uma imunogenicidade melhorada em comparação com a imunogenicidade do confórmero quando administrado por si só. A imunogenicidade melhorada pode ser determinada, por exemplo, por meio de um ensaio de imunização maternal activo. Este ensaio pode ser utilizado para determinar os títulos no soro de murganhos fêmeas durante o regime de imunização, bem como o tempo de sobrevivência das crias após o estímulo. De preferência, a imunização com as composições imunogénicas da invenção dão origem a um aumento pelo menos de 2 pontos percentuais (de preferência pelo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 pontos percentuais). De preferência, as combinações de GBS da invenção que compreendem GBS 80 apresentaram um aumento na percentagem de sobrevivência em comparação com percentagem de sobrevivência proveniente da imunização com um antigénio não GBS por si só.

De acordo com uma variante, a combinação pode compreender entre dois e treze antigénios GBS seleccionados

entre o conjunto de antigénios constituído por GBS 91, GBS 293, GBS 104, GBS 67, GBS 184, GBS 276, GBS 322, GBS 305, GBS 330, GBS 338, GBS 361, GBS 404, GBS 690 e GBS 691. De preferência, a combinação compreende o confórmero F de GBS 80 em combinação com um ou vários de GBS 104, GBS 59, GBS 67 e GBS 322. As sequências de polinucleótidos e de aminoácidos para cada um destes antigénios GBS e seus fragmentos imunogénicos encontram-se descritas no documento WO4041157.

De acordo com uma variante da invenção, as combinações de antigénios ou proteínas de fusão que contêm uma porção ou porções dos antigénios irão incluir GBS 80 ou uma sua porção em combinação com um a 10 antigénios, de preferência um a 10 ou menos antigénios. Como exemplos de antigénios GBS refere-se os que se encontram descritos na patente de invenção norte-americana com o número de série 10/415,182, depositada a 28 de Abril de 2003, os pedidos de patente de invenção internacionais (WO04/041157 e WO05/028618), e o documento WO04/099242.

#### Polissacáridos GBS

As composições da invenção podem ser ainda melhoradas por meio da inclusão de polissacáridos GBS. De preferência, tanto o confórmero F GBS80 como o sacárido contribuem para a resposta imunológica num recipiente. A combinação e particularmente vantajosa no caso de o sacárido e o confórmero F GBS80 proporcionarem protecção para diferentes serotipos de GBS.

Os antigénios combinados podem estar presentes como uma combinação simples, na qual antigénio sacárido separado e o confórmero são administrados em conjunto ou então podem

estar presentes como uma combinação conjugada, em que os antigénios sacárido e polipeptido estão ligados de um modo covalente entre si.

Assim, a invenção proporciona uma composição imunogénica que compreende (i) um ou vários confórmeros F GBS 80 e (ii) um ou vários antigénios sacáridos de GBS 80. O polipeptido e o polissacárido podem estar vantajosamente ligados de um modo covalente entre si para formar um conjugado.

De acordo com uma outra variante, as adesinas da invenção podem ser conjugadas com um ou vários polissacáridos, tais como os provenientes dos serotipos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII de GBS.

Entre estes, os antigénios de polipeptido e sacárido combinados cobrem preferencialmente (ou proporcionam protecção de) dois ou mais serotipos de GBS (*v.g.*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais serotipos). Os serotipos dos antigénios de polipéptidos e sacáridos podem ou não ser sobrepostos. Por exemplo, o polipeptido pode proteger contra o serogrupo II ou V, ao passo que o sacárido protege contra os serogrupos Ia, Ib ou III. As combinações preferidas protegem contra os seguintes grupos de serotipos: (1) serotipos Ia e Ib, (2) serotipos Ia e II, (3) serotipos Ia e III, (4) serotipos Ia e IV, (5) serotipos Ia e V, (6) serotipos Ia e VI, (7) serotipos Ia e VII, (8) serotipos Ia e VIII, (9) serotipos Ib e II, (10) serotipos Ib e III, (11) serotipos Ib e IV, (12) serotipos Ib e V, (13) serotipos Ib e VI, (14) serotipos Ib e VII, (15) serotipos Ib e VIII, (16) serotipos II e m, (17) serotipos II e IV, (18) serotipos II e V, (19) serotipos II e VI, (20) serotipos II e III, (21) serotipos II e VII, (22) serotipos

III e IV, (23) serotipos III e V, (24) serotipos III e VI, (25) serotipos III e VII, (26) serotipos III e VIII, (27) serotipos IV e V, (28) serotipos IV e VI, (29) serotipos IV e VII, (30) serotipos IV e VIII, (31) serotipos V e VI, (32) serotipos V e VII, (33) serotipos V e VIII, (34) serotipos VI e VII, (35) serotipos VI e VIII e (36) serotipos VII e VIII.

Ainda mais preferencialmente, as combinações protegem contra os seguintes grupos de serotipos: (1) serotipos Ia e II, (2) serotipos Ia e V, (3) serotipos Ib e II, (4) serotipos Ib e V, (5) serotipos III e II e (6) serotipos III e V. Muito mais preferencialmente, as combinações protegem contra os serotipos III e V. A protecção contra os serotipos II e V é preferencialmente conferida pelos antígenos de polipeptido.

A protecção contra os serotipos Ia, Ib e/ou III pode ser conferida pelos antígenos de polipeptido ou de sacárido.

De acordo com uma variante, a composição imunogénica de confórmero F compreende um antígeno de sacárido GBS e pelo menos dois antígenos de polipeptido GBS ou seus fragmentos, em que o referido antígeno de sacárido GBS compreende um sacárido seleccionado entre os serotipos Ia, Ib e III de GBS, e em que os referidos antígenos de polipeptido GBS compreendem uma combinação pelo menos de dois polipéptidos ou de seus fragmentos seleccionados entre o antígeno do grupo constituído por GBS 80 (gi:2253618), GBS 67 (gi22537555), SAN1518 (Spb1, gi:77408651), GBS 104 e GBS 322 (os antígenos supramencionados encontram-se descritos no pedido de patente de invenção norte-americana

nº 11/192 046). De preferência, a combinação compreende GBS 80 ou um seu fragmento.

#### Outros antigénios

As composições da invenção podem ainda compreender um ou vários antigénios suplementares, incluindo antigénios bacterianos, virais ou parasíticos suplementares.

De acordo com outra variante, os confórmeros F GB680 da invenção são combinados com um ou vários antigénios suplementares adequados para utilização numa vacina concebida para proteger indivíduos idosos ou imunocomprometidos. Por exemplo, o confórmero F pode ser combinado com um antigénio obtido a partir do conjunto constituído por *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Listeia monocytogenes*, *Neisseria meningitides*, influenza e vírus de parainfluenza ('PIV').

No caso de se utilizar um antigénio de sacárido ou de hidrato de carbono, então é preferencialmente conjugado com uma proteína veículo para aumentar a imunogenicidade (v.g., Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251): 195-196; Lindberg (1999) Vaccine, 17, Sup. 2: S28-36; Buttery e Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168; Ahmad e Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am, 13: 113 133, vii; Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567; EP-0 477 508; US 5 306 492; WO98/42721; Conjugate Vaccines (ed. Cruse et al.) ISBN 3805549326, em particular o vol. 10: 48-114; Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 ou 012342335X). Como proteínas veículo preferidas refere-se toxinas ou toxóides bacterianos, tais como toxóides de difteria ou do tétano. É particularmente

preferido o toxóide de difteria CRM97 (Research Disclosure, 453077 (Janeiro 2002)). Outros polipéptidos veículo compreendem a proteína da membrana exterior de *N. meningitidis* (EP-A-0372501), péptidos sintéticos (EP-A-0378881; EP-A-0427347), proteínas de choque térmico (WO93/17712; WO94/03208), proteínas de tosse convulsa (WO98/58668; EP-A-0471177), proteína D de *H. influenzae* (WO00/56360), citocinas (WO91/01146), linfoquinas, hormonas, factores de crescimento, toxina A ou B de *C. difficile* (WO00/61761), proteínas de absorção de ferro (WO01/72337), etc.. No caso de a mistura compreender sacáridos capsulares dos serogrupos A e C, então poderá ser preferível que a proporção (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC seja superior a 1 (v.g., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou superior). É possível conjugar sacáridos diferentes com o mesmo tipo ou com tipos diferentes de proteínas veículo. Se necessário, é possível utilizar qualquer reacção de conjugação adequada, com qualquer ligador adequado.

Os antigénios de proteínas tóxicas podem ser desintoxicados quando se necessário, v.g., desintoxicação da toxina da tosse convulsa por meios químicos e/ou genéticos.

No caso de se incluir um antigénio de difteria na composição, então é preferível incluir também antigénio do tétano e antigénios da tosse convulsa. De igual modo, no caso de se incluir um antigénio do tétano, então é preferível incluir também antigénios de difteria e de tosse convulsa. De igual modo, no caso de se incluir um antigénio de tosse convulsa, então é preferível incluir também antigénios de difteria e de tétano.

Os antigénios na composição irão estar tipicamente presentes numa concentração pelo menos de 1 µg/mL, cada. De um modo geral, a concentração de qualquer antigénio deverá ser suficiente para provocar uma resposta imune contra esse antigénio.

Como alternativa à utilização de antigénios de proteínas na composição da invenção, é possível utilizar ácido nucleico que codifique o antigénio (v.g., Robinson e Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9: 271-283; Donnelly *et al.* (1997) *Annu Rev Immunol* 15: 617-648; Scott-Taylor e Dalglish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9: 471-480; Apostolopoulos e Plebanski (2000) *Curr Opin Mol. Ther* 2: 441-447; Ilan (1999) *Curr Opin Mol. Ther* 1: 116-120; Dubensky *et al.* (2000) *Mol. Med* 6: 723-732; Robinson e Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55: 1-74; Donnelly *et al.* (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162 (4 Pt 2): S190-193; Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66: 84-90). Os componentes proteicos das composições da invenção podem assim ser substituídos por ácidos nucleicos (de preferência ADN, v.g., sob a forma de um plasmídeo) que codifique a proteína.

### VACINAS

As vacinas de acordo com a invenção podem ser profiláticas (isto é, para prevenir a infecção) ou terapêuticas (isto é, para tratar a doença após infecção).

Tais vacinas compreendem o confórmero F GBS80, normalmente em combinação com "veículos farmacologicamente aceitáveis", os quais incluem quaisquer veículos que não induzam eles próprios a produção de anticorpos nocivos para o indivíduo que recebe a composição. Tipicamente, como veículos adequados refere-se macromoléculas grandes

metabolizadas lentamente, tais como proteínas polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tais como gotículas de óleo ou lipossomas) e partículas inactivas de vírus. Tais veículos são bem conhecidos pelos especialistas na matéria. Além disso, estes veículos podem actuar como agentes imunoestimuladores ("adjuvantes"). Além do mais, o confórmero F de adesina bacteriano pode ser conjugado com um toxóide bacteriano, tal como um toxóide proveniente de patogénios, tais como de difteria, do tétano, da cólera, *H. pylori*, etc..

As composições tais como vacinas e composições farmacêuticas da invenção podem compreender, de um modo vantajoso, um adjuvante, o qual pode produzir um aumento das respostas imunes (humoral e/ou celular) num paciente que receba a composição.

Como adjuvantes que é possível utilizar na invenção refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação.

- Uma composição que contém um mineral, incluindo sais de cálcio e sais de alumínio (ou suas misturas). Sais de cálcio incluem fosfato de cálcio (v.g., as partículas "CAP" descritas no documento US 6 355 271). Os sais de alumínio compreendem hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., podendo os sais assumir qualquer forma adequada (v.g., gel, cristalino, amorfo, etc.). é preferível a adsorção nestes sais. As composições que contêm minerais também podem ser formuladas como uma partícula do sal de metal (W000/23105). Os adjuvantes de sais de alumínio são a seguir descritos mais minuciosamente.

- Agentes indutores de citocinas (ver mais minuciosamente a seguir)

- Saponinas (capítulo 22 da obra *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell e Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)), as quais são um grupo heterólogo de glicósidos de esterol e glicósidos triterpenóides que podem ser encontrados na casca, nas folhas, nos caules, nas raízes e mesmo nas flores de diversas espécies vegetais. As saponinas da casca da árvore do sabão *Quillaia saponaria* foram já bastante estudadas como adjuvantes. As saponinas também podem ser obtida comercialmente da *Smilax ornata* (salsaparrilha), *Gypsophilla paniculata* (gipsofila vivaz) e *Saponaria officianalis* (raiz da árvore do sabão). As formulações adjuvantes de saponina incluem formulações purificadas, tais como QS21, bem como formulações de lípidos, tais como ISCOM. O QS21 é comercializado sob a designação Stimulon™. As composições de saponina foram purificadas utilizando HPLC e HPLC-FI. Foram identificadas as fracções específicas purificadas utilizando estas técnicas, incluindo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B e QH-C. De preferência, a saponina é QS21. Um método para a produção de QS21 encontra-se descrito no documento US 5 057 540. É possível utilizar a fracção A de Quil A em conjunto pelo menos com um outro adjuvante (WO 05/02620). As formulações de saponina também podem compreender um esterol, tal como colesterol (WO 96/33739). As combinações de saponinas e de colesteróis podem ser utilizadas para formar partículas únicas designadas por complexos imunoestimuladores (ISCOM) (capítulo 23 da obra *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995

(ISBN 0-306-44867-X)). Tipicamente, os ISCOM também compreendem um fosfolípido, tal como fosfatidietanolamina ou fosfatidilcolina. É possível utilizar qualquer outra saponina conhecida nos ISCOM. De preferência, o ISCOM compreende um ou vários de QuilA, QHA e QHC. Os ISCOM encontram-se ainda descritos nos documentos EP-A-0109942, US 4 578 269, WO 96/11711 e US 6 352 697. Facultativamente, os ISCOM podem ser isentos de detergentes suplementares (WO 00/07621; US 6 506 386). É possível utilizar uma mistura pelo menos de dois complexos ISCOM, em que cada complexo compreende essencialmente uma fracção de saponina, em que os complexos são complexos ISCOM ou complexos de matriz ISCOM (WO 04/04762). Para uma descrição do desenvolvimento de adjuvantes com base em saponina veja-se a obra de Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 247-271 e de Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 321-338.

- Adjuvantes gordos (ver mais minuciosamente *infra*).

- Toxinas de ribosilação de ADP bacterianas (*v.g.*, a enterotoxina "LT" lábil ao calor de *E. coli*, a toxina da cólera "CT" ou a toxina da tosse convulsa "PT") e seus derivados desintoxicados, tais como as toxinas mutantes, conhecidas como LT-K63 e LT R72 (Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290: 455-461). A utilização de toxinas de ribosilação de ADP desintoxicadas como adjuvantes mucosais encontra-se descrita no documento WO 95/17211 e como adjuvantes parentéricos no documento WO 98/42375.

- Biadesivos e mucoadesivos, tais como microesferas de ácido hialurónico esterificado (Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70: 267-276) ou quitosano e seus derivados (WO 99/27960).

- Micropartículas (isto é, uma partícula com um diâmetro entre ~100 nm e ~150 µm, mais preferencialmente um diâmetro entre ~200 nm e ~300 nm ou um diâmetro entre ~500 nm e ~10 µm) formadas a partir de materiais que sejam biodegradáveis e não tóxicos (v.g., um poli(ácido α-hidroxi), um ácido poli-hidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona, etc.), sendo preferível com poli(lactido-co-glicólico), facultativamente tratado de um modo a ter uma superfície carregada negativamente (v.g., com SDS) ou uma superfície carregada positivamente (v.g., com um detergente catiónico, tal como CTAB).

- Lipossomas (capítulos 13 e 14 da obra Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Como exemplos de formulações de lipossomas adequadas para utilização enquanto adjuvantes refere-se as descritas nos documentos US 6 090 406, US 5 916 588 e EP-A-0626169.

- Emulsões de óleo em água (ver a seguir mais minuciosamente).

- Éteres de polioxietileno e ésteres de polioxietileno (WO 99/52549). Tais formulações compreendem ainda tensioactivos de éster de polioxietileno-sorbitano em combinação com um octoxinol (WO 01/21207), bem como tensioactivos de éteres ou ésteres de polioxietileno-alquílicos em combinação pelo menos com um tensioactivo não iónico suplementar, tal como um octoxinol (WO 01/21152). Como éteres de polioxietileno preferidos refere-se os seleccionados entre o conjunto constituído por: éter polioxietileno-9-laurílico ('laureth 9'), éter polioxietileno-9-estearílico, éter polioxietileno-8-

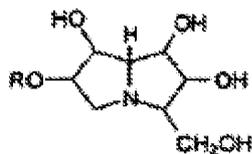
esteorílico, éter polioxietileno-4-laurílico, éter polioxietileno-35-laurílico e éter polioxietileno-23-laurílico.

- Péptidos de muramilo, tais como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("thr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetil-glucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipaimitoxi-propilamida ("DTP-DPP" ou "Theramide™"), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1',2'-dipalmitoíl-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina ("MTP-PE").

- Uma preparação de proteossoma de proteína da membrana exterior preparada a partir de uma primeira bactéria Gram-negativa em combinação com uma preparação de lipossacáridos proveniente de uma segunda bactéria Gram-negativa, em que as preparações de lipossacárido e de proteossoma de proteína da membrana exterior formam um complexo adjuvante não covalente estável. Tais complexos compreendem "IVX-908", um complexo que compreende a membrana exterior de *Neisseria meningitidis* e lipopolissacáridos. Têm vindo a ser utilizados como adjuvantes para vacinas contra a gripe (WO 02/72012).

- 5'-Monofosfato de metil-inosina ("MIMP") (Signorelli e Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8): 1177-86).

- Um composto pirrolizidina poli-hidroxiado (WO 04/64715), tal como um que satisfaz a fórmula estrutural:



em que o símbolo R representa um grupo seleccionado entre o conjunto constituído por hidrogénio e grupos acilo, alquilo

(v.g., cicloalquilo), alcenilo, alquinilo e arilo, lineares ou ramificados, insubstituídos ou substituídos, saturados ou insaturados, ou seus sais ou derivados farmacêuticamente aceitáveis. Como exemplos refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação: casuarina, casuarine-6- $\alpha$ -D-glucopiranosose, 3-epi-casuarina, 7-epi-casuarina, 3,7-diepi-casuarina, etc..

- Uma insulina gama (Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80) ou um seu derivado, tal como algamulina.

- Um ligando CD1d, tal como uma  $\alpha$ -glicosilceramida, v.g.,  $\alpha$ -galactosilceramida.

Estas e outras substâncias adjuvantes activas encontram-se descritas mais minuciosamente na obra Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) e Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 de Methods in Molecular Methods series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.

As composições podem incluir dois ou mais dos referidos adjuvantes. Por exemplo, podem incluir de um modo vantajoso uma emulsão de óleo em água e um agente indutor de citoquinas, uma vez que esta composição melhora as respostas de citoquinas provocadas por vacinas contra a gripe, tais como a resposta de interferão  $\gamma$ , sendo a melhoria muito superior do que a observada quando a emulsão ou o agente são utilizados por si sós.

Tipicamente, os antigénios e os adjuvantes numa composição irão ser utilizados em mistura.

No caso de a vacina incluir um adjuvante, então esta pode ser preparada extemporaneamente, no momento da administração. Assim, a invenção proporciona estojos que

compreendem os componentes antigénio e adjuvante preparados para mistura. O estojo permite que o adjuvante e o antigénio sejam mantidos em separado até ao momento da sua utilização. Os componentes encontram-se fisicamente separados entre si no estojo, podendo tal separação ser alcançada de diversos modos. Por exemplo, os dois componentes podem estar em dois recipientes separados, tais como frascos. O conteúdo dos dois frascos pode então ser misturado, *v.g.*, removendo o conteúdo de um frasco e adicionando-o ao outro frasco, ou por meio da remoção em separado do conteúdo de ambos os frascos e sua mistura num terceiro recipiente. De acordo com uma forma de realização preferida, um dos componentes do estojo encontra-se numa seringa e o outro num recipiente, tal como um frasco. A seringa pode ser utilizada (*v.g.*, com uma agulha) para inserir o seu conteúdo no segundo recipiente para mistura, e a mistura pode então ser retirada para a seringa. O conteúdo misturado da seringa pode então ser administrado a um paciente, tipicamente com uma nova seringa estéril. O armazenamento de um componente numa seringa elimina a necessidade de utilizar uma outra seringa para a administração ao paciente. De acordo com outra forma de realização preferida, os dois componentes do estojo são mantidos em conjunto, mas separados na mesma seringa, *v.g.*, uma seringa com dois compartimentos, tais como os descritos nos documentos WO 05/89837, US 6 692 468, WO 00/07647, WO 99/17820, US 5 971 953, US 4 060 082, EP-A-0520618 e WO 98/01174. Quando se acciona a seringa (*v.g.*, durante a administração a um paciente) o conteúdo dos dois compartimentos é misturado. Esta forma de realização evita

a necessidade de um passo de mistura em separado no momento da utilização.

#### Adjuvantes em emulsões de óleo em água

Concluiu-se que as emulsões de óleo em água são particularmente adequadas para utilização como adjuvantes em vacinas contra o vírus da gripe. São conhecidas diversas de tais emulsões, as quais compreendem tipicamente pelo menos um óleo e pelo menos um tensioactivo, sendo o(s) óleo(s) e o(s) tensioactivo(s) biodegradáveis (metabolisáveis) e biocompatíveis. As gotículas de óleo na emulsão possuem normalmente um diâmetro inferior a 5 µm, podendo mesmo apresentar um diâmetro sub-mícron, sendo tais tamanhos pequenos alcançáveis com um microfluidificador para proporcionar emulsões estáveis. São preferíveis gotículas com um tamanho inferior a 220 nm, uma vez que podem ser submetidas a esterilização por filtração.

A invenção pode ser utilizada com óleos, tais como os provenientes de uma fonte animal (tal como de peixe) ou de uma fonte vegetal. Como fontes de óleos vegetais refere-se frutos, sementes e grãos. O óleo de amendoim, o óleo de soja, o óleo de coco e o azeite constituem exemplos dos óleos de frutos mais comuns comercialmente disponíveis. É possível utilizar óleo de jojoba, v.g., obtido a partir do feijão de jojoba. Como óleos de sementes refere-se o óleo de açafrão, o óleo de sementes de algodão, o óleo de sementes de girassol, o óleo de sésamo e semelhantes. No grupo dos grãos, o óleo de milho é o que se encontra mais facilmente disponível, embora também possa ser utilizado o óleo de outros grãos de cereais, tais como trigo, aveia, centeio, arroz, teff, triticale e semelhantes. É possível

preparar ésteres de ácidos gordos com 6 a 10 átomos de carbono de glicerol e de 1,2-propanodiol, embora não ocorram naturalmente em óleos de sementes, por hidrólise, separação e esterificação dos materiais de partida adequados provenientes de óleos de frutos e de sementes. As gorduras e os óleos provenientes do leite de mamíferos são metabolizados e podem, por tal motivo, ser utilizados na presente invenção. Os procedimentos para a separação, purificação, saponificação e outros meios necessários para a obtenção de óleos puros de fontes animais são bem conhecidos na especialidade. A maior parte dos peixes contém óleos metabolizados que podem ser facilmente recuperados. Por exemplo, o óleo de fígado de bacalhau, os óleos de fígado de tubarão e o óleo de baleia, tal como espermacete, constituem exemplos de diversos dos óleos de peixe que podem aqui ser utilizados. Há diversos óleos de cadeia ramificada que são bioquimicamente sintetizados em unidades isopreno com 5 carbonos, os quais são normalmente referidos como terpenóides. O óleo de fígado de tubarão contém terpenóides insaturados e ramificados designados por esqualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, o qual é aqui particularmente preferido. O esqualano, que é o análogo saturado de esqualeno, também constitui um óleo preferido. Os óleos de peixe, incluindo esqualeno e esqualano, encontram-se comercialmente disponíveis em fontes comerciais ou podem ser obtidos por métodos conhecidos na especialidade. Como outros óleos preferidos refere-se os tocoferóis (ver *infra*). Também é possível utilizar misturas de óleos.

Os tensioactivos podem ser classificados quanto ao seu 'HLB' (equilíbrio hidrófilo/lipófilo). Os tensioactivos

preferidos de acordo com a invenção possuem um HLB pelo menos de 10, de preferência pelo menos de 15 e ainda mais preferencialmente pelo menos de 16. A invenção pode ser utilizada com tensioactivos incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação: tensioactivos de ésteres de polioxietileno-sorbitano (normalmente designados como 'Tweens'), em particular polissorbato 20 e polissorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) e/ou óxido de butileno (BO), comercializados sob a designação comercial DOWFAX™, tais como copolímeros de bloco EO/PO lineares; octoxinóis, os quais podem variar no número de grupos etoxi repetidos (oxi-1,2-etanodiilo), sendo particularmente interessante o octoxinol-9 ('Triton X 100' ou t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)-polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos, tais como fosfatidilcolina (lecitina); éteres gordos de polioxietileno provenientes dos álcoois laurílico, cetílico, estearílico e oleílico (designados por tensioactivos Brij), tais como éter trietilenoglicol-monolaurílico (Brij 30); e ésteres de sorbitano (normalmente conhecidos como SPAN), tais como trioleato de sorbitano (Span 85) e monolaurato de sorbitano. Como tensioactivos preferidos para inclusão na emulsão refere-se 'Tween 80' (monooleato de polioxietileno-sorbitano), 'Span 85' (trioleato de sorbitano), lecitina e 'Triton X 100'. Também é possível utilizar mistura de tensioactivos, v.g., misturas de 'Tween 80'/'Span 85'.

Como adjuvantes específicos em emulsão de óleo em água úteis de acordo com a invenção refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação:

- uma emulsão sub-mícron de esqualeno, 'Tween 80' e 'Span 85'. A composição da emulsão em volume pode ser de cerca de 5% de esqualeno, cerca de 0,5% de polissorbato 80 e cerca de 0,5% de 'Span 85'. Em termos de peso, estas proporções ficam 4,3% de esqualeno, 0,5% de polissorbato 80 e 0,48% de 'Span 85'. Este adjuvante é conhecido como 'MF59' (WO 90/14837; Podda e Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 197-203; Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680), conforme descrito mais minuciosamente no capítulo 10 da obra *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) e no capítulo 12 da obra *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 de *Methods in Molecular Methods series*). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan. De um modo vantajoso, a emulsão MF59 compreende iões citrato, *v.g.*, tampão de citrato de sódio 10 mM.

- Uma emulsão de esqualeno, um tocoferol e 'Tween 80'. A emulsão pode compreender soluto salino tamponado com fosfato. Também pode incluir 'Span 85' (*v.g.*, a 1%) e/ou lecitina. Estas emulsões podem compreender entre 2% e 10% de esqualeno, entre 2% e 10% de tocoferol e entre 0,3% e 3% de 'Tween 80', e a proporção em peso entre esqualeno:tocoferol é preferencialmente  $< 1$ , uma vez que esta razão proporciona uma emulsão mais estável. Uma tal emulsão pode ser preparada por dissolução de 'Tween 80' em PBS para se obter uma solução a 2%, subsequente mistura de 90 mL desta solução com uma mistura de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol e 5 mL de esqualeno) e depois submeter a mistura a microfluidificação. A emulsão resultante pode possuir gotículas de óleo sub-mícron, *v.g.*, com um diâmetro médio

compreendido entre 100 e 250 nm e de preferência de cerca de 180 nm.

- Uma emulsão de esqualeno, um tocoferol e um detergente 'Triton' (v.g., 'Triton X-100').

- Uma emulsão de esqualano, polissorbato 80 e poloxâmero 401 ("Pluronic™ L121"). A emulsão pode ser formulada em soluto salino tamponado com fosfato, pH 7,4. Esta emulsão constitui um veículo de administração útil para dipéptidos de muramilo e tem vindo a ser utilizada com treonil-MDP no adjuvante "SAF 1" (Allison e Byars (1992) Res Immunol 143: 519-25) (0,05%-1% de Thr-MDP, 5% de esqualano, 2,5% de 'Pluronic L121' e 0,2% de polissorbato 80). Também pode ser utilizada sem Thr-MDP, como no adjuvante "AF" (Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55: 3486-9) (5% de esqualano, 1,25% de 'Pluronic L121' e 0,2% de polissorbato 80). É preferível a microfluidificação.

- Uma emulsão que possui entre 0,5% e 50% de um óleo, entre 0,1% e 10% de um fosfolípido e entre 0,05% e 5% de um tensoactivo não iónico. Conforme descrito no documento WO 95/11700, como componentes fosfolípidos preferidos refere-se fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatidínico, espingomiéline e cardiolipina. São vantajosos tamanhos de gotículas sub-mícron.

- Uma emulsão de óleo em água sub-mícron de um óleo não metabolizável (tal como um óleo mineral leve) e pelo menos um tensoactivo (tal como lecitina, 'Tween 80' ou 'Span 80'). É possível incluir aditivos, tais como saponina Quila, colesterol, um conjugado saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, descrito no documento US 6 080 725, preparado por adição de amina alifática a desacilsaponina por meio do

grupo carboxilo do ácido glucurónico), brometo de dimetildioctadecil-amónio e/ou N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxiethyl)-propanodiamina.

- Uma emulsão na qual uma saponina (*v.g.*, QuilA ou QS21) e um esterol (*v.g.*, um colesterol) estão associados como micelas em hélice (WO 05/097181).

As emulsões podem ser misturadas extemporaneamente com antigénios, no momento da administração. Assim, o adjuvante e o antigénio podem ser mantidos em separado numa vacina embalada ou distribuída, preparada para formulação final no momento de utilização. De um modo geral, o antigénio irá estar sob uma forma aquosa, de um modo tal que a vacina seja preparado no final por mistura dos dois líquidos. A proporção em volume entre os dois líquidos para mistura pode variar (*v.g.*, entre 5:1 e 1:5), mas é normalmente cerca de 1:1.

Depois de se misturar o antigénio e o adjuvante, o antigénio irá normalmente permanecer na solução aquosa, mas pode-se distribuir à volta da interface óleo/água. De um modo geral, muito pouco ou mesmo nenhum antigénio irá entrar na fase oleosa da emulsão.

No caso de a composição compreender um tocoferol, então é possível utilizar qualquer um dos tocoferóis  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ou  $\zeta$ , mas são preferíveis os tocoferóis  $\alpha$ . O tocoferol pode assumir diversas formas, *v.g.*, sais e/ou isómeros diferentes. Como sais refere-se sais orgânicos, tais como succinato, acetato, nicotinato, etc.. é possível utilizar tanto o D- $\alpha$ -tocoferol como o DL- $\alpha$ -tocoferol. Os tocoferóis são incluídos vantajosamente nas vacinas para utilização em idosos (*v.g.*, com idade de 60 anos ou superior) uma vez que tem sido descrito que a vitamina E

possui um efeito positivo sobre a resposta imune neste grupo de pacientes (Han *et al.* (2005) Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 de Junho de 2005). Também possuem propriedades anti-oxidantes que podem auxiliar a estabilização das emulsões (US 6 630 161). Como  $\alpha$ -tocoferol preferido refere-se o DL- $\alpha$ -tocoferol, sendo o sal preferido deste tocoferol o succinato. Concluiu-se que o sal succinato coopera com ligandos associados a TNF *in vivo*. Além do mais, sabe-se que o succinato de  $\alpha$ -tocoferol é compatível com vacinas (por exemplo, vacinas contra a gripe) e que é um conservante útil como alternativa a compostos de mercúrio (WO 02/097072).

#### *Agentes indutores de citocinas*

Os agentes indutores de citocinas para inclusão nas composições da invenção são capazes, quando administrados a um paciente, de fazer com que o sistema imune liberte citocinas, incluindo interferões e interleucinas. Sabe-se que as respostas de citocinas estão implicadas nos estados iniciais e decisivos da defesa do hospedeiro contra uma infecção com patógenos (Hayden *et al.* (1998) J Clin Invest 101 (3): 643-9). OS agentes preferidos podem promover a libertação de um ou vários de: interferão  $\gamma$ ; interleucina 1; interleucina 2; interleucina 12; TNF  $\alpha$ ; TNF  $\beta$ ; e GM CSF. Os agentes preferidos promovem a libertação de citocinas associada a uma resposta imune do tipo Th1, *v.g.*, interferão  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , interleucina 2. É preferível a estimulação tanto de interferão  $\gamma$  como de interleucina 2.

Como resultado da administração de uma composição da invenção, o paciente irá ter células T que, quando estimuladas com um antigénio, irão libertar a(s) citocina(s) desejada(s) de um modo específico ao antigénio. Por exemplo, a forma de células T purificadas no sangue irá libertar interferão  $\gamma$  quando exposta *in vitro* ao antigénio estimulado. Os métodos para a determinação de tais respostas em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são conhecidos na especialidade, e compreendem ELISA, ELISPOT, citometria de fluxo e PCR em tempo real. Por exemplo, Tassignon *et al.* (2005) *J Immunol Meth* 305: 188-98 descrevem um estudo no qual respostas imunes mediadas por células T específicas do antigénio contra o toxóide do tétano, em particular respostas de interferão  $\gamma$ , foram monitorizadas e concluiu-se que o ELISPOT constituía o método mais sensível para discriminar as respostas induzidas por TT específicas do antigénio a partir de respostas espontâneas, mas que a detecção de citocina intracitoplásmica por citometria de fluxo era o método mais eficiente para detectar efeitos de re-estimulação.

Como agentes indutores de citocinas adequados refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação:

- Um oligonucleótido imunoestimulador, tal como um que contenha um motivo CpG (uma sequência dinucleotídica que contenha uma citosina não metilada ligada por meio de uma ligação fosfato a uma guanosina) ou um ARN de cadeia dupla ou um oligonucleótido que contenha uma sequência palindrômica ou um oligonucleótido que contenha uma sequência poli(dG).

- Monofosforil-lípido A 3-O-desacilado ('33dMPL', também conhecido como 'MPL™') (Myers *et al.* (1990) páginas 145-156 da obra Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions; Ulrich (2000) capítulo 16 (páginas 273-282) da obra Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (volume 42 da obra Methods in Molecular Methods series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan; Johnson *et al.* (1999) J Med Chem 42: 4640-9; Baldrick *et al.* (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35: 398-413).

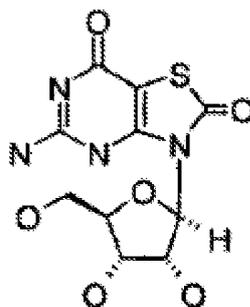
- Um composto imidazoquinolina, tal como Imiquimod ("R 837") (US 4 680 338; US 4 988 815), Resiquimod ("R 848") (WO 92/15582), e seus sais (*v.g.*, os sais cloridrato). É possível encontrar uma descrição mais minuciosa a propósito de imidazoquinolinas imunestimuladoras por Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27: 571-577, Wu *et al.* (2004) Antiviral Res. 64(2): 79-83, Vasilakos *et al.* (2000) Cell Immunol. 204(1): 64-74, nos documentos US 4 689 338, US 4 929 624, US 5 238 944, US 5 266 575, US 5 268 376, US 5 346 905, US 5 352 784, US 5 389 640, US 5 395 937, US 5 482 936, US 5 494 916, US 5 525 612, US 6 083 505, US 6 440 992, US 6 627 640, US 6 656 938, US 6 660 735, US 6 660 747, US 6 664 260, US 6 664 264, US 6 664 265, US 6 667 312, US 6 670 372, US 6 677 347, US 6 677 348, US 6 677 349, US 6 683 088, US 6 703 402, US 6 743 920, US 6 800 624, US 6 809 203, US 6 888 000, US 6 924 293 e Jones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4: 214-218.

- Um composto tio-semicarbazona, tal como os descritos no documento WO 2004/060308. Os métodos de formulação, de preparação e de pesquisa de compostos activos também se encontram descritos no documento WO 2004/060308. As tio-

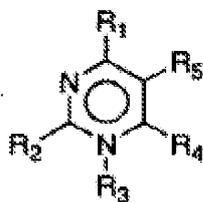
semicarbazonas também são particularmente eficazes na estimulação de células mononucleares periféricas humanas para a produção de citocinas, tais como TNF- $\alpha$ .

- Um composto triptantrina, tal como os descritos no documento WO 2004/064759. Os métodos de formulação, de preparação e de pesquisa de compostos activos também se encontram descritos no documento WO 2004/064759. As tio-semicarbazonas também são particularmente eficazes na estimulação de células mononucleares periféricas humanas para a produção de citocinas, tais como TNF- $\alpha$ .

- Um análogo nucleosídico, tal como: (a) isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



e seus pró-fármacos; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) os compostos descritos nos documentos US 6 924 271, US 2005/0070556 e US 5 658 731; (f) um composto que satisfaz a fórmula estrutural:



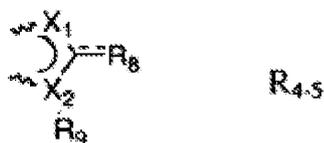
em que:

cada um dos símbolos R1 e R2 representa independentemente H, halo, -NRaRb, -OH, alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído, heterociclilo, heterociclilo substituído,

arilo(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), arilo(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) substituído, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) ou alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído;

o símbolo R<sub>3</sub> está ausente ou representa H, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído, arilo(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), arilo(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) substituído, heterociclilo ou heterociclilo substituído;

cada um dos símbolos R<sub>4</sub> e R<sub>5</sub> representa independentemente H, halo, heterociclilo, heterociclilo substituído, C(O)-R<sub>d</sub>, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído ou então estão ligados para formar um anel com 5 membros, tal como na fórmula estrutural R<sub>4-5</sub>:



sendo a ligação alcançada pelas ligações indicadas por cada um dos símbolos X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> representa independentemente N, C, O ou S;

o símbolo R<sub>8</sub> representa H, halo, -OH, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), alquinilo(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), -OH, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-R<sub>c</sub>, -O-(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), -S(O)pré ou -C(O)-R<sub>d</sub>;

o símbolo R<sub>9</sub> representa H, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído, heterociclilo, heterociclilo substituído ou R<sub>9a</sub>, em que o símbolo R<sub>9a</sub> representa:



sendo a ligação alcançada na ligação por cada um dos símbolos R<sub>10</sub> e R<sub>11</sub> representa independentemente H, halo, alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído, -NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub> ou -OH;

cada um dos símbolos Ra e Rb representa independentemente H, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído, -C(O)Rd, arilo(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>);

cada símbolo Rc representa independentemente H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) ou alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído;

cada símbolo Rd representa independentemente H, halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído, alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)), -NH(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído), -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))<sub>2</sub>, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído)<sub>2</sub>, arilo(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) ou heterociclilo;

cada símbolo Re representa independentemente H, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído, arilo(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), arilo(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) substituído, heterociclilo ou heterociclilo substituído;

cada símbolo Rf representa independentemente H, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) substituído, -C(O)Rd, fosfato, difosfato ou trifosfato;

cada símbolo n representa independentemente 0, 1, 2 ou 3;

cada símbolo p representa independentemente 0, 1 ou 2

ou (g) um sal farmacêuticamente aceitável de qualquer um de (a) a (f), um tautômero de qualquer um de (a) a (f) ou um sal farmacêuticamente aceitável do tautômero.

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) (US 5 011 828).

- Compostos descritos no documento WO 2004/87153, incluindo: compostos acilpiperazina, compostos indolediona, compostos tetra-hidroisoquinolina (THIQ), compostos benzociclodiona, compostos aminoazavinilo, compostos aminobenzimidazole-quinolinona (ABIQ) (US 6 605 617; WO 02/18383), composto hidroftalamida, compostos benzofenona, compostos isoxazole, compostos esterol, compostos

quinazilinona, compostos pirrole (WO 2004/1018455), compostos antraquinona, compostos quinoxalina, compostos triazina, compostos pirazalopirimidina e compostos benzazole (WO 03/082272).

- Compostos descritos no documento PCT/US2005/022769.

- Um derivado fosfato aminoalquil-glucosaminida, tal como RC 529 (Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273-2278; Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 219-229).

- Um fosfazeno, tal como poli-(di-(carboxilatofenoxi)-fosfazeno) ("PCPP"), conforme descrito, por exemplo, por Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19: 109-115 e Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31: 185-196.

- Imunopotenciadores em moléculas pequenas (SMIP), tais como:

N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina

N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)-quinolina-2,4-diamina

N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)-quinolina-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo(4,5-c)-quinolina-2,4-diamina

1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo(4,5-c)-quinolina-2,4-diamina

N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina

N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)-quinolina-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina

N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo-  
 (4,5-c)quinolina-2,4-diamina  
 1-(2-metilpropil)-2-((fenilmetil)-tio)-1H-imidazo(4,5-  
 c)quinolina-4-amina  
 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo(4,5-c)-  
 quinolina-4-amina  
 2-((4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)-  
 quinolina-2-il)-(metil)-amino)-etanol  
 acetato de 2-((4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo-  
 (4,5-c)quinolina-2-il)-(metil)-amino)-etilo  
 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-di-hidro-2H-imidazo(4,5-c)-  
 quinolina-2-ona  
 N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-  
 imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina  
 N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenil-  
 metil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina  
 N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-  
 imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina  
 N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-  
 1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina  
 1-{4-amino-2-(metil-(propil)-amino)-1H-imidazo(4,5-c)-  
 quinolina-1-il}-2-metilpropan-2-ol  
 1-(4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-  
 1-il)-2-metilpropan-2-ol  
 N4,N4-dibenzil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-  
 1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina.

Os agentes indutores de citoquinas para utilização na  
 presente invenção podem ser moduladores e/ou agonistas de  
 receptores de tipo portagem (TLR). Por exemplo, podem ser  
 agonistas de uma ou várias das proteínas TLR1, TLR2, TLR3,  
 TLR4, TLR7, TLR8 e/ou TLR9 humanas. Como agentes preferidos

refere-se os agonistas de TLR7 (*v.g.*, imidazoquinolinas) e/ou de TLR9 (*v.g.*, oligonucleótidos CpG). Estes agentes são úteis para activarem os circuitos inatos de imunidade.

O agente indutor de citocinas pode ser adicionado à composição em diversas etapas durante a sua produção. Por exemplo, pode estar numa composição de antigénio, podendo esta mistura ser adicionada a uma emulsão de óleo em água. Em alternativa, pode estar na emulsão de óleo em água, caso esse em que o agente pode ser adicionado aos componentes da emulsão antes da emulsificação ou pode ser adicionado à emulsão após a emulsificação. De igual modo, o agente pode ser co-acervado com as gotículas da emulsão. A localização e a distribuição do agente indutor de citocinas na composição final irá depender das suas propriedades hidrofílicas/lipofílicas, *v.g.*, o agente pode estar localizado na fase aquosa, na fase oleosa e/ou na interface óleo-água.

O agente indutor de citocinas pode ser conjugado com um agente separado, tal com um antigénio (*v.g.*, CRM197). Uma descrição geral sobre técnicas de conjugação para moléculas pequenas encontra-se descrita por Thompson *et al.* (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94: 255-266. Em alternativa, os adjuvantes podem ser associados de um modo não covalente com os agentes suplementares, tais como por meio de interacção hidrofóbicas ou iónicas.

Dois agentes indutores de citocinas preferidos são (a) oligonucleótidos imunoestimuladores e (b) 3dMPL.

Os oligonucleótidos imunoestimuladores podem compreender modificações/análogos de nucleótidos, tais como modificações de fosforotioato e podem ser de cadeia dupla ou de cadeia simples (excepto para o ARN). Kandimalla *et*

*al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31: 2393-2400, WO 02/26757 e WO99/62923 substituições possíveis de análogos, *v.g.*, substituição de guanossina com 2'-desoxi-7-deazaguanossina. O efeito do adjuvante de oligonucleótidos CpG encontra-se ainda descrito por Krieg (2003) *Nature Medicine* 9: 831-835, McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 179-185, WO 98/401, US 6 207 646, US 6 239 116 e US 6 429 199. Uma sequência CpG pode ser direcionada a TLR9, tal como o motivo GTCGTT ou TTCGTT (Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3): 654-658). A sequência CpG pode ser específica para a indução de uma resposta imune Th1, tal como uma ODN CpG-A (oligodesoxinucleótido) ou pode ser mais específica para a indução de uma resposta de células B, tal como uma ODN CpG-B. As ODN CpG-A e CpG-B encontram-se descritas por Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170: 4061-4068, Krieg (2002) *Trends Immunol* 23: 64-65 e WO 01/95935. De preferência, CpG é uma ODN CpG-A. De preferência, o oligonucleótido CpG é construído de modo a que a extremidade 5' esteja acessível para o reconhecimento pelo receptor. Facultativamente, as duas sequências de oligonucleótidos CpG podem estar ligadas nas suas extremidades 3' para formar "imunómeros". Ver, por exemplo, Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3): 654-658, Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306: 948-953, Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300: 853-861 e WO 03/035836. Um adjuvante CpG útil é CpG7909, também conhecido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

Como alternativa, ou adicionalmente, à utilização de sequências CpG, é possível utilizar sequências TpG (WO

01/22972). Estes oligonucleótidos podem estar isentos de motivos CpG não metilados.

O oligonucleótido imunoestimulador pode ser rico em pirimidina. Por exemplo, pode compreender mais do que um nucleótido timidina consecutivos (v.g., TTTT, conforme descrito no documento WO 01/22972) e/ou pode possuir uma composição nucleotídica com > 25% de timidina (v.g., > 35%, > 40%, > 50%, > 60%, > 80%, etc.). Por exemplo, pode compreender mais do que um nucleótido citosina consecutivos (v.g., CCCC, conforme descrito no documento WO 2004/87153) e/ou pode possuir uma composição nucleotídica com > 25% de citosina (v.g., > 35%, > 40%, > 50%, > 60%, > 80%, etc.). Estes oligonucleótidos podem estar isentos de motivos CpG não metilados.

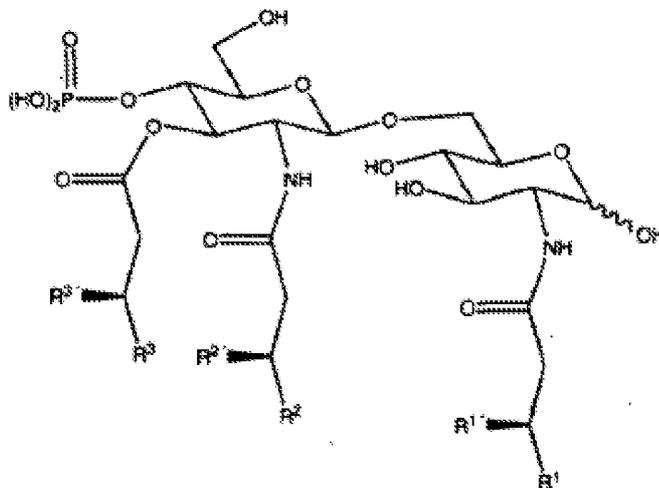
Os oligonucleótidos imunoestimuladores irão compreender tipicamente pelo menos 20 nucleótidos. Podem compreender menos de 100 nucleótidos.

O 3dMPL (também conhecido como monofosforil-lípido A 3-de-O-acilado ou 3-O desacil-4'-monofosforil-lípido A) é um adjuvante em que a posição 3 da glucosamida da extremidade redutora no monofosforil-lípido A foi desacilada. O 3dMPL foi preparado a partir de um mutante sem heptose de *Salmonella Minnesota* e é quimicamente semelhantes ao lípido A, mas falta-lhe um grupo fosforilo lábil a ácidos e um grupo acilo lábil a bases. Activa células da linhagem monócitos/macrófagos e estimula a libertação de diversas citoquinas, incluindo IL-1, IL-12, TNF  $\alpha$  e GM-CSF (ver também Thompson *et al.* (2005) *J Leukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'). A

preparação de 3dMPL foi inicialmente descrita no documento GB A 2220211.

O 3dMPL pode assumir a forma de uma mistura de moléculas associadas, variando na sua acilação (v.g., possuindo 3, 4, 5 ou 6 cadeias acilo, as quais podem ter comprimentos diferentes). Os dois monossacáridos de glucosamina (também conhecidos como 2 desoxi-2-amino-glicose) são N-acilados nos seus átomos de carbono na posição 2 (isto é, nas posições 2 e 2'), verificando-se também O-acilação na posição 3'. O grupo ligado ao carbono 2 satisfaz a fórmula geral  $-NH-CO-CH_2-CR_1R_1'$ . O grupo ligado ao carbono 2' satisfaz a fórmula geral  $-NH-CO-CH_2-CR_2R_2'$ . O grupo ligado ao carbono 3' satisfaz a fórmula geral  $-O-CO-CH_2-CR_3R_3'$ .

Uma estrutura representativa é:



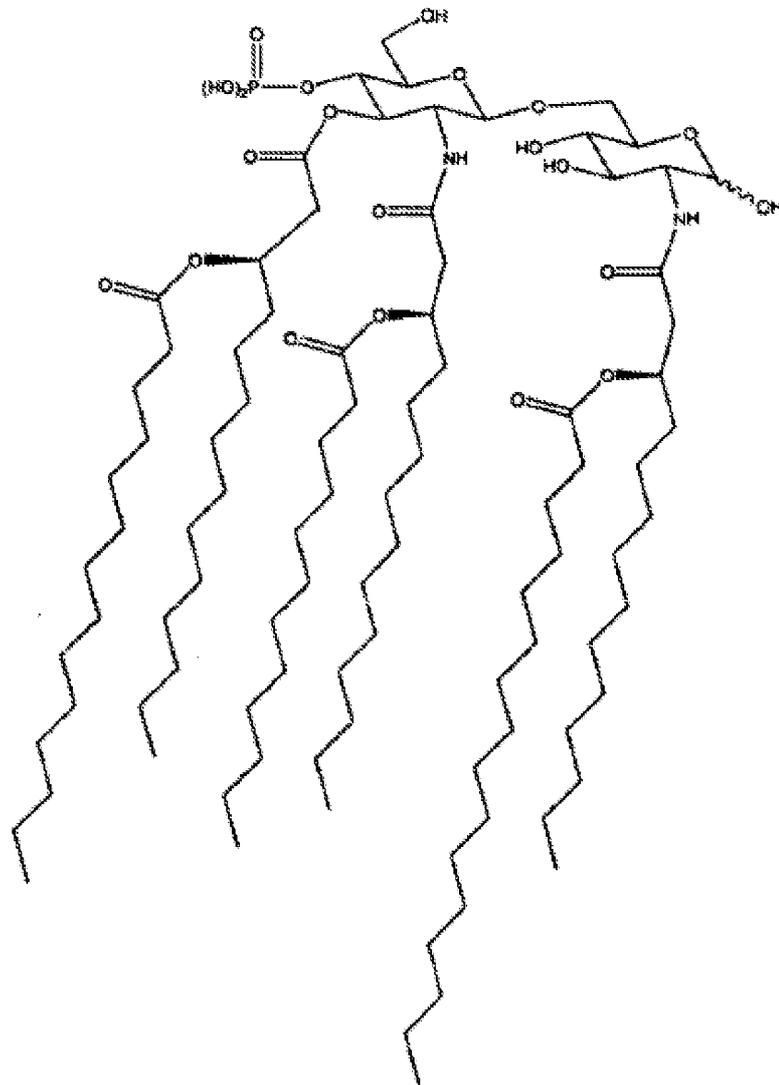
Cada um dos grupos  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  representa independentemente  $-(CH_2)_n-CH_3$ . O valor de  $n$  está compreendido preferencialmente entre 8 e 16, mais referencialmente entre 9 e 12 e ainda mais preferencialmente é 10.

Cada um dos grupos  $R_1'$ ,  $R_2'$  e  $R_3'$  representa independentemente: (a)  $-H$ ; (b)  $-OH$  ou (c)  $-O-COR_4$ , em que o

símbolo R4 representa -H ou  $-(CH_2)_m-CH_3$ , em que o valor de m está preferencialmente compreendido entre 8 e 16 e mais preferencialmente é 10, 12 ou 14. Na posição 2, m é preferencialmente 14. Na posição 2', m é preferencialmente 10. Na posição 3', m é preferencialmente 12. Os grupos R1', R2' e R3' são assim preferencialmente grupos -O-acilo provenientes do ácido decanóico, do ácido tetradecanóico ou do ácido hexadecanóico.

Quando todos os símbolos R1', R2' e R3' representam -H, então o 3dMPL possui apenas 3 cadeias acilo (uma em cada uma das posições 2, 2' e 3'). Quando apenas dois dos símbolos R1', R2' e R3' representam -H, então o 3dMPL pode ter 4 cadeias acilo. Quando apenas um dos símbolos R1', R2' e R3' representa -H, então o 3dMPL pode possuir 5 cadeias acilo. Quando nenhum dos símbolos R1', R2' e R3' representa -H, então o 3dMPL pode possuir 6 cadeias acilo. O adjuvante 3dMPL utilizado de acordo com a invenção pode ser uma mistura destas formas, possuindo entre 3 e 6 cadeias acilo, mas é preferível incluir o 3dMPL com 6 cadeia acilo na mistura e, em particular, garantir que a cadeia hexa-acilo constitua pelo menos 10% em peso do total de 3dMPL, *v.g.*, > 20%, > 30%, > 40%, > 50% ou mais. Concluiu-se que o 3dMPL com 6 cadeias acilo é a forma de adjuvante mais activa.

Assim, a forma mais preferida de 3dMPL para inclusão nas composições de acordo com a invenção é:



No caso de 3dMPL ser utilizado sob a forma de uma mistura, então referências em termos de quantidades ou de concentrações de 3dMPL nas composições dizem respeito às espécies de 3dMPL combinadas na mistura.

Em condições aquosas, o 3dMPL pode formar agregados ou partículas micelares com tamanhos diferentes, *v.g.*, com um diâmetro  $< 150$  nm ou  $> 500$  nm. Qualquer um ou ambos podem ser utilizados com a invenção, em que as melhores partículas podem ser seleccionadas por meio de um ensaio de rotina. As partículas mais pequenas (*v.g.*, suficientemente

pequenas para se obter uma suspensão aquosa límpida de 3dMPL) são preferíveis para utilização de acordo com a invenção, uma vez que possuem uma actividade superior (WO 94/21292). As partículas preferidas possuem um diâmetro médio inferior a 220 nm, mais preferencialmente inferior a 200 nm ou inferior a 150 nm ou inferior a 120 nm e podem mesmo apresentar um diâmetro médio inferior a 100 nm. No entanto, na maior parte dos casos, o diâmetro médio não deverá ser inferior a 50 nm. Estas partículas são suficientemente pequenas para serem adequadas para esterilização por filtração. O diâmetro das partículas pode ser testado por técnicas de rotina de dispersão dinâmica de luz, as quais indicam o diâmetro médio das partículas. No caso de uma partícula possuir um diâmetro de  $x$  nm, então irá existir normalmente uma distribuição de partículas em torno desta média, mas pelo menos 50% em número (*v.g.*, > 60%, > 70%, > 80%, > 90% ou superior) das partículas irão possuir um diâmetro no intervalo de  $x + 25\%$ .

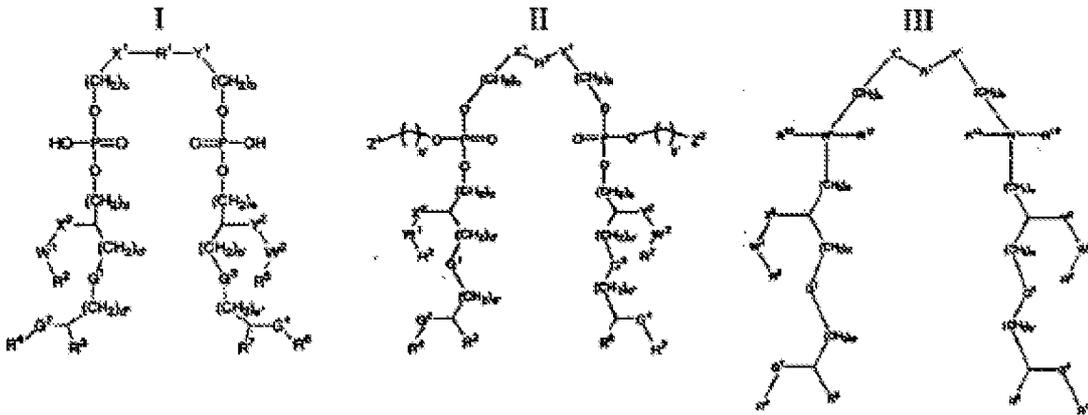
O 3dMPL pode ser vantajosamente utilizado com uma emulsão de óleo em água. Praticamente todo o 3dMPL pode estar localizado na fase aquosa da emulsão.

O 3dMPL pode ser utilizado por si só ou em combinação com um ou vários outros compostos. Por exemplo, é conhecida a utilização de 3dMPL em combinação com a saponina QS21 (WO 94/00153) (incluindo numa emulsão de óleo em água (WO 95/17210)), com um oligonucleótido imunoestimulador, com QS21 e um oligonucleótido imunoestimulador, com fosfato de alumínio (WO 96/26741), com hidróxido de alumínio (WO 93/19780 ou com fosfato de alumínio e hidróxido de alumínio).

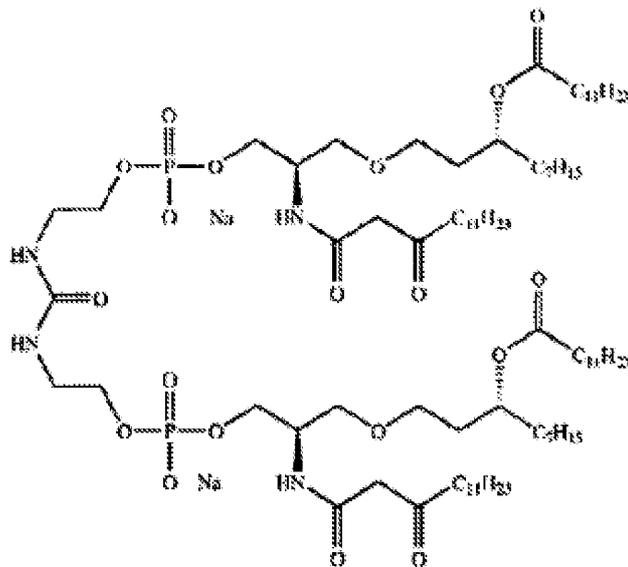
Adjuvantes gordos

Como adjuvantes gordos que podem ser utilizados com a invenção refere-se as emulsões de óleo em água descritas antes e também, por exemplo:

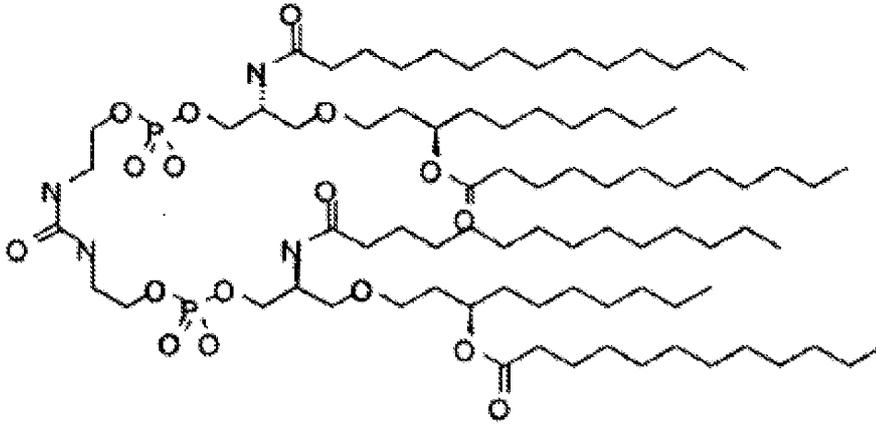
• Um composto de fórmula estrutural I, II ou III, ou um seu sal:



conforme definido no documento WO03/011223, tal como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', 'ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', ER 803022 ou 'ER 804057', v.g.:



**ER804057**



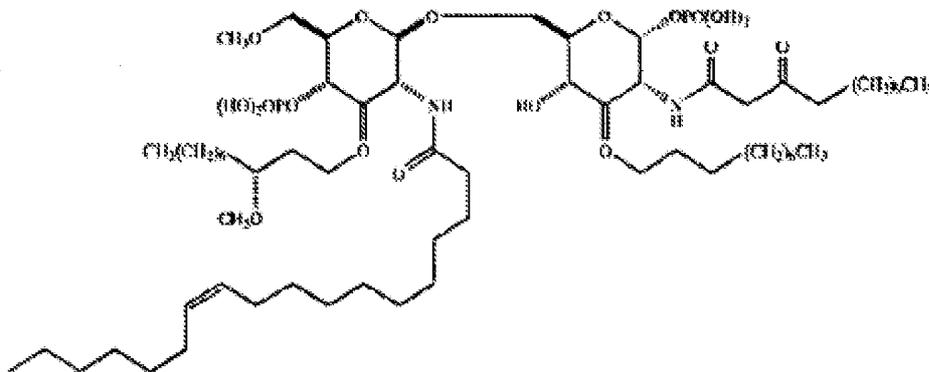
ER 803022:

- Derivados do lípido A de *Escherichia coli*, tal como OM-174 (descrito por Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21: 2485-2491 e Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21: 836-842).

- Uma formulação de um lípido catiónico e um co-lípido (normalmente neutro), tal como brometo-difitanoilfosfatidil-etanolamina de aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanamínio ("Vaxfectin™") ou brometo-dioleoilfosfatidil-etanolamina de aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanamínio ("GAP-DLRIE:DOPE"). As formulações que contêm sais de (+)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradecenoiloxi)-1-propanamínio são preferidas (US 6 586 409).

- Monofosforil-lípido A 3-O-desacilado (ver antes).

- Compostos que contenham lípidos ligados a uma estrutura acíclica que contém fosfato, tal como o antagonista de TLR4, E5564 (Wong *et al.* (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7): 735-42; US 2005/0215517):



### Adjuvantes de sal de alumínio

É possível utilizar os adjuvantes conhecidos como hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. Estes nomes são convencionais, mas são apenas utilizados por conveniência, uma vez que nenhum constitui uma descrição precisa do composto químico actual que está presente (v.g., ver capítulo 9 da obra *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). A invenção pode utilizar qualquer um dos adjuvantes "hidróxido" ou "fosfato" que são normalmente utilizados como adjuvantes.

Os adjuvantes conhecidos como "hidróxido de alumínio" são tipicamente sais de oxi-hidróxido de alumínio, os quais são normalmente pelo menos parcialmente cristalinos. O oxi-hidróxido de alumínio, o qual pode ser representado pela fórmula geral  $AlO(OH)$ , pode ser distinguido de outros compostos de alumínio, tais como hidróxido de alumínio  $Al(OH)_3$ , por espectroscopia de infravermelhos (IR), em particular na presença de uma banda de absorção a  $1070\text{ cm}^{-1}$  e um patamar forte a  $3090\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$  (capítulo 9 da obra *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). O

grau de cristalinidade de um adjuvante é reflectido pela largura da banda de difracção a metade da altura (WHH), em que partículas fracamente cristalinas apresentam um estreitamento da linha maior devido a tamanhos de cristais mais pequenos. A área de superfície aumenta na medida em que aumenta a WHH, e adjuvantes com valores de WHH superiores parecem apresentar uma capacidade superior para a adsorção de antigénio. Uma morfologia fibrosa (*v.g.*, conforme observada em micrógrafos de transmissão de electrões) é típica para adjuvantes de hidróxido de alumínio. O pI de adjuvantes de hidróxido de alumínio é tipicamente de cerca de 11, isto é, o adjuvante por si só possui uma carga positiva na superfície a um valor de pH fisiológico. Foram já descritas capacidades adsorptivas entre 1,8 e 2,6 mg de proteína por mg de  $Al^{+++}$  a pH 7,4 para adjuvantes de hidróxido de alumínio.

Os adjuvantes conhecidos como "fosfato de alumínio" são tipicamente hidroxifosfatos de alumínio, muitas vezes contendo uma pequena quantidade de sulfato (isto é, hidroxifosfato-sulfato de alumínio). Podem ser obtidos por precipitação e as condições de reacção e concentrações durante a precipitação influenciam o grau de substituição do fosfato para hidroxilo no sal. De um modo geral, os hidroxifosfatos possuem uma proporção molar  $PO_4/Al$  compreendida entre 0,3 e 1,2. Os hidroxifosfatos podem ser distinguidos de  $AlPO_4$  puro por meio da presença de grupos hidroxilo. Por exemplo, uma banda do espectro de IR a  $3164\text{ cm}^{-1}$  (*v.g.*, quando aquecido a  $200^\circ\text{C}$ ) indica a presença de grupos hidroxilo estruturais (cap. 9 da obra *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)).

A proporção molar entre  $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$  de um adjuvante de fosfato de alumínio está normalmente compreendida entre 0,3 e 1,2, de preferência entre 0,8 e 1,2 e mais preferencialmente é de 0,95 + 0,1. De um modo geral, o fosfato de alumínio é amorfo, em particular no caso de sais hidroxifosfato. Um adjuvante típico é o hidroxifosfato de alumínio amorfo com uma proporção molar entre  $\text{PO}_4/\text{Al}$  compreendida entre 0,84 e 0,92, incluído a 0,6 mg de  $\text{Al}^{3+}/\text{mL}$ . De um modo geral, o fosfato de alumínio irá ser um particulado (v.g., morfologia do tipo placa, conforme observado em micrógrafos de transmissão de electrões). Os diâmetros típicos das partículas estão compreendidos entre 0,5 e 20  $\mu\text{m}$  (v.g., cerca de 5 a 10  $\mu\text{m}$ ), após a adsorção de qualquer antigénio. Foram observadas capacidades adsortivas estão compreendidas entre 0,7 e 1,5 mg de proteína por mg de  $\text{Al}^{+++}$  para pH 7,4 para adjuvantes de fosfato de alumínio.

O ponto de carga zero (PZC) do fosfato de alumínio está inversamente relacionado com o grau de substituição de fosfato por hidroxilo, em que este grau de substituição pode variar em função das condições de reacção e da concentração dos reagentes utilizados na preparação do sal por precipitação. O PZC também é alterado pela modificação da concentração de iões fosfato livres em solução (mais fosfato = PZC mais ácido) ou pela adição de um tampão, tal como um tampão de histidina (torna o PZC mais básico). Os fosfatos de alumínio utilizados de acordo com a invenção irão normalmente possuir um PZC compreendido entre 4,0 e 7,0, mais preferencialmente entre 5,0 e 6,5, v.g., cerca de 5,7.

As suspensões de sais de alumínio utilizadas para preparar composições da invenção podem conter um tampão

(v.g., um tampão de fosfato, de histidina ou um tampão Tris), embora tal não seja sempre necessário. De preferência, as suspensões são estéreis e isentas de pirogênio. A suspensão pode compreender iões fosfato aquosos livres, v.g., presentes numa concentração compreendida entre 1,0 e 20 mM, de preferência entre 5 e 15 mM e mais preferencialmente de cerca de 10 mM. As suspensões também podem compreender cloreto de sódio.

A invenção pode utilizar uma mistura de um hidróxido de alumínio e de um fosfato de alumínio (WO 01/22992). Neste caso, poderá estar presente mais fosfato de alumínio do que hidróxido de alumínio, v.g., uma proporção em peso pelo menos de 2:1, v.g., > 5:1, > 6:1, > 7:1, > 8:1, > 9:1, etc..

A concentração de  $Al^{+++}$  numa composição para administração a um paciente é preferencialmente inferior a 10 mg/mL, v.g., < 5 mg/mL, < 4 mg/mL, < 3 mg/mL, < 2 mg/mL, < 1 mg/mL, etc.. Um intervalo preferencial está compreendido entre 0,3 e 1 mg/mL.

Bem como incluindo um ou vários adjuvantes de sais de alumínio, o componente adjuvante também pode compreender um ou vários outros adjuvantes ou agentes imunoestimuladores. Como tais componentes suplementares refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação: um adjuvante monofosforil-lípido A 3-O-desacilado ('3d MPL'); e/ou uma emulsão de óleo em água. O 3d MPL também foi já referido como monofosforil-lípido A 3-de-O-acilado ou como 3-O-desacil-4'-monofosforil-lípido A. O nome indica que a posição 3 da glucosamina na extremidade redutora no monofosforil-lípido A é desacilada. Foi preparado a partir do mutante sem heptose de *S. minnesota*, e é quimicamente

semelhantes ao lípido, mas falta-lhe um grupo fosforilo lábil a ácidos e um grupo acilo lábil a bases. Activa células da linhagem de monócitos/macrófagos e estimula a libertação de diversas citoquinas, incluindo IL-1, IL-12, TNF  $\alpha$  e GM-CSF. A preparação de 3d MPL foi inicialmente descrita na referência 150, e o produto foi produzido e comercializado pela Corixa Corporation sob a designação comercial MPL™. Outros pormenores foram já descritos por Myers *et al.* (1990), páginas 145-156 de Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions, Ulrich (2000) Capítulo 16 (páginas 273-282) de Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 de Methods in Molecular Methods series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan, Johnson *et al.* (1999) J Med Chem 42: 4640-9, e Baldrick *et al.* (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35: 398-413.

As vacinas produzidas pela invenção podem ser administradas a pacientes praticamente em simultâneo (*v.g.*, durante a mesma consulta médica ou visita a um Profissional de saúde) do que outras vacinas, *v.g.*, praticamente em simultâneo à vacina do sarampo, à vacina da papeira, à vacina da rubéola, à vacina MMR, à vacina da varicela, à vacina de MMRV, à vacina de difteria, à vacina do tétano, à vacina da tosse convulsa, à vacina de DTP, à vacina de *H. influenzae* de tipo b conjugada, a uma vacina de polivírus inactivado, à vacina do vírus da hepatite B, à vacina do conjugado pneumocócigo, etc.. A administração praticamente em simultâneo à vacina pneumocóciga é particularmente útil em pacientes idosos.

A composição pode compreender um antibiótico.

As composições imunogénicas utilizadas como vacinas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz do polipeptido imunogénico ou dos polipéptidos imunogénicos (isto é, do confórmero F de adesina bacteriano), bem como de qualquer um dos outros componentes referidos antes, consoante necessário. A expressão "quantidade imunologicamente eficaz" designa que a administração dessa quantidade a um indivíduo, quer numa dose única que como parte de um conjunto de dose, é eficaz para o tratamento ou para a prevenção. Esta quantidade varia em função do estado físico e de saúde do indivíduo que se pretende tratar, do grupo taxonómico do indivíduo que se pretende tratar (v.g., primata não humano, primata, etc.), da capacidade do sistema imune do indivíduo para sintetizar anticorpos, do grau de protecção desejado, do julgamento do médico assistente da situação clínica e de outros factores relevantes. Espera-se que a quantidade esteja compreendida num intervalo relativamente amplo e que possa ser determinada por ensaios de rotina.

As composições imunogénicas são convencionalmente administradas por via parentérica, v.g., por injeção, seja ela subcutânea, intramuscular ou transdérmica/transcutânea (v.g., WO 98/20734). Como outras formulações suplementares ou outras vias de administração refere-se as formulações orais ou pulmonares, supositórios e aplicações transdérmicas. A dosagem de tratamento pode ser num regime de dose único ou num regime de doses múltiplas. A vacina pode ser administrada em conjunto com outros agentes imuno-reguladores. Como alternativa a vacinas com base em proteínas, também é possível utilizar vacinação com ADN (v.g., Robinson e Torres (1997) Seminars in Immunology 9:

271-283; Donnelly *et al.* (1997) *Annu Rev Immunol* 15: 617-648; ver aqui a seguir).

### ANTICORPOS

Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo" designa um polipeptido ou um conjunto de polipéptidos constituído pelo menos por um local de combinação de anticorpo. Um "local de combinação de anticorpo" é um espaço de ligação tridimensional com uma forma de superfície interna e uma distribuição de carga complementares às características de um epítopo de um antigénio, que permite a ligação do anticorpo com o antigénio. Como anticorpo refere-se, por exemplo, anticorpos de vertebrados, anticorpos híbridos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos alterados, anticorpos univalentes, proteínas Fab e anticorpos de domínio único.

Os anticorpos contra as proteínas da invenção são úteis para cromatografia de afinidade, imuno-ensaios e para distinguir/identificar proteínas bacterianas.

Os anticorpos dos confórmeros da invenção, policlonais e monoclonais, podem ser preparados por métodos convencionais. De um modo geral, a proteína é utilizada, em primeiro lugar, para imunizar um animal adequado, de preferência um murganho, rato, coelho ou cabra. Os coelhos e as cabras são preferíveis para a preparação de soro policlonal devido ao volume de soro que é possível obter, e da disponibilidade de anticorpos anti-coelho e anti-cabra marcados. De um modo geral, a imunização é efectuada por mistura ou por preparação de emulsões da proteína em soluto salino, de preferência num adjuvante, tal como adjuvante completo de Freund, e injeção da mistura ou emulsão por

via parentérica (de um modo geral por via subcutânea ou intramuscular). É tipicamente suficiente uma dose entre 50 e 200 µg/injecção. De um modo geral, a imunização é reforçada 2 a 6 semanas depois com um ou várias injecções da proteína em soluto salino, de preferência utilizando o adjuvante incompleto de Freund. Em alternativa, é possível criar anticorpos por imunização *in vitro* utilizando métodos conhecidos na especialidade, os quais para o propósito da presente invenção são considerados equivalentes à imunização *in vivo*. O anti-soro policlonal é obtido por sangramento do animal imunizado para um recipiente de vidro ou de plástico, incubação do sangue a 25°C durante uma hora, seguindo-se a incubação a 40°C durante 2 a 18 horas. O soro é recuperado por centrifugação (v.g., 1000 g durante 10 minutos). É possível obter cerca de 20 a 50 mL por recolha de sangue a partir de coelhos.

Os anticorpos monoclonais são preparados utilizando o método convencional de Kohler e Milstein (Nature (1975) 256: 495-96) ou uma sua modificação. Tipicamente, efectua-se a imunização de um murganho ou de um rato conforme descrito antes. No entanto, em vez de se sangrar o animal para se extrair o soro, remove-se o baço (e facultativamente diversos nódulos linfáticos grandes) e dissocia-se em células individuais. Se desejado, as células do baço podem ser rastreadas (após remoção de células aderentes não específicas) por aplicação de uma suspensão de célula a uma placa ou cavidade revestida com o antigénio proteico, as células B que expressam especificamente a imunoglobulina ligada à membrana para o antigénio ligam-se à placa, não sendo enxaguadas com o resto da suspensão. As células B resultantes ou todas as células de baço

dissociadas são então induzidas para se fundirem com células de mieloma para se formar hibridomas e são desenvolvidas em cultura num meio selectivo (v.g., hipoxantina, aminopterina, meio de timidina, "HAT"). Os hibridomas resultantes são então colocados em placas por diluição limitante e são testados quanto a produção de anticorpos que se liguem especificamente ao antigénio de imunização (e que não se liguem a antigénios não relacionados). Os hibridomas que segregam Mab seleccionados são então desenvolvidos em cultura *in vitro* (v.g., em frascos de cultura de tecidos ou reactores ocos de fibra) ou *in vivo* (tal como ascitas em murganhos).

Se desejado, os anticorpos (sejam eles policlonais ou monoclonais) podem ser marcados utilizando técnicas convencionais. Como marcadores adequados refere-se fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (em particular  $^{32}\text{P}$  e  $^{125}\text{I}$ ), reagentes com grande densidade em electrões, enzimas e ligandos que possuam parceiros de ligação específicos. As enzimas são tipicamente detectadas pela sua actividade. Por exemplo, a peroxidase de rábano é normalmente detectada pela sua aptidão para converter 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) num pigmento azul, que é quantificável com um espectrofotómetro. Um "parceiro de ligação específico" designa uma proteína que é capaz de se ligar a uma molécula de ligando com uma especificidade elevada, tal como, por exemplo, no caso de um antigénio e um anticorpo monoclonal específico para esse antigénio. Como outros parceiros de ligação específicos refere-se biotina e avidina ou estreptavidina, IgG e proteína A, e diversos pares receptor-ligando conhecidos na especialidade. Faz-se observar que a descrição anterior não

pretende categorizar os diversos marcadores em classes distintas, uma vez que o mesmo marcador pode servir de diversos modos diferentes. Por exemplo, o  $^{125}\text{I}$  pode servir como marcador radioactivo ou como reagente com elevada densidade em electrões. O HRP pode servir como enzima ou como antigénio para um MAb. Além do mais, é possível combinar diversos marcadores para se obter o efeito desejado. Por exemplo, MAb e avidina também necessitam de marcadores para a realização da presente invenção; assim, é possível marcar um MAb com biotina e detectar a sua presença com avidina marcada com  $^{125}\text{I}$ , ou com um MAb anti-biotina marcado com HRP. Outras permutações e possibilidades serão evidentes para os especialistas na matéria e são consideradas como equivalentes dentro do âmbito da invenção.

#### Composições farmacêuticas

As composições farmacêuticas podem compreender polipéptidos ou anticorpos da invenção. As composições farmacêuticas irão compreender uma quantidade terapêuticamente eficaz de polipéptidos, anticorpos ou polinucleótidos da invenção reivindicada.

A expressão "quantidade terapêuticamente eficaz", tal como aqui utilizada, designa uma quantidade de um agente terapêutico para tratar, melhorar ou prevenir uma doença ou patologia desejada, ou para exibir um efeito terapêutico ou preventivo detectável. O efeito pode ser detectado, por exemplo, por meio de marcadores químicos ou níveis de antigénio. Os efeitos terapêuticos também compreendem a redução dos sintomas físicos, tais como a diminuição da temperatura do corpo. A quantidade eficaz precisa para um

sujeito irá depender do tamanho e do estado de saúde do sujeito, da natureza e da gravidade da patologia e dos terapêuticos ou combinação de terapêuticos seleccionados para a administração. Assim, não é útil especificar uma quantidade eficaz exacta à partida. No entanto, a quantidade eficaz para uma determinada situação pode ser determinada por experiências de rotina e está ao alcance do julgamento do médico assistente.

As dosagens preferidas para farmacêuticos à base de proteínas, incluindo vacinas, irão estar compreendidas entre 5 e 500 µg de polipéptidos imunogénicos da presente invenção.

Uma composição farmacêutica também pode conter um veículo farmacêuticamente aceitável. O termo "veículo farmacêuticamente aceitável" designa um veículo para administração de um agente terapêutico, tal como anticorpos ou um polipeptido, genes e outros agentes terapêuticos. O termo designa qualquer veículo farmacêutico que não induza ele próprio a produção de anticorpos nocivos para o indivíduo que recebe a composição, e que possa ser administrada sem o perigo de toxicidade. Os veículos adequados podem ser macromoléculas grandes lentamente metabolizadas, tais como proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e partículas de vírus inactivados. Tais veículos são bem conhecidos pelos especialistas na matéria.

É possível aqui utilizar sais farmacêuticamente aceitáveis, por exemplo, sais de ácidos minerais, tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos e semelhantes; e sais de ácidos orgânicos, tais como acetatos,

propionatos, malonatos, benzoatos e semelhantes. Uma descrição mais minuciosa sobre excipientes farmacologicamente aceitáveis encontra-se disponível na obra Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Os veículos farmacologicamente aceitáveis em composições terapêuticas podem conter líquidos, tais como água, soluto salino, glicerol e etanol. Além disso, também podem estar presentes em tais veículos substâncias auxiliares, tais como agentes humectantes ou emulsionantes, substâncias de tamponamento do pH e semelhantes. Tipicamente, as composições terapêuticas são preparadas como materiais injectáveis, seja como soluções ou suspensões líquidas; podendo também ser preparadas formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão em, veículos líquidos antes da injeção. Os lipossomas estão abrangidos pela definição de um veículo farmacologicamente aceitável.

#### MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser administradas directamente ao sujeito. Os sujeitos que se pretende tratar podem ser animais; em particular, é possível tratar sujeitos humanos.

Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser administradas (1) directamente ao sujeito ou (2) administradas *ex vivo*, a células provenientes do sujeito. Os sujeitos que se pretende tratar podem ser mamíferos ou aves. Além disso, é possível tratar sujeitos humanos.

A administração directa das composições irá normalmente ser efectuada por injeção, por via subcutânea,

intraperitoneal, intravenosa ou intramuscular ou então administrada ao espaço intersticial de um tecido. As composições também podem ser administradas a uma lesão. Como outros modos de administração refere-se a administração por via oral ou pulmonar, supositórios e aplicações transdérmicas ou transcutâneas (v.g., ver WO 98/20734), agulhas, pistolas de genes ou hipopulverizações. A dosagem de tratamento pode ser num regime de dose única ou num regime de doses múltiplas.

Os métodos para a administração *ex vivo* e re-implantação de células transformadas num sujeito são conhecidos na arte e encontram-se descritos, v.g., no documento WO 93/14778. Como exemplos de células úteis em aplicações *ex vivo* refere-se, por exemplo, células estaminais, em particular, células hematopoiéticas, células linfáticas, macrófagos, células dendríticas ou células tumorais.

#### Composições farmacêuticas de polipeptido

Para além dos veículos e sais farmacêuticamente aceitáveis descritos antes, também é possível utilizar os seguintes agentes suplementares nas composições de polipéptidos.

##### i. Polipéptidos

Um exemplo diz respeito a polipéptidos que compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação: asioloosomucóide (ASOR); transferrina; asialoglicoproteínas; anticorpos; fragmentos de anticorpo; ferritina; interleucinas; interferões, factor estimulador da colónia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), factor

estimulador da colónia de granulócitos (G-CSF), factor estimulador da colónia de macrófagos (M-CSF), factor de células estaminais e eritropoietina. Também é possível utilizar antigénios virais, tais como proteínas de invólucro. Além do mais, proteínas de outros organismos invasivos, tais como o péptido de 17 aminoácidos proveniente da proteína circumsporozoite de *plasmodium falciparum*, conhecida com o RII.

ii. Hormonas, vitaminas, etc.

Outros grupos que podem ser incluídos são, por exemplo, : hormonas, esteróides, androgénios, estrogénios, hormona da tiróide, vitaminas ou ácido fólico.

iii. Polialquilenos, polissacáridos, etc.

Além disso, também é possível incluir polialquilenoglicol com os polipéptidos desejados. De acordo com uma variante preferida, o polialquilenoglicol é polietilenglicol. Além disso, também é possível incluir mono-, di- ou poli-sacáridos. De acordo com uma variante preferida deste aspecto, o polissacárido é dextrano ou DEAE-dextrano. Também pode ser quitosano e poli(lactido-co-glicólido).

iv. Lípidos e lipossomas

O polipeptido desejado também pode ser encapsulado em lípidos ou embalado em lipossomas antes da sua administração ao sujeito ou a células provenientes deste.

De um modo geral, a encapsulação com lípidos é efectuada utilizando lipossomas, que são capazes de se ligar ou de prender estavelmente e reter o ácido nucleico. A proporção entre polinucleótido condensado e preparação de

lípido pode variar, mas irá ser normalmente de cerca de 1:1 (mg ADN:micromoles de lípido) ou mais de lípido. Para uma descrição sobre a utilização de lipossomas como veículos para a administração de ácidos nucleicos, veja-se Hug e Sleight (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1097: 1-17; Straubinger (1983) *Meth. Enzymol.* 101: 512-527.

As preparações lipossómicas para utilização na presente invenção compreendem preparações catiónicas (positivamente carregadas), aniónicas (negativamente carregadas) e neutras. Os lipossomas catiónicos demonstraram mediar a administração intracelular de ADN plasmídico (Feigner (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7416); ARNm (Malone (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6077-6081); e de factores de transcrição purificados (Debs (1990) *J. Biol. Chem.* 265:10189-10192), sob uma forma funcional.

Os lipossomas catiónicos encontram-se comercialmente disponíveis. Por exemplo, lipossomas de N-(1,2,3-dioleiloxi)-propil)-N,N,N-trietilamónio (DOTMA) encontram-se comercialmente disponíveis sob a designação comercial Lipofectina, da GIBCO BRL, Grand Island, NY. (Ver também Feigner *supra*). Como outros lipossomas comercialmente disponíveis refere-se transfectase (DDAB/DOPE) e DOTAP/DOPE (Boehringer). Outros lipossomas catiónicos podem ser preparados a partir de materiais comercialmente disponíveis utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade. Ver, *v.g.*, Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198; WO 90/11092 para uma descrição sobre a síntese de lipossomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamónio)-propano).

De igual modo, os lipossomas aniônicos e neutros estão comercialmente disponíveis, tais como a partir de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) ou podem ser facilmente preparados utilizando materiais disponíveis. Tais materiais incluem fosfatidil-colina, colesterol, fosfatidil-etanolamina, dioleoilfosfatidil-colina (DOPC), dioleoilfosfatidil-glicerol (DOPG), dioleoil-fosfatidil-etanolamina (DOPE), entre outros. Estes materiais também podem ser misturados com materiais de partida DOTMA e DOTAP em proporções adequadas. Os métodos para a preparação de lipossomas utilizando estes materiais são bem conhecidos na especialidade.

Os lipossomas podem compreender vesículas multilamelares (MLV), pequenas vesículas unilamelares (SUV) ou grandes vesículas unilamelares (LUV). Os diversos complexos lipossoma-ácido nucleico são preparados utilizando métodos conhecidos na especialidade. Ver, *v.g.*, Straubinger (1983) *Meth. Immunol.* 101: 512-527; Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198; Papahadjopoulos (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 394: 483; Wilson (1979) *Cell* 17:77; Deamer e Bangham (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 443: 629; Ostro (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 836; Fraley (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3348; Enoch e Strittmatter (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 145; Fraley (1980) *J. Biol. Chem.* (1980) 255: 10431; Szoka e Papahadjopoulos (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 145; e Schaefer-Ridder (1982) *Science* 215: 166.

v. Lipoproteínas

Além disso, é possível incluir lipoproteínas com o polipeptido que se pretende administrar. Como exemplos de lipoproteínas que se pode utilizar refere-se: quilomícrons, HDL, IDL, LDL e VLDL. Também é possível utilizar mutantes, fragmentos ou fusões destas proteínas. Além do mais, é possível utilizar modificações de lipoproteínas que ocorrem naturalmente, tais como LDL acetilado. Estas lipoproteínas podem ser dirigidas à administração de polinucleótidos a células que expressem os receptores de lipoproteínas. De preferência, no caso de as lipoproteínas estarem incluídas no polinucleótido que se pretende administrar, então não está incluído nenhum outro ligando dirigido na composição.

As lipoproteínas que ocorrem naturalmente compreendem um lípido e uma porção proteica. A porção proteica é designada como apoproteína. Até à data, foram já isoladas e identificadas as apoproteínas A, B, C, D e E. pelo menos duas destas contêm diversas proteínas, designadas por números romanos, AI, AII, AIV; CI, CII, CIII.

Uma lipoproteína pode compreender mais o que uma apoproteína. Por exemplo, os quilomícrons que ocorrem naturalmente compreendem apoproteínas A, B, C e E, e ao longo de tempo estas lipoproteínas perdem A e adquirem apoproteínas C e E. Os VLDL compreendem apoproteínas A, B, C e E, os LDL compreendem a apoproteína B; e os HDL compreendem apoproteínas A, C e E. Os aminoácidos destas apoproteínas são conhecidos e encontram-se descritos, por exemplo, por Breslow (1985) *Annu Rev. Biochem* 54: 699; Law (1986) *Adv. Exp Med. Biol.* 151: 162; Chen (1986) *J Biol Chem* 261: 12918; Kane (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2465; e Utermann (1984) *Hum Genet* 65: 232.

As lipoproteínas contêm diversos lípidos, incluindo triglicéridos, colesterol (livre e ésteres) e fosfolípidos. A composição dos lípidos varia em termos de lipoproteínas que ocorrem naturalmente. Por exemplo, os quilomícrons compreendem principalmente triglicéridos. Para uma descrição mais minuciosa sobre o conteúdo lípido de lípidos que ocorrem naturalmente ver, por exemplo, Meth. Enzymol. 128 (1986). A composição dos lípidos é seleccionada para auxiliar a conformação da apoproteína para a actividade de ligação ao receptor. A composição dos lípidos também pode ser seleccionada para facilitar a interacção hidrofóbica e a associação com a molécula de ligação ao polinucleótido.

As lipoproteínas que ocorrem naturalmente podem ser isoladas a partir do soro, por exemplo, por ultracentrifugação. Tais métodos encontram-se descritos na obra Meth. Enzymol. (*supra*); Pitas (1980) J. Biochem. 255: 5454-5460 e Mahey (1979) J Clin. Invest 64: 743-750. As lipoproteínas também podem ser produzidas por métodos *in vitro* ou métodos recombinantes por expressão dos genes adequados numa célula hospedeira adequada. Ver, por exemplo, Atkinson (1986) Annu Rev Biophys Chem 15: 403 e Radding (1958) Biochim BiophysActa 30: 443. As lipoproteínas também podem ser adquiridas a fornecedores comerciais, tais como Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, USA. Uma outra descrição de lipoproteínas pode ser consultada em Zuckermann *et. al.* WO98/06437.

#### vi. Agentes policatiónicos

Os agentes policatiónicos podem ser incluídos, na presença ou na ausência de lipoproteínas, numa composição

com o polinucleótido/polipeptido desejado que se pretende administrar. Tipicamente, os agentes policatiónicos exibem uma carga líquida positiva para valores de pH fisiológicos relevantes e são capazes de neutralizar a carga eléctrica dos ácidos nucleicos para facilitar a administração ao local desejado. Estes agentes possuem aplicação *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Os agentes policatiónicos podem ser utilizados para administrar ácidos nucleicos a um sujeito vivo por via intramuscular, subcutânea, etc.. os seguintes são exemplos de polipéptidos úteis enquanto agentes policatiónicos: polilisina, poliarginina, poliornitina e protamina. Como outros exemplos refere-se histones, protaminas, albumina do soro humano, proteínas de ligação a ADN, proteínas cromossómicas não histona, proteínas revestidas provenientes de ADN de vírus, tais como X174, factores de transcrição que contêm também domínios que se ligam ao ADN e que, por tal motivo, possam ser úteis como agentes de condensação de ácidos nucleicos. Resumidamente, factores de transcrição tais como C/CEBP, c-jun, c-fos, AP-1, AP-2, AP-3, CPF, Prot-1, Sp-1, Oct-1, Oct-2, CREP e TFIID contêm domínios básicos que se ligam a sequências de ADN.

Como agentes policatiónicos orgânicos refere-se: espermina, espermidina e putrescina.

As dimensões e as propriedades físicas de um agente policatiónico podem ser extrapoladas a partir da lista apresentada antes, para ácidos construção de outros agentes policatiónicos de polipéptidos ou para a produção de agentes policatiónicos sintéticos.

Como agentes policatiónicos sintéticos úteis refere-se, por exemplo, DEAE-dextrano, polibreno. O Lipofectin<sup>™</sup> e

lipofectAMINE™ são monómeros que formam complexos policatiónicos quando combinados com polinucleótidos/ /polipéptidos.

#### ENSAIOS DE IMUNODIAGNÓSTICO

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito a confórmeros GBS80 de acordo com a presente invenção utilizados em imunoensaios para detectar os níveis de anticorpo (ou, então, os anticorpos do confórmero de adesina anti-bacterianos podem ser utilizados para detectar os níveis de confórmero F). Os imunoensaios com base em antigénios recombinantes bem definidos podem ser desenvolvidos para substituir métodos invasivos de diagnóstico. É possível detectar os anticorpos nas amostras biológicas, incluindo, por exemplo, amostras de sangue ou de soro. A concepção dos imunoensaios é efectuada com um grande número de variações, sendo diversas de tais conhecidas na especialidade. Os protocolos para os imunoensaios podem ser baseados, por exemplo, na competição, ou reacção directa, ou em ensaios de tipo sanduíche. Os protocolos também podem utilizar, por exemplo, suportes sólidos ou podem ser efectuados por imunoprecipitação. A maior parte dos ensaios envolvem a utilização de anticorpos ou polipéptidos marcados; os marcadores podem ser, por exemplo, fluorescentes, quimioluminescentes, radioactivos ou moléculas de corantes. Também são conhecidos ensaios que ampliam os sinais a partir de sondas; como exemplos de tais ensaios refere-se os ensaios que utilizam biotina e avidina, e imunoensaios marcados e mediados por enzimas, tais como os ensaios ELISA.

Os estojos adequados para imunodiagnóstico e que contêm os reagentes marcados adequados são construídos por embalagem dos materiais adequados, incluindo as composições da invenção, em recipientes adequados, em conjunto com os restantes reagentes e materiais (por exemplo, tampões adequados, soluções de sais, etc.) necessários para a realização do ensaio, bem como um conjunto adequado de instruções para a realização do ensaio.

#### GERAL

O termo "compreender" abrange o termo "incluir" bem como o termo "constituir", v.g., uma composição que "compreende" X pode ser constituída exclusivamente por X ou pode incluir algum material suplementar, v.g., X + Y. O termo "cerca de", em relação a um valor numérico x, designa, por exemplo, x + 10%. O termo "substancialmente" não exclui "completamente", v.g., uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Se necessário, o termo "substancialmente" pode ser omitido da definição da invenção.

As sequências incluídas para facilitar a clonagem ou a purificação, não contribuem necessariamente para a invenção e podem ser omitidas ou removidas.

#### **DESCRIÇÃO ABREVIADA DOS DESENHOS E DOS QUADROS**

A figura 1 mostra uma SDS-PAGE de isoformas purificadas de GBS 80.

A figura 2 mostra uma filtração em gel analítica em 'Superdex 200 10/30' das mesmas amostras com PBS como tampão e um caudal de 0,5 mL/minuto.

A figura 3 mostra uma filtração em gel analítica do lote 3 e do lote F para instantes e valores de pH diferentes.

A figura 4A mostra uma filtração em gel analítica de 5 lotes diferentes de GBS 80.

A figura 4B mostra os pesos moleculares dos 5 lotes diferentes de GBS 80, conforme determinados por espectroscopia MALDI-TOF.

A figura 5 mostra uma SDS-PAGE após digestão com proteases diferentes, na presença e na ausência de desnaturação com detergente.

A figura 6 mostra um quadro que resume os resultados de imunização maternal activa.

#### **EXEMPLO 1: purificação de isoformas de GBS 80**

*Produção em lotes de GBS 80 em E. coli recombinante.* A fermentação em lotes de *E. coli* recombinante que expressa GBS 80 foi efectuada utilizando um bio-reactor adequado para uma mesa de trabalho 'Applikon' com cinco litros (Applikon Dependable Instruments B.V., Holanda). O fermentador foi inoculado com culturas de sementes de crescimento completo que foram desenvolvidas a 25°C durante 16 horas em dois frascos Erlenmeyer sob rotação que continham 500 mL de meio de extracto de levedura (45 g de extracto de levedura por litro; 1,5 g de NaCl por litro; 1,10 g de glicose por litro; pH 7,0). Para a fermentação principal, utilizou-se um meio complexo. O meio continha (por litro) 45 g de extracto de levedura, 5 g de NaCl, 10 g de glicerol, pH 7,0. A fermentação foi efectuada a 25°C. Manteve-se automaticamente o pH da cultura a  $7,1 \pm 0,1$ , utilizando hidróxido de sódio ou ácido fosfórico como

titulantes. Manteve-se condições totalmente aeróbicas (tensão de oxigénio dissolvido de 40%) por meio de injeção de ar e de oxigénio, ambos a uma razão de 0,5 litro padrão de ar por litro de ambos por minuto (= 0,5 vvm), para a região do rotor, o qual apresentava uma rotação de cerca de 800 r.p.m.. deixou-se desenvolver as células até 3 OD e depois foram induzidas com IPTG 0,25 mM durante 3 horas, antes da colheita. No momento da indução, também se adicionou  $MgSO_4$  1 mM,  $CaCl_2$  1 mM e 5 g/L de glicerol.

*Procedimento de purificação para o confórmero A.* Colocou-se novamente em suspensão as células provenientes de fermentação em 60 mL de Tris/HCl 25 mM (pH 7,0), que continha EDTA 10 mM, PMSF 2 mM e 100 Kunitz de unidades de ADNse A, e efectuou-se a lise por meio de uma passagem dupla através de uma prensa francesa a 18000 psi. Removeu-se as células não partidas e o material insolúvel por centrifugação a 50000 x g durante 30 minutos. Ajustou-se o valor de pH do sobrenadante até 7,0 com NaOH 0,1 M, filtrou-se esterilmente através de um filtro de 0,22 mm (Millipore), diluiu-se com água MilliQ™ até 300 mL para se obter uma condutividade de cerca de 2,5 mS/cm, e submeteu-se a cromatografia de permuta iónica numa coluna FF Q-Sepharose (Amersham Biosciences). Carregou-se 300 mL (total) de lisado num volume de coluna de 80 mL numa coluna FF Q-Sepharose, a qual tinha sido previamente equilibrada com Tris/HCl 25 mM (pH 7,0). Subsequentemente, lavou-se a coluna com seis volumes de coluna do mesmo tampão e efectuou-se a eluição as proteínas com um gradiente linear de NaCl 0 a 500 mM no mesmo tampão. Analisou-se a amostra eluída quanto à proteína do confórmero GBS 80 por SDS-PAGE 12% manchada com azul brilhantes R-250 de Coomassie, e

reuniu-se as fracções relevantes. Depois, aplicou-se o confórmero A de GBS 80 reunido a partir da coluna FF de Q-Sepharose (60 mL) a uma coluna de quelação FF com 75 mL (Amersham Biosciences), que tinha sido carregada com Na-fosfato 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,2 (tampão A). Lavou-se a coluna com quatro volumes de coluna de tampão A e efectuou-se a eluição das proteínas com um gradiente linear de tampão B de 0 a 100% B (tampão B: Na-fosfato 20 mM, NH<sub>4</sub>Cl 1 M, pH 7,2). Analisou-se a amostra eluída quanto à proteína do confórmero A de GBS 80 por SDS-PAGE a 12% corada com azul brilhante R-250 Coomassie e reuniu-se as fracções relevantes. Concentrou-se em termos de proteína a confórmero A de GBS 80 reunido proveniente da coluna de quelação FF Sepharose (140 mL) até 15 mL, sob uma pressão de azoto, numa célula de concentração Amicon, cortou-se num filtro 30 YM (Millipore) de 30 KDa e aplicou-se em três ciclos, cada um deles com uma carga de 5 mL da solução de proteína, numa coluna 'Superdex 75 HiLoad' 26/60 (Amersham Biosciences), que tinha sido equilibrada com soluto salino tamponado com fosfato, pH 7,2 (PBS). Analisou-se a amostra eluída quanto à proteína do confórmero A de GBS 80 por SDS-PAGE a 12% corada com azul brilhante R-250 Coomassie e reuniu-se as fracções relevantes. Estimou-se então a pureza da proteína do confórmero A de GBS reunida por SDS-PAGE a 12% e por filtração em gel analítica, e confirmou-se a identidade por análise dos aminoácidos no terminal N (sequenciador de proteínas 491 cLC, Applied Biosystems), por espectrometria de massa e por análise de western blot.

*Procedimento de purificação para o confórmero F.* Colocou-se novamente em suspensão as células de fermentação em 100 mL de Tris/HCl 25 mM (pH 7,2) que continham PMSF 2

mM e 100 Kunitz de unidades ADNse A e efectuou-se a lise por passagem dupla numa prensa francesa a 18000 psi. Removeu-se as células não partidas e o material insolúvel por centrifugação a 50000 x g durante 30 minutos. Ajustou-se o valor de pH do sobrenadante até 7,2 com NaOH 0,1 M, filtrou-se esterilmente através de um filtro de 0,22 mm (Millipore), diluiu-se com água MilliQ™ até 300 mL para se obter uma condutividade de cerca de 2,1 mS/cm e submeteu-se a cromatografia de permuta iónica subtrativa numa coluna FF de Q-Sepharose (Amersham Biosciences). Carregou-se 300 mL (total) de lisado num volume de coluna de 80 mL numa coluna FF Q-Sepharose, a qual tinha sido previamente equilibrada com Tris/HCl 20 mM, pH 7,7. Ao fluxo reunido que continha o confórmero F de GBS 80 adicionou-se tampão de fosfato de sódio até uma concentração final de 10 mM e ajustou-se o pH até 6,8 com NaOH 0,1 M. Subsequentemente, aplicou-se o fluxo reunido uma coluna de hidroxiapatite 'Bio-Gel HT' com 70 mL (Bio-Rad), equilibrada com fosfato de sódio 10 mM, pH 6,8. Lavou-se a coluna com quatro volumes do mesmo tampão de equilíbrio e efectuou-se a eluição das proteínas com um gradiente linear de fosfato de sódio de 10 até 500 mM, pH 6,8. Analisou-se a amostra eluída quanto à proteína do confórmero F de GBS 80 por SDS-PAGE a 12% corado com azul brilhante R-250 Coomassie e reuniu-se as fracções relevantes. Concentrou-se em termos de proteínas o confórmero F de GBS 80 reunido proveniente da coluna de hidroxiapatite 'Bio-Gel HT' (130 mL) até 12 mL, sob pressão de azoto, numa célula de concentração Amicon, cortou-se com um 30 YM (Millipore) de 30 KDa e aplicou-se em três ciclos, cada um deles com uma carga de 4 mL de solução de proteína, numa coluna 'Superdex 75 HiLoad' 26/60 (Amersham

Biosciences), que tinha sido equilibrada com soluto salino tamponado com fosfato, pH 7,2 (PBS). Analisou-se a amostra eluída quanto à proteína do confórmero F de GBS 80 por SDS-PAGE a 12% corado com azul brilhante R-250 Coomassie e reuniu-se as fracções relevantes. Estimou-se então a pureza da proteína do confórmero F de GBS 80 por SDS-PAGE a 12% e por filtração em gel analítica e confirmou-se a identidade por análise de aminoácidos do terminal N (sequenciador de proteínas 491 cLC, Applied Biosystems), por espectroscopia de massa e por análise por western blot.

#### EXEMPLO 2: SDS-PAGE e filtração em gel analítica

*Separação por SDS-PAGE.* Carregou-se amostras de três lotes diferentes de GBS 80 em electroforese de gel de sulfato de dodecilo-poliacrilamida (SDS-PAGE), na presença e na ausência de desnaturação térmica prévia (5 minutos a 99°C). Estes três lotes tinham a constituição seguinte:

- Lote 3: GBS 80 purificado de acordo com o protocolo do "confórmero A" anterior.
- Lote F: GBS 80 recuperado no fluxo de purificação proveniente do lote 3.
- Lote G-HA: GBS 80 purificado de acordo com o protocolo "F" anterior.

A figura 1 mostra os resultados desta experiência. São visíveis duas bandas principais, as quais correspondem ao confórmero A e confórmero F. O confórmero F mostra um peso molecular aparente baixo em comparação com o confórmero A. Conforme esperado, o lote 3 parece enriquecido em confórmero A, ao passo que o lote F e o lote F-HA são enriquecidos no confórmero F. No caso de as amostras serem levadas à ebulição, as duas isoformas são indistinguíveis e

possuem a mesma electroforética do confórmero A. Tal demonstra que o confórmero F é mais estável do que o confórmero A, o qual é provavelmente desnaturado pelo SDS, ao passo que o confórmero precisa de ebulição para desnaturar.

*Cromatografia de exclusão molecular.* Assim sendo, também foi observada uma anomalia semelhante quando as mesmas preparações de proteínas foram aplicadas a uma coluna de cromatografia de exclusão molecular (SEC). Resumidamente, aplicou-se as amostras num volume final de 100  $\mu$ L a uma coluna de filtração em gel 'Superdex 200 HR10/30' (Amersham Biosciences), equilibrada com tampão da coluna. Ligou-se a coluna a um sistema purificador ÄKTA (Amersham Biosciences). Completou-se a quantificação de picos do perfil de eluição obtido a 280 nm de acordo com as instruções do fornecedor. A figura 2 mostra os cromatogramas das amostras provenientes dos mesmos lotes. São claramente distinguíveis dois picos principais de material adsorvedor de UV com volumes de eluição distintos aproximadamente de 12,3 e de 13,3 mL.

A espectroscopia de massa MALDI (MS) das amostras de 5 lotes diferentes de GBS (3 enriquecidos no confórmero F e três no confórmero A) revelou que os pesos moleculares das diferentes isoformas são consistentes com os PM teóricos de 52872 Da calculados para o fragmento expresso de comprimento completo, demonstrando que as duas isoformas possuem a mesma sequência ou sequências muito semelhantes (ver figuras 4a e 4b).

EXEMPLO 3: estabilidade ao longo do tempo e pH

Os ensaios de estabilidade foram efectuados para avaliar a estabilidade aumentada do confórmero F de GBS 80 em termos de tempo e de pH. Na figura 3, são apresentados os cromatogramas das amostras processadas.

O painel esquerdo mostra que uma preparação de GBS enriquecida no confórmero A (lote 3) é menos estável ao longo do tempo, uma vez que sofre uma redistribuição de picos. Os cromatogramas da preparação de GBS 80 enriquecida no confórmero F (lote F, painel direito) são, pelo contrário, bastante estáveis ao longo do tempo, mesmo para valores de pH diferentes.

Faz-se observar que o pico de absorvância que corresponde ao confórmero A diminui com o tempo na medida em que a preparação é eluída, como um pico polidisperso. O confórmero A é convertido no confórmero F e em outros confórmeros com um peso molecular aparente mais elevado (muito provavelmente associado à formação do oligómero).

EXEMPLO 4: digestão por protease

O confórmero A e o confórmero F apresentam sensibilidades diferentes à digestão por proteases. A figura 5 mostra os resultados da digestão de ambos os confórmeros com três proteases diferentes (proteínase K, tripsina e AspN), ambas na presença ou na ausência de tratamento prévio com detergente, tal como a seguir indicado.

Os confórmeros A e F recombinantes purificados foram desnaturados termicamente durante 5 minutos a 95°C, após a adição de 0,1% final de "RapiGest" SF (Waters, Manchester, RU). Adicionou-se as proteases em proporções entre

substrato/enzima de 50/1 (p/p) a proteínas recombinantes desnaturadas ou não desnaturadas. Deixou-se decorrer as reacções durante 2 horas a 37°C e interrompeu-se por meio da adição de 0,2% de ácido fórmico final. Efectuou-se a desnaturação de 2 µg dos produtos de digestão em tampão da carga da amostra (Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8, 10% (v/v) de glicerol, 2% de (p/v) de SDS, DTT 100 mM, 10 µg/mL de azul de bromofenol) e carregou-se em acrilamida SDS-PAGE a 12%. Os geles foram corados com azul Coomassie.

Conforme ilustrado na figura 5, o confórmero F é mais resistente à digestão. Notavelmente, uma banda com um peso molecular de cerca de 50 kDa não foi digerida, mesmo após desnaturação com "RapiGest" SF. Esta banda (marcada com um asterisco) corresponde à parte do terminal C da proteína conforme definido pela impressão digital de massa do péptido tríptico (resultado não apresentado). Além do mais, os péptidos libertados por estas digestões são péptidos que pertencem à parte do terminal N da proteína, conforme evidenciado pelas análises de espectroscopia de massa (resultados não apresentados).

#### EXEMPLO 6: resultados de imunização maternal activa

Utilizou-se ambos os confórmeros purificados para imunizar grupos de murganhos fêmea adultos, os quais no final do regime de imunização, foram acasalados. As crias assim obtidas foram então estimuladas com uma dose de GBS calculada de modo a matar 80% a 90% das crias. Conforme ilustrado no quadro 1, a imunização com o confórmero F proporciona um nível de protecção superior.

Tal como aqui utilizado, o ensaio de imunização maternal activa diz respeito a um ensaio de protecção *in*

vivo, no qual os murganhos fêmea são imunizados com a composição de antigénio de teste. Os murganhos fêmea são então procriados e as suas crias são estimuladas com uma dose letal de GBS. Determina-se os títulos no soro dos murganhos fêmea durante o regime de imunização, bem como o tempo de sobrevivência das crias após o estímulo.

Especificamente, nos ensaios de imunização maternal activa aqui referidos foram utilizados grupos de quatro murganhos fêmea CD-1 (Charles River Laboratories, Calco Itália). Estes murganhos foram imunizados por via intraperitoneal com cada um dos confórmeros purificados em adjuvante de Freund nos dias 1, 21 e 35, antes da criação. Os murganhos com 6 a 8 semanas de idade receberam 20 mg de proteína/dose. A resposta imune das barreiras foi monitorizada utilizando amostras de soro recolhidas no dia 0 e 49. Os murganhos fêmea foram procriados 2 a 7 dias após a última imunização (aproximadamente a  $t = 36-37$ ) e apresentaram tipicamente um período de gestação de 21 dias. Após 48 horas do nascimento, as crias foram estimuladas por via i.p. com GBS numa dose aproximadamente igual a uma quantidade que seria suficiente para matar 70% a 90% das crias imunizadas (conforme determinado por dados empíricos recolhidos a partir de grupos de controlo de PBS). A dose de estímulo de GBS é preferencialmente administrada em 50 mL de meio de THB. De preferência, o desafio às crias tem lugar nos dias 56 a 61 após a primeira imunização. O inóculo de desafio foi preparado a partir de culturas congeladas diluídas até uma concentração adequada com THB antes da sua utilização. Monitorizou-se a sobrevivência das crias durante 5 dias após o desafio.

Conforme ilustrado no quadro 6, a imunização com o confórmero F proporciona um nível de protecção superior.

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

<110> NOVARTIS AG

Maione, Domenico

Norais, Nathalie

Grandi, Guido

<120> CONFÓRMEROS DE ADESINAS BACTERIANAS

<130> 22300-31014.00

<140> PCT/

<141> 11 de Junho de 2007

<150> 60/812145

<151> 09 de Junho de 2006

<160> 13

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 1662

<212> ADN

<213> *Streptococcus Agalactiae*

<400> 1

```

atgaaattat cgaagaagtt attggttttcg gctgctggtt taacaatggt ggcggggtca 60
actggtgaa cagtagctca gtttgogact ggaatgagta ttgtaagagc tgcagaagtg 120
tcacaagaac gccacagcga sacaacagta aatatctata aattacaagc tgatagttat 180
aaatcggaat ttacctctaa tgggtggtatc gagaataaag acggcgaagt aatatctaac 240
tatgctaaac ttggtgacaa tgtaaaaggt ttgcaaggtg tacagtttaa acgttataaa 300
gtcaagacgg atatttctgt tgatgaattg saaaaattga caacagttga agcagcagat 360
gcaaaagttg gaacgattct tgaagaaggt gtcagtctac ctcaaaaaac taatgctcaa 420
ggtttggtcg tggatgctct ggattcaaaa agtaatgtga gatacttgtg tgtagaagat 480
ttaaagaatt caacctcaaa cattaccaaa gottatgctg taccgtttgt gttggaatta 540
ccagttgcta actctacagg tacaggtttc cttcttgaaa ttaatattha cctcaaaaac 600
gttgtaaactg atgaaccaaa aacagataaa gatgttaaaa aattaggcca ggacgatgca 660
ggttatacga ttggtgaaga attcaaatgg ttcttgaant ctacaatccc tgccaattta 720
ggtgactatg aaaaatttga aattactgat aaatttgcag atggcttgc tttataaatct 780
gttggaaaaa tcaagattgg ttcgaaaaca ctgaatagag atgagcacta cactattgat 840
gaaccaacag ttgataacca eaatacatta aaaattacgt ttaaacaga gaaattttaa 900
gaaattgctg agctacttaa aggaatgacc cttgttaaaa atcaagatgc tcttgataaa 960
gctactgcaa atacagatga tgcggcattt ttggaattc cagttgcatc aactattaat 1020
gaaaaagcag ttttaggaaa agcaattgaa aatacttttg aacttcaata tgaccatact 1080
cctgataaag ctgacaatcc aaaaaccatct aatcctccaa gaaaaccaga agttcatact 1140
ggtygggaac gatrtgtaaa gaaagactca acagaaacac aaacactagg tgggtgctgag 1200
tttgatttgt tggcttctga tgggacagca gtaaaatgga cagatgctct tattaaagcg 1260
aatactaata aaactatat tgctggagaa gctggttactg ggcaaccaat caaattgaaa 1320
tcacatacag acggtaactt tgagattaaa ggtttgctt atgcagttga tgcgaatgca 1380
gagggtacag cagtaactta caaatfaaaa gaaacaaaag caccagaagg ttatgtaatc 1440
cctgataaag aaatcgagtt tacagtatca caaacatctt ataatacaaa accaactgac 1500
atcacggttg atagtgtgta tgcaacacct gatacaatta aaaacaaca acgtccttca 1560
atccctaata ctggtggtat tggtagcggc atctttgtcg ctatcggtgc tgcgggtgatg 1620
gcttttctg ttaaggggat gaagcgtcgt acaaaagata ac 1662

```

<210> 2

<211> 554

<212> PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

<400> 2

Met	Lys	Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Met
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Pro	Val	Ala	Gln	Phe	Ala	Thr	Gly	Met
			20					25					30		
Ser	Ile	Val	Arg	Ala	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Arg	Pro	Ala	Lys	Thr
		35					40					45			
Thr	Val	Asn	Ile	Tyr	Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile
	50					55					60				
Thr	Ser	Asn	Gly	Gly	Ile	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Asn
65					70					75					80
Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Asn	Val	Lys	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Phe
				85					90					95	
Lys	Arg	Tyr	Lys	Val	Lys	Thr	Asp	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys
			100					105					110		
Leu	Thr	Thr	Val	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Lys	Val	Gly	Thr	Ile	Leu	Glu
		115					120					125			
Glu	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Gln	Lys	Thr	Asn	Ala	Gln	Gly	Leu	Val	Val
	130					135					140				
Asp	Ala	Leu	Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp
145					150					155					160
Leu	Lys	Asn	Ser	Pro	Ser	Asn	Ile	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ala	Val	Pro	Phe
				165					170					175	
Val	Leu	Glu	Leu	Pro	Val	Ala	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Gly	Phe	Leu	Ser
		180						185					190		
Glu	Ile	Asn	Ile	Tyr	Pro	Lys	Asn	Val	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Lys	Thr
	195						200					205			
Asp	Lys	Asp	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Gln	Asp	Asp	Ala	Gly	Tyr	Thr	Ile
	210					215					220				
Gly	Glu	Glu	Phe	Lys	Trp	Phe	Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Ala	Asn	Leu
225					230					235					240
Gly	Asp	Tyr	Glu	Lys	Phe	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu
				245					250					255	
Thr	Tyr	Lys	Ser	Val	Gly	Lys	Ile	Lys	Ile	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn
			260					265					270		
Arg	Asp	Glu	His	Tyr	Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Thr	Val	Asp	Asn	Gln	Asn
		275					280					285			
Thr	Leu	Lys	Ile	Thr	Phe	Lys	Pro	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu
	290					295					300				
Leu	Leu	Lys	Gly	Met	Thr	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys
305						310				315					320
Ala	Thr	Ala	Asn	Thr	Asp	Asp	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Ile	Pro	Val	Ala
				325					330					335	
Ser	Thr	Ile	Asn	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Thr
			340					345					350		
Phe	Glu	Leu	Gln	Tyr	Asp	His	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Asp	Asn	Pro	Lys
		355					360					365			
Pro	Ser	Asn	Pro	Pro	Arg	Lys	Pro	Glu	Val	His	Thr	Gly	Gly	Lys	Arg
	370					375					380				
Phe	Val	Lys	Lys	Asp	Ser	Thr	Glu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Gly	Ala	Glu
385						390				395					400

Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala  
 405 410 415  
 Leu Ile Lys Ala Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val  
 420 425 430  
 Thr Gly Gln Pro Ile Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu  
 435 440 445  
 Ile Lys Gly Leu Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala  
 450 455 460  
 Val Thr Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile  
 465 470 475 480  
 Pro Asp Lys Glu Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr  
 485 490 495  
 Lys Pro Thr Asp Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr  
 500 505 510  
 Ile Lys Asn Asn Lys Arg Pro Ser Ile Pro Asn Thr Gly Gly Ile Gly  
 515 520 525  
 Thr Ala Ile Phe Val Ala Ile Gly Ala Ala Val Met Ala Phe Ala Val  
 530 535 540  
 Lys Gly Met Lys Arg Arg Thr Lys Asp Asn  
 545 550

<210> 3

<211> 517

<212> PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

<400> 3

Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Arg	Pro	Ala	Lys	Thr	Thr	Val	Asn	Ile	Tyr
1				5					10					15	
Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile	Thr	Ser	Asn	Gly	Gly
			20					25					30		
Ile	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Asn	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly
		35				40						45			
Asp	Asn	Val	Lys	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Phe	Lys	Arg	Tyr	Lys	Val
	50					55					60				
Lys	Thr	Asp	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Thr	Thr	Val	Glu
65					70					75					80
Ala	Ala	Asp	Ala	Lys	Val	Gly	Thr	Ile	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Ser	Leu
				85					90					95	
Pro	Gln	Lys	Thr	Asn	Ala	Gln	Gly	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Leu	Asp	Ser
				100				105					110		
Lys	Ser	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Ser	Pro
		115					120					125			
Ser	Asn	Ile	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ala	Val	Pro	Phe	Val	Leu	Glu	Leu	Pro
	130					135					140				
Val	Ala	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Gly	Phe	Leu	Ser	Glu	Ile	Asn	Ile	Tyr
145					150					155					160
Pro	Lys	Asn	Val	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Lys	Thr	Asp	Lys	Asp	Val	Lys
				165					170					175	
Lys	Leu	Gly	Gln	Asp	Asp	Ala	Gly	Tyr	Thr	Ile	Gly	Glu	Glu	Phe	Lys
			180					185					190		
Trp	Phe	Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Ala	Asn	Leu	Gly	Asp	Tyr	Glu	Lys
		195					200					205			
Phe	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu	Thr	Tyr	Lys	Ser	Val
	210					215					220				
Gly	Lys	Ile	Lys	Ile	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn	Arg	Asp	Glu	His	Tyr

225					230					235					240
Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Thr	Val	Asp	Asn	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Ile	Thr
				245					250					255	
Phe	Lys	Pro	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu	Leu	Leu	Lys	Gly	Met
			260				265						270		
Thr	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ala	Asn	Thr
		275				280					285				
Asp	Asp	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Ile	Asn	Glu
	290				295						300				
Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Thr	Phe	Glu	Leu	Gln	Tyr
305				310						315				320	
Asp	His	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Asp	Asn	Pro	Lys	Pro	Ser	Asn	Pro	Pro
			325						330					335	
Arg	Lys	Pro	Glu	Val	His	Thr	Gly	Gly	Lys	Arg	Phe	Val	Lys	Lys	Asp
			340					345					350		
Ser	Thr	Glu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Gly	Ala	Glu	Phe	Asp	Leu	Leu	Ala
		355					360					365			
Ser	Asp	Gly	Thr	Ala	Val	Lys	Trp	Thr	Asp	Ala	Leu	Ile	Lys	Ala	Asn
	370					375					380				
Thr	Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Gly	Gln	Pro	Ile
385					390					395					400
Lys	Leu	Lys	Ser	His	Thr	Asp	Gly	Thr	Phe	Glu	Ile	Lys	Gly	Leu	Ala
			405						410					415	
Tyr	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Thr	Tyr	Lys	Leu
			420					425					430		
Lys	Glu	Thr	Lys	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Ile	Pro	Asp	Lys	Glu	Ile
		435					440					445			
Glu	Phe	Thr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Tyr	Asn	Thr	Lys	Pro	Thr	Asp	Ile
	450					455					460				
Thr	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Thr	Pro	Asp	Thr	Ile	Lys	Asn	Asn	Lys
465					470						475				480
Arg	Pro	Ser	Ile	Pro	Asn	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Thr	Ala	Ile	Phe	Val
			485						490					495	
Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Met	Ala	Phe	Ala	Val	Lys	Gly	Met	Lys	Arg
			500					505					510		
Arg	Thr	Lys	Asp	Asn											
		515													

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 525

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

&lt;400&gt; 4

Met	Lys	Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Met
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Pro	Val	Ala	Gln	Phe	Ala	Thr	Gly	Met
			20					25					30		
Ser	Ile	Val	Arg	Ala	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Arg	Pro	Ala	Lys	Thr
	35					40					45				
Thr	Val	Asn	Ile	Tyr	Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile
	50					55					60				
Thr	Ser	Asn	Gly	Gly	Ile	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Asn
65					70					75					80
Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Asn	Val	Lys	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Phe
			85						90					95	

Lys Arg Tyr Lys Val Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys  
 100 105 110  
 Leu Thr Thr Val Glu Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu  
 115 120 125  
 Glu Gly Val Ser Leu Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val  
 130 135 140  
 Asp Ala Leu Asp Ser Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Asn Ser Pro Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe  
 165 170 175  
 Val Leu Glu Leu Pro Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser  
 180 185 190  
 Glu Ile Asn Ile Tyr Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr  
 195 200 205  
 Asp Lys Asp Val Lys Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile  
 210 215 220  
 Gly Glu Glu Phe Lys Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Asp Tyr Glu Lys Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu  
 245 250 255  
 Thr Tyr Lys Ser Val Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn  
 260 265 270  
 Arg Asp Glu His Tyr Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn  
 275 280 285  
 Thr Leu Lys Ile Thr Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu  
 290 295 300  
 Leu Leu Lys Gly Met Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys  
 305 310 315 320  
 Ala Thr Ala Asn Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala  
 325 330 335  
 Ser Thr Ile Asn Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr  
 340 345 350  
 Phe Glu Leu Gln Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys  
 355 360 365  
 Pro Ser Asn Pro Pro Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg  
 370 375 380  
 Phe Val Lys Lys Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu  
 385 390 395 400  
 Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala  
 405 410 415  
 Leu Ile Lys Ala Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val  
 420 425 430  
 Thr Gly Gln Pro Ile Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu  
 435 440 445  
 Ile Lys Gly Leu Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala  
 450 455 460  
 Val Thr Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile  
 465 470 475 480  
 Pro Asp Lys Glu Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr  
 485 490 495  
 Lys Pro Thr Asp Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr  
 500 505 510  
 Ile Lys Asn Asn Lys Arg Pro Ser Ile Pro Asn Thr Gly  
 515 520 525

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

<400> 5

Ile Pro Asn Thr Gly  
1 5

<210> 6

<211> 520

<212> PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

<400> 6

Met	Lys	Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Met
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Pro	Val	Ala	Gln	Phe	Ala	Thr	Gly	Met
			20					25					30		
Ser	Ile	Val	Arg	Ala	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Arg	Pro	Ala	Lys	Thr
		35					40					45			
Thr	Val	Asn	Ile	Tyr	Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile
	50					55					60				
Thr	Ser	Asn	Gly	Gly	Ile	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Asn
65					70					75					80
Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Asn	Val	Lys	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Phe
				85					90					95	
Lys	Arg	Tyr	Lys	Val	Lys	Thr	Asp	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys
			100					105					110		
Leu	Thr	Thr	Val	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Lys	Val	Gly	Thr	Ile	Leu	Glu
		115					120					125			
Glu	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Gln	Lys	Thr	Asn	Ala	Gln	Gly	Leu	Val	Val
	130					135					140				
Asp	Ala	Leu	Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp
145					150					155					160
Leu	Lys	Asn	Ser	Pro	Ser	Asn	Ile	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ala	Val	Pro	Phe
				165					170					175	
Val	Leu	Glu	Leu	Pro	Val	Ala	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Gly	Phe	Leu	Ser
			180					185					190		
Glu	Ile	Asn	Ile	Tyr	Pro	Lys	Asn	Val	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Lys	Thr
		195					200					205			
Asp	Lys	Asp	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Gln	Asp	Asp	Ala	Gly	Tyr	Thr	Ile
	210					215					220				
Gly	Glu	Glu	Phe	Lys	Trp	Phe	Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Ala	Asn	Leu
225					230					235					240
Gly	Asp	Tyr	Glu	Lys	Phe	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu
				245					250					255	
Thr	Tyr	Lys	Ser	Val	Gly	Lys	Ile	Lys	Ile	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn
			260					265					270		
Arg	Asp	Glu	His	Tyr	Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Thr	Val	Asp	Asn	Gln	Asn
		275					280					285			
Thr	Leu	Lys	Ile	Thr	Phe	Lys	Pro	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu
	290					295					300				
Leu	Leu	Lys	Gly	Met	Thr	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys
305					310					315					320
Ala	Thr	Ala	Asn	Thr	Asp	Asp	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Ile	Pro	Val	Ala
				325					330					335	

Ser	Thr	Ile	Asn	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Thr
			340					345					350		
Phe	Glu	Leu	Gln	Tyr	Asp	His	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Asp	Asn	Pro	Lys
		355					360					365			
Pro	Ser	Asn	Pro	Pro	Arg	Lys	Pro	Glu	Val	His	Thr	Gly	Gly	Lys	Arg
	370				375					380					
Phe	Val	Lys	Lys	Asp	Ser	Thr	Glu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Gly	Ala	Glu
385				390					395						400
Phe	Asp	Leu	Leu	Ala	Ser	Asp	Gly	Thr	Ala	Val	Lys	Trp	Thr	Asp	Ala
			405						410					415	
Leu	Ile	Lys	Ala	Asn	Thr	Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ala	Gly	Glu	Ala	Val
			420					425					430		
Thr	Gly	Gln	Pro	Ile	Lys	Leu	Lys	Ser	His	Thr	Asp	Gly	Thr	Phe	Glu
		435					440					445			
Ile	Lys	Gly	Leu	Ala	Tyr	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala
	450					455					460				
Val	Thr	Tyr	Lys	Leu	Lys	Glu	Thr	Lys	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Ile
465					470					475					480
Pro	Asp	Lys	Glu	Ile	Glu	Phe	Thr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Tyr	Asn	Thr
			485						490					495	
Lys	Pro	Thr	Asp	Ile	Thr	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Thr	Pro	Asp	Thr
			500					505					510		
Ile	Lys	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser								
		515					520								

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 483

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

&lt;400&gt; 7

Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Arg	Pro	Ala	Lys	Thr	Thr	Val	Asn	Ile	Tyr
1				5					10					15	
Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile	Thr	Ser	Asn	Gly	Gly
			20					25					30		
Ile	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Asn	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly
		35				40						45			
Asp	Asn	Val	Lys	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Phe	Lys	Arg	Tyr	Lys	Val
	50					55					60				
Lys	Thr	Asp	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Thr	Thr	Val	Glu
65					70					75					80
Ala	Ala	Asp	Ala	Lys	Val	Gly	Thr	Ile	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Ser	Leu
				85					90					95	
Pro	Gln	Lys	Thr	Asn	Ala	Gln	Gly	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Leu	Asp	Ser
			100					105					110		
Lys	Ser	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Ser	Pro
		115				120						125			
Ser	Asn	Ile	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ala	Val	Pro	Phe	Val	Leu	Glu	Leu	Pro
	130					135					140				
Val	Ala	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Gly	Phe	Leu	Ser	Glu	Ile	Asn	Ile	Tyr
145					150					155					160
Pro	Lys	Asn	Val	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Lys	Thr	Asp	Lys	Asp	Val	Lys
				165					170					175	
Lys	Leu	Gly	Gln	Asp	Asp	Ala	Gly	Tyr	Thr	Ile	Gly	Glu	Glu	Phe	Lys
			180					185					190		
Trp	Phe	Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Ala	Asn	Leu	Gly	Asp	Tyr	Glu	Lys

		195					200					205			
Phe	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu	Thr	Tyr	Lys	Ser	Val
	210						215					220			
Gly	Lys	Ile	Lys	Ile	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn	Arg	Asp	Glu	His	Tyr
225					230					235					240
Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Thr	Val	Asp	Asn	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Ile	Thr
				245					250					255	
Phe	Lys	Pro	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu	Leu	Leu	Lys	Gly	Met
			260				265						270		
Thr	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ala	Asn	Thr
		275					280						285		
Asp	Asp	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Ile	Asn	Glu
	290					295					300				
Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Thr	Phe	Glu	Leu	Gln	Tyr
305					310					315					320
Asp	His	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Asp	Asn	Pro	Lys	Pro	Ser	Asn	Pro	Pro
				325					330					335	
Arg	Lys	Pro	Glu	Val	His	Thr	Gly	Gly	Lys	Arg	Phe	Val	Lys	Lys	Asp
			340					345					350		
Ser	Thr	Glu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Gly	Ala	Glu	Phe	Asp	Leu	Leu	Ala
		355					360					365			
Ser	Asp	Gly	Thr	Ala	Val	Lys	Trp	Thr	Asp	Ala	Leu	Ile	Lys	Ala	Asn
	370					375					380				
Thr	Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Gly	Gln	Pro	Ile
385					390					395					400
Lys	Leu	Lys	Ser	His	Thr	Asp	Gly	Thr	Phe	Glu	Ile	Lys	Gly	Leu	Ala
				405					410					415	
Tyr	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Thr	Tyr	Lys	Leu
			420					425					430		
Lys	Glu	Thr	Lys	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Ile	Pro	Asp	Lys	Glu	Ile
		435					440					445			
Glu	Phe	Thr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Tyr	Asn	Thr	Lys	Pro	Thr	Asp	Ile
	450					455					460				
Thr	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Thr	Pro	Asp	Thr	Ile	Lys	Asn	Asn	Lys
465					470					475					480
Arg	Pro	Ser													

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 271

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

&lt;400&gt; 8

Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Arg	Pro	Ala	Lys	Thr	Thr	Val	Asn	Ile	Tyr
1				5					10					15	
Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile	Thr	Ser	Asn	Gly	Gly
			20					25					30		
Ile	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Asn	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly
		35				40						45			
Asp	Asn	Val	Lys	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Phe	Lys	Arg	Tyr	Lys	Val
	50					55				60					
Lys	Thr	Asp	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Thr	Thr	Val	Glu
65					70					75					80
Ala	Ala	Asp	Ala	Lys	Val	Gly	Thr	Ile	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Ser	Leu
				85					90					95	

Pro	Gln	Lys	Thr	Asn	Ala	Gln	Gly	Leu	Val	Val	Asp	Ala	Leu	Asp	Ser
			100					105					110		
Lys	Ser	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Ser	Pro
		115					120						125		
Ser	Asn	Ile	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ala	Val	Pro	Phe	Val	Leu	Glu	Leu	Pro
		130				135					140				
Val	Ala	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Gly	Phe	Leu	Ser	Glu	Ile	Asn	Ile	Tyr
145					150					155					160
Pro	Lys	Asn	Val	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Lys	Thr	Asp	Lys	Asp	Val	Lys
			165						170					175	
Lys	Leu	Gly	Gln	Asp	Asp	Ala	Gly	Tyr	Thr	Ile	Gly	Glu	Glu	Phe	Lys
			180					185					190		
Trp	Phe	Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Ala	Asn	Leu	Gly	Asp	Tyr	Glu	Lys
		195					200					205			
Phe	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu	Thr	Tyr	Lys	Ser	Val
	210					215					220				
Gly	Lys	Ile	Lys	Ile	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn	Arg	Asp	Glu	His	Tyr
225					230					235					240
Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Thr	Val	Asp	Asn	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Ile	Thr
				245					250					255	
Phe	Lys	Pro	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu	Leu	Leu	Lys	Gly	
			260					265						270	

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 2118

&lt;212&gt; ADN

<213> *Streptococcus Agalactiae*

&lt;400&gt; 9

```

ttaagcttcc tttgattggc gtcttttcat gataactact gctccaagca taatgcttaa 60
accaataatt gtgaaaaqaa ttgtaccaat accacctggt tgtgggattg ttaccttttt 120
attttctaca cgtgtcgcac ctttttggtt gctgttagca acgtagtcaa tgttaccacc 180
tgttatgtat gaccttgat taactacaaa cttaatatta cctgccaaact tagcaaatcc 240
tgctggagca agtgtttcct caaggttgta agtaocgtct gcaagacctg taacttcaaa 300
ttgacctga tegtgtgaag tgtaggtaat ggctctagcc ttatctgtta tccactcata 360
agctgtacga gctcaatga aggtgcacg gtaatctgct tgtttagttt tgataagttc 420
ttttgcagta attccttttt cacctttttg gtctgttgea gacaacttgt tataagcagc 480
gatagcttca tetaaagcta tttctttagc agctaaagtt ttttgacct ctgattgacg 540
tgctttaaga gcaaggatc tacctgtga gtttttcaca accgaattgt caccagccaa 600
acggtcacct tgttcattag ttttgacaaa tttcttacca tgagtttcaa cttttggttc 660
agttgggttc aatgggtgtg ggttatcaga atctttggtt ttggtaatgg ttaactttacc 720
attttctaga tttattgcac ttccgtaac agaaaacagc tctgagatca tgtatgattt 780
gttttctaga ccagtgaatt taccgagaa gttaccagat acttcaaat tgataccatt 840
tccaaggtcg attgtacct tagatgttt tgtcaatgat actgaagcaa cagttttatc 900
tttatcttcc aatgtgtaaa caacgtttac accatcaggt gcaattcctg cagaccaagt 960
tttagcaact gttacttcac cttttgaagg tgtaacagga agttcagtca agtctttacc 1020
tggtttggtt ccatacgaca atttgatatc attggattct ggattatcaa taattgcttg 1080
accattaaca gtagcactat aagtcfaat aaattcaata tcagctgttt tagctgttt 1140
ttccaatttg cccaatccat cagctgtgaa ttttaatgtg aaaccacggg catcaatgtt 1200
aagttcatag tctgtatcct tagcaaaagt ttctgtagtt cctgaagcct taaggotaac 1260
agttgaacco attgtcaaac catttgacat tatatctgtc caaaccaagt tttcgtatct 1320
agaacctttg tgaatttttg ttttaacttc ataaggaaca actttaccga tttcagcagt 1380
agcagttgct ttgtcacgtg cataattacc ataattttgc ccagctgtca aaagtctatt 1440
aacatctgtc aatgctgtca aatcgtttgt ttttagcaaa tttttatcaa tttctggttt 1500
ttcttcagtg ttctttggat aaacatgggc atcagcaaca acaccatctt catttaccaa 1560
tggaagagtg atgtaactg gaacctgttt tgaagcagcc agggaggaac cattattggt 1620

```

```

gtaagtagat tttgatttaa ctccaacaat ttaaaactcg cctttcaate ctttgggtgt 1680
gaaaacaagt ccagtatctc cctctgggtt caatccagac acggcctcat caatatttac 1740
tgttatttca ggagtaccat ctttattaat taaggctggt gtttaattgt taccttcttt 1800
tgaccttaaca tattgcaact taccactttt atcttcttcc aaagctaaaag caaagaacgc 1860
accttcgatt tctttagatc cctcgccaaa gtaaccagca aggtcagaaa tagctccacc 1920
tttgtagctt tttccgttaa gacctgtagt tcoctgggaag ttacttttgt taagatttga 1980
ttcggtttgc aaaatcttgt gcaaagtcac tgbattagtt gttgcttcat ccgcaaacgc 2040
tgggtgcaact gagagcaatg acgttaaagt cagtaacaat gccgagaaca ttgcaaaaata 2100
tttgtgatt cttttcat
2118

```

<210> 10

<211> 705

<212> PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

<400> 10

Met	Lys	Arg	Ile	Asn	Lys	Tyr	Phe	Ala	Met	Phe	Ser	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Val	Ala	Pro	Ala	Phe	Ala	Asp	Glu	Ala
			20					25					30		
Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Thr	Leu	His	Lys	Ile	Leu	Gln	Thr	Glu	Ser	Asn
		35					40					45			
Leu	Asn	Lys	Ser	Asn	Phe	Pro	Gly	Thr	Thr	Gly	Leu	Asn	Gly	Lys	Asp
	50					55					60				
Tyr	Lys	Gly	Gly	Ala	Ile	Ser	Asp	Leu	Ala	Gly	Tyr	Phe	Gly	Glu	Gly
65					70					75					80
Ser	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Ala	Phe	Phe	Ala	Leu	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp
				85					90						95
Lys	Ser	Gly	Lys	Val	Gln	Tyr	Val	Lys	Ala	Lys	Glu	Gly	Asn	Lys	Leu
			100					105					110		
Thr	Pro	Ala	Leu	Ile	Asn	Lys	Asp	Gly	Thr	Pro	Glu	Ile	Thr	Val	Asn
	115						120					125			
Ile	Asp	Glu	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gly	Asp	Thr	Gly	Leu
	130					135					140				
Val	Phe	Asn	Thr	Lys	Gly	Leu	Lys	Gly	Glu	Phe	Lys	Ile	Val	Glu	Val
145					150					155					160
Lys	Ser	Lys	Ser	Thr	Tyr	Asn	Asn	Asn	Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser
				165					170						175
Lys	Ala	Val	Pro	Val	Asn	Ile	Thr	Leu	Pro	Leu	Val	Asn	Glu	Asp	Gly
			180					185					190		
Val	Val	Ala	Asp	Ala	His	Val	Tyr	Pro	Lys	Asn	Thr	Glu	Glu	Lys	Pro
	195						200					205			
Glu	Ile	Asp	Lys	Asn	Phe	Ala	Lys	Thr	Asn	Asp	Leu	Thr	Ala	Leu	Thr
	210					215					220				
Asp	Val	Asn	Arg	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Ala
225					230					235					240
Arg	Asp	Lys	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Val	Val	Pro	Tyr
				245						250				255	
Glu	Val	Lys	Thr	Lys	Ile	His	Lys	Gly	Ser	Lys	Tyr	Glu	Asn	Leu	Val
			260					265					270		
Trp	Thr	Asp	Ile	Met	Ser	Asn	Gly	Leu	Thr	Met	Gly	Ser	Thr	Val	Ser
	275						280					285			
Leu	Lys	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Phe	Ala	Lys	Asp	Thr	Asp	Tyr
	290					295					300				
Glu	Leu	Ser	Ile	Asp	Ala	Arg	Gly	Phe	Thr	Leu	Lys	Phe	Thr	Ala	Asp
305					310					315					320
Gly	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Lys	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Asp	Ile	Glu	Phe



&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 2025

&lt;212&gt; ADN

<213> *Streptococcus Agalactiae*

&lt;400&gt; 11

```

atgaaaaaaaa tcaacaaatg tcttacaatg ttctcgacac tgctattgat cttaacgtca 60
ctattctcag ttgcaccagc gtttgoggac gacgcaacaa ctgatactgt gaccttgcac 120
aagattgtca tgcacaaagc tgcatttgat aactttactg aaggtacaaa aggttaagaat 180
gatagcgatt atgttggtaa acaaattaat gaccttaaat cttattttgg ctcaaccgat 240
gctaaagaaa tcaaggggtc tttctttggt ttcaaaaaatg aaactggtac aaaattcatt 300
actgaaaaatg gtaaggaagt cgatactttg gaagctaaag atgetgaagg tgggtgetggt 360
ctttcagggc taacaaaaga caatgggttt gtttttaaca ctgctaagtt aaaaggaatt 420
taccaaatcg ttgaattgaa agaaaaatca aactacgata acaacggttc tatottggct 480
gattcaaaag cagttccagt taaaatcact ctgccattgg taaacaacca aggtgttgtt 540
aaagatgttc acatttatcc aaagaatact gaaacaaaaac cacaagtaga taagaacttt 600
gcagataaag atcttgatta tactgacaac cgaaaagaca aaggtgttgt ctcagcgaca 660
gttggtgaca aaaaagaata catagttgga acaaaaatcc ttaaaggctc agactataag 720
aaactggttt ggactgatag catgactaaa ggtttgacgt tcaacaacaa cgttaaagta 780
acattggatg gtgaagattt tectgtttta aactacaaac tcgtaacaga tgaccaaggt 840
ttcogtcttg ccttgaatgc aacaggtctt gcagcagtag cagcagctgc aaaagacaaa 900
gatgttgaaa tcaagatcac ttactcagct acgggtgaacg gctccactac tgttgaattt 960
ccagaaacca atgatgttaa attggactat ggttaataacc caacggaaga aagtgaacca 1020
caagaaggta ctccagctaa ccaagaaatt aaagtcatta aagactgggc agtagatggt 1080
acaattactg atgctaattg tgcagttaaa gctatcttta ccttgcaaga aaaacaaacg 1140
gatggtaacat ggggtgaacgt tgcttcacac gaagcaacaa aaccatcacg ctttgaacat 1200
acttccagat gtttggataa tgetaaaact taccggcttg tcaaacgtgt tagcggctac 1260
actccagaat acgtatcatt taaaaatggt gttgtgacta tcaagaacaa caaaaaactc 1320
aatgatccaa ctccaatcaa cccatcagaa ccaaaaagtg tgacttatgg acgtaaattt 1380
gtgaaaacaa atcaagctaa cactgaacgc ttggcaggag ctacctcct cgttaagaaa 1440
gaaggcaaat acttggcacg taaagcaggt gcagcaactg ctgaagcaaa ggcagctgta 1500
aaaactgcta aactagcatt ggatgaagct gttaaagctt ataacgactt gactaaagaa 1560
aaacaagaag gccaaagaag taaaacagca ttggctactg ttgatcaaaa acaaaaaagct 1620
tacaatgacg cttttgttaa agctaactac tcatatgaat gggttgcaga taaaaaggct 1680
gataatggtt ttaaatgat ctctaacgcc ggtggtcaat ttgaaattac tggtttggat 1740
aaaggcactt atggcttggg agaaactcaa gcaccagcag gttatgcgac attgtcaggt 1800
gatgtaaaact ttgaagtaac tgccacatca tatagcaaa gggctacaac tgacatcgca 1860
tatgataaag gctctgtaaa aaaagatgcc caacaagttc aaaacaaaaa agtaaccatc 1920
ccacaacacg gtgggtattg tacaattctt ttcacaatta ttggtttaag cattatgctt 1980
ggagcagtag ttatcatgaa aaaacgtcaa tcagaggaag cttaa 2025

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 674

&lt;212&gt; PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

&lt;400&gt; 12

Met	Lys	Lys	Ile	Asn	Lys	Cys	Leu	Thr	Met	Phe	Ser	Thr	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Ile	Leu	Thr	Ser	Leu	Phe	Ser	Val	Ala	Pro	Ala	Phe	Ala	Asp	Asp	Ala
			20					25					30		
Thr	Thr	Asp	Thr	Val	Thr	Leu	His	Lys	Ile	Val	Met	Pro	Gln	Ala	Ala
		35					40					45			
Phe	Asp	Asn	Phe	Thr	Glu	Gly	Thr	Lys	Gly	Lys	Asn	Asp	Ser	Asp	Tyr
	50					55					60				
Val	Gly	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Leu	Lys	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ser	Thr	Asp
65					70					75					80
Ala	Lys	Glu	Ile	Lys	Gly	Ala	Phe	Phe	Val	Phe	Lys	Asn	Glu	Thr	Gly
				85					90					95	
Thr	Lys	Phe	Ile	Thr	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	Asp	Thr	Leu	Glu	Ala
			100					105					110		
Lys	Asp	Ala	Glu	Gly	Gly	Ala	Val	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn
		115					120					125			

Gly	Phe	Val	Phe	Asn	Thr	Ala	Lys	Leu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Gln	Ile	Val
	130					135					140				
Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Ser	Asn	Tyr	Asp	Asn	Asn	Gly	Ser	Ile	Leu	Ala
145					150					155					160
Asp	Ser	Lys	Ala	Val	Pro	Val	Lys	Ile	Thr	Leu	Pro	Leu	Val	Asn	Asn
				165					170						175
Gln	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Ala	His	Ile	Tyr	Pro	Lys	Asn	Thr	Glu	Thr
			180					185					190		
Lys	Pro	Gln	Val	Asp	Lys	Asn	Phe	Ala	Asp	Lys	Asp	Leu	Asp	Tyr	Thr
		195					200					205			
Asp	Asn	Arg	Lys	Asp	Lys	Gly	Val	Val	Ser	Ala	Thr	Val	Gly	Asp	Lys
	210					215						220			
Lys	Glu	Tyr	Ile	Val	Gly	Thr	Lys	Ile	Leu	Lys	Gly	Ser	Asp	Tyr	Lys
225					230					235					240
Lys	Leu	Val	Trp	Thr	Asp	Ser	Met	Thr	Lys	Gly	Leu	Thr	Phe	Asn	Asn
				245					250						255
Asn	Val	Lys	Val	Thr	Leu	Asp	Gly	Glu	Asp	Phe	Pro	Val	Leu	Asn	Tyr
			260					265					270		
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Asp	Gln	Gly	Phe	Arg	Leu	Ala	Leu	Asn	Ala	Thr
		275					280					285			
Gly	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Asp	Lys	Asp	Val	Glu	Ile
	290				295							300			
Lys	Ile	Thr	Tyr	Ser	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	Ser	Thr	Thr	Val	Glu	Ile
305					310					315					320
Pro	Glu	Thr	Asn	Asp	Val	Lys	Leu	Asp	Tyr	Gly	Asn	Asn	Pro	Thr	Glu
				325					330						335
Glu	Ser	Glu	Pro	Gln	Glu	Gly	Thr	Pro	Ala	Asn	Gln	Glu	Ile	Lys	Val
			340					345					350		
Ile	Lys	Asp	Trp	Ala	Val	Asp	Gly	Thr	Ile	Thr	Asp	Ala	Asn	Val	Ala
		355					360					365			
Val	Lys	Ala	Ile	Phe	Thr	Leu	Gln	Glu	Lys	Gln	Thr	Asp	Gly	Thr	Trp
	370					375					380				
Val	Asn	Val	Ala	Ser	His	Glu	Ala	Thr	Lys	Pro	Ser	Arg	Phe	Glu	His
385					390					395					400
Thr	Phe	Thr	Gly	Leu	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Glu	Arg
				405					410						415
Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Pro	Glu	Tyr	Val	Ser	Phe	Lys	Asn	Gly	Val	Val
			420					425					430		
Thr	Ile	Lys	Asn	Asn	Lys	Asn	Ser	Asn	Asp	Pro	Thr	Pro	Ile	Asn	Pro
		435					440						445		
Ser	Glu	Pro	Lys	Val	Val	Thr	Tyr	Gly	Arg	Lys	Phe	Val	Lys	Thr	Asn
	450					455					460				
Gln	Ala	Asn	Thr	Glu	Arg	Leu	Ala	Gly	Ala	Thr	Phe	Leu	Val	Lys	Lys
465					470					475					480
Glu	Gly	Lys	Tyr	Leu	Ala	Arg	Lys	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	Ala
				485					490						495
Lys	Ala	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Lys	Leu	Ala	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Lys
			500					505					510		
Ala	Tyr	Asn	Asp	Leu	Thr	Lys	Glu	Lys	Gln	Glu	Gly	Gln	Glu	Gly	Lys
		515					520						525		
Thr	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Asp	Gln	Lys	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asn	Asp	Ala
	530					535						540			
Phe	Val	Lys	Ala	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala
545					550						555				560
Asp	Asn	Val	Val	Lys	Leu	Ile	Ser	Asn	Ala	Gly	Gly	Gln	Phe	Glu	Ile
				565						570					575
Thr	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Thr	Tyr	Gly	Leu	Glu	Glu	Thr	Gln	Ala	Pro

			580					585					590			
Ala	Gly	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp	Val	Asn	Phe	Glu	Val	Thr	Ala	
			595				600					605				
Thr	Ser	Tyr	Ser	Lys	Gly	Ala	Thr	Thr	Asp	Ile	Ala	Tyr	Asp	Lys	Gly	
			610			615					620					
Ser	Val	Lys	Lys	Asp	Ala	Gln	Gln	Val	Gln	Asn	Lys	Lys	Val	Thr	Ile	
625					630					635					640	
Pro	Gln	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Thr	Ile	Leu	Phe	Thr	Ile	Ile	Gly	Leu	
				645					650					655		
Ser	Ile	Met	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ile	Met	Lys	Lys	Arg	Gln	Ser	Glu	
			660					665					670			
Glu	Ala															

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> *Streptococcus Agalactiae*

<400> 13

Ile	Pro	Gln	Thr	Gly
1				5

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.*

**Patentes de invenção citadas na descrição**

- WO 0234771 A [0010]
- WO 05028618 A [0010] [0133]
- WO 04041157 A [0032] [0133]
- WO 89046699 A [0064]
- US 5693506 A [0068]
- US 5659122 A [0068]
- US 5608143 A [0068]
- US 4738 A [0080]
- US 921 A [0080]
- EP 0036776 A [0080] [0092]
- EP 0121775 A [0080]
- US 4689406 A [0080]
- US 45514331 B [0081]
- EP 0267851 A [0081]
- EP 0219237 A [0083]
- EP 0324647 A, Chey [0084]
- US 4336336 A [0085]
- EP 0244042 A [0086]
- EP 0127328 A [0089]
- EP 0036259 A [0092] [0093]

- EP 0063953 A [0092] [0093]
- WO 8404541 A [0092] [0093]
- EP 0136829 A [0092]
- EP 0136907 A [0092]
- US 4745056 A [0092]
- EP 0284044 A [0095]
- EP 0329203 A [0095]
- US 4876197 A [0096]
- US 4880734 A [0096]
- EP 0164556 A [0096]
- EP 0196056 A [0098]
- WO 88024066 A [0098]
- EP 0012873 A [0100]
- JP 62096086 B [0100]
- US 4588684 A [0100]
- EP 0060057 A [0100]
- US 4546083 A [0101]
- US 4870008 A [0101]
- EP 0324274 A [0101]
- WO 8902463 A [0101]
- US 4837148 A [0105] [0106]
- US 4929555 A [0105] [0106]
- US 10415182 B [0133]
- WO 04099242 A [0133]
- US 192046 A [0141]
- EP 0477508 A [0144]
- US 5306492 A [0144]
- WO 9842721 A [0144]
- EP 0372501 A [0144]
- EP 0378881 A [0144]
- EP 0427347 A [0144]

- WO 9317712 A [0144]
- WO 9403208 A [0144]
- WO 9858668 A [0144]
- EP 0471177 A [0144]
- WO 0056360 A [0144]
- WO 9101146 A [0144]
- WO 0061761 A [0144]
- WO 0172337 A [0144]
- US 6355271 B [0152]
- WO 0023105 A [0152]
- US 5057540 A [0152]
- WO 0502620 A [0152]
- WO 9633739 A [0152]
- EP 0109942 A [0152]
- US 4578269 A [0152]
- WO 9611711 A [0152]
- US 6352697 B [0152]
- WO 0007621 A [0152]
- US 6506386 B [0152]
- WO 0404762 A [0152]
- WO 9517211 A [0152]
- WO 9842375 A [0152]
- WO 9927960 A [0152]
- US 6090406 A [0152]
- US 5916588 A [0152]
- EP 0626169 A [0152]
- WO 9952549 A [0152]
- WO 0121207 A [0152]
- WO 0121152 A [0152]
- WO 0272012 A [0152]
- WO 0464715 A [0152]

- WO 0589837 A [0156]
- US 6692468 B [0156]
- WO 0007647 A [0156]
- WO 9917820 A [0156]
- US 5971953 A [0156]
- US 4060082 A [0156]
- EP 0520618 A [0156]
- WO 9801174 A [0156]
- WO 9014837 A [0160]
- WO 9511700 A [0160]
- US 6080725 A [0160]
- WO 05097181 A [0160]
- US 6630161 B [0163]
- WO 02097072 A [0163]
- US 4680338 A [0166]
- US 4988815 A [0166]
- WO 9215582 A [0166]
- US 4689338 A [0166]
- US 4929624 A [0166]
- US 5238944 A [0166]
- US 5266575 A [0166]
- US 5268376 A [0166]
- US 5346905 A [0166]
- US 5352784 A [0166]
- US 5389640 A [0166]
- US 5395937 A [0166]
- US 5482936 A [0166]
- US 5494916 A [0166]
- US 5525612 A [0166]
- US 6083505 A [0166]
- US 6440992 B [0166]

- US 6627640 B [0166]
- US 6656938 B [0166]
- US 6660735 B [0166]
- US 6660747 B [0166]
- US 6664260 B [0166]
- US 6664264 B [0166]
- US 6664265 B [0166]
- US 6667312 B [0166]
- US 6670372 B [0166]
- US 6677347 B [0166]
- US 6677348 B [0166]
- US 6677349 B [0166]
- US 6683088 B [0166]
- US 6703402 B [0166]
- US 6743920 B [0166]
- US 6800624 B [0166]
- US 6809203 B [0166]
- US 6888000 B [0166]
- US 6924293 B [0166]
- WO 2004060308 A [0166]
- WO 2004064759 A [0166]
- US 6924271 B [0167]
- US 20050070556 A [0167]
- US 5658731 A [0167]
- US 5011828 A [0168]
- WO 200487153 A [0168] [0175]
- US 6605617 B [0168]
- WO 0218383 A [0168]
- WO 20041018455 A [0168]
- WO 03082272 A [0168]
- US 2005022769 W [0168]

- WO 0226757 A [0173]
- WO 9962923 A [0173]
- WO 98401 A [0173]
- US 6207646 B [0173]
- US 6239116 B [0173]
- US 6429199 B [0173]
- WO 0195935 A [0173]
- WO 03035836 A [0173]
- WO 0122972 A [0174] [0175]
- GB 2220211 A [0177]
- WO 9421292 A [0184]
- WO 9400153 A [0186]
- WO 9517210 A [0186]
- WO 9626741 A [0186]
- WO 9319780 A [0186]
- WO 03011223 A [0188]
- US 6586409 B [0188]
- US 20050215517 A [0188]
- WO 0122992 A [0195]
- WO 9820734 A [0201] [0215]
- WO 9314778 A [0216]
- WO 9011092 A [0224]

**Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção**

- **TETTELIN et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 2002 [0010]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1995 [0022]
- Methods In Enzymology. Academic Press, Inc, [0022]

- Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications, 1986, vol. I-IV [0022]
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989 [0022]
- Handbook of Surface and Colloidal Chemistry. CRC Press, 1997 [0022]
- Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1999 [0022]
- Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course. Academic Press, 1998 [0022]
- PCR (Introduction to Biotechniques Series). Springer Verlag, 1997 [0022]
- **PETERS; DALRYMPLE et al.** Fields Virology. B.N. Raven Press [0022]
- Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells. **SAMBROOK.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989 [0045]
- **MANIATIS et al.** *Science*, 1987, vol. 236, 1237 [0047]
- **ALBERTS et al.** Molecular Biology of the Cell. 1989 [0047]
- **DIJKEMA et al.** *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 7611 [0047]
- **GORMAN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1982, vol. 79, 6777 [0047]
- **BOSHART et al.** *Cell*, 1985, vol. 41, 5211 [0047]
- **SASSONE-CORSI; BORELLI.** *Trends Genet.*, 1986, vol. 2, 215 [0047]
- **BIMSTIEL et al.** *Cell*, 1985, vol. 41, 349 [0050]
- Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. **PROUDFOOT; WHITELAW.** Transcription and splicing [0050]
- **PROUDFOOT.** *Trends Biochem. Sci.*, 1989, vol. 14, 1051 [0050]

- Expression of cloned genes in cultured mammalian cells. **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989 [0050]
- **GLUZMAN**. *Cell*, 1981, vol. 23, 1751 [0051]
- **KAUFMAN et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 946 [0051]
- **SHIMIZU et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 10741 [0051]
- **SUMMERS; SMITH**. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555. 1987 [0053]
- **LUCKOW; SUMMERS**. *Virology*, 1989, vol. 17, 31 [0055]
- **MILLER et al.** *Ann. Rev. Microbiol.*, 1988, vol. 42, 177 [0056]
- The Regulation of Baculovirus Gene Expression. **FRIESEN et al.** *The Molecular Biology of Baculoviruses*. 1986 [0058]
- **VLAK et al.** *J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 69, 765 [0058]
- **CARBONELL et al.** *Gene*, 1988, vol. 73, 409 [0059]
- **MAEDA et al.** *Nature*, 1985, vol. 315, 592 [0059]
- **LEBACQ-VERHEYDEN et al.** *Molec. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 3129 [0059]
- **SMITH et al.** *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 8404 [0059]
- **MIYAJIMA et al.** *Gene*, 1987, vol. 58, 273 [0059]
- **MARTIN et al.** *DNA*, 1988, vol. 7, 99 [0059]
- **SMITH et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1983, vol. 3, 2156 [0062] [0064]
- **MILLER et al.** *Bioessays*, 1989, vol. 4, 91 [0062]
- *Current Protocols in Microbiology*. 1990, vol. 2, 10 [0063]
- **CARBONELL et al.** *J. Virol.*, 1985, vol. 56, 153 [0064]
- **WRIGHT**. *Nature*, 1986, vol. 321, 718 [0064]

- **FRASER et al.** *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 1989, vol. 25, 225 [0064]
- **ZENK.** *Phytochemistry*, 1991, vol. 30, 3861-3863 [0068]
- **VAULCOMBE et al.** *Mol. Gen. Genet.*, 1987, vol. 209, 33-40 [0068]
- **CHANDLER et al.** *Plant Molecular Biology*, 1984, vol. 3, 407-418 [0068]
- **ROGERS.** *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, 3731-3738 [0068]
- **ROTHSTEIN et al.** *Gene*, 1987, vol. 55, 353-356 [0068]
- **WHITTIER et al.** *Nucleic Acids Research*, 1987, vol. 15, 2515-2535 [0068]
- **WIRSEL et al.** *Molecular Microbiology*, 1989, vol. 3, 3-14 [0068]
- **YU et al.** *Gene*, 1992, vol. 122, 247-253 [0068]
- **R.L. JONES; J. MACMILLIN.** Gibberellins: in: *Advanced Plant Physiology*. Pitman Publishing Limited, 1984, 21-52 [0068]
- **SHEEN.** *Plant Cell*, 1990, vol. 2, 1027-1038 [0068]
- **MAAS et al.** *EMBO J.*, 1990, vol. 9, 3447-3452 [0068]
- **BENKEL; HICKEY.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, vol. 84, 1337-1339 [0068]
- **WILMINK; DONS.** *Plant Mol. Biol. Rept.*, 1993, vol. 11 (2), 165-185 [0069]
- **REED; MANIATIS.** *Cell*, 1985, vol. 41, 95-105 [0073]
- **CROSSWAY.** *Mol. Gen. Genet.*, 1985, vol. 202, 179-185 [0074]
- **KRENS et al.** *Nature*, 1982, vol. 296, 72-74 [0074]
- **KLEIN et al.** *Nature*, 1987, vol. 327, 70-73 [0074]
- **KNUDSEN; MULLER.** *Planta*, 1991, vol. 185, 330-336 [0074]
- **FRALEY et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 1859-1863 [0074]

- **FROMM et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 5824 [0075]
- **RAIBAUD et al.** *Annu. Rev. Genet.*, 1984, vol. 18, 173 [0079]
- **CHANG et al.** *Nature*, 1977, vol. 198, 1056 [0080]
- **GOEDEL et al.** *Nuc. Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0080]
- **YELVERTON et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1981, vol. 9, 731 [0080]
- **SHIMATAKE et al.** *Nature*, 1981, vol. 292, 128 [0080] [0092]
- **AMANN et al.** *Gene*, 1983, vol. 25, 167 [0081]
- **DE BOER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1983, vol. 80, 21 [0081]
- **STUDIER et al.** *J. Mol. Biol.*, 1986, vol. 189, 113 [0081] [0092]
- **TABOR et al.** *Proc Natl. Acad. Sci.*, 1985, vol. 82, 1074 [0081]
- **SHINE et al.** *Nature*, 1975, vol. 254, 34 [0082]
- Genetic signals and nucleotide sequences in Messenger RNA. **STEITZ et al.** *Biological Regulation and Development: Gene Expression*. 1979 [0082]
- Expression of cloned genes in *Escherichia coli*. **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989 [0082]
- **NAGAI et al.** *Nature*, 1984, vol. 309, 8101 [0084]
- **JIA et al.** *Gene*, 1987, vol. 60, 197 [0084]
- **ALLEN et al.** *J. Biotechnol.*, 1987, vol. 5, 93 [0084]
- **MAKOFF et al.** *J. Gen. Microbiol.*, 1989, vol. 135, 11 [0084]
- **MILLER et al.** *Biotechnology*, 1989, vol. 7, 698 [0084]
- **MASUI et al.** *Experimental Manipulation of Gene Expression*, 1983 [0086]

- **GHRAYEB et al.** *EMBO J.*, 1984, vol. 3, 2437 [0086]
- **OKA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, vol. 82, 7212 [0086]
- **PALVA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 5582 [0086] [0092] [0093]
- **DAVIES et al.** *Annu. Rev. Microbiol.*, 1978, vol. 32, 469 [0090]
- **AMANN et al.** *Gene*, 1985, vol. 40, 183 [0092]
- **POWELL et al.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, vol. 54, 655 [0092] [0093]
- **POWELL.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, vol. 54, 655 [0092]
- **MASSON et al.** *FEMS Microbiol. Lett.*, 1989, vol. 60, 273 [0093]
- **MILLER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, vol. 85, 856 [0093]
- **WANG et al.** *J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, 949 [0093]
- **COHEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1973, vol. 69, 2110 [0093]
- **DOWER et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1988, vol. 16, 6127 [0093]
- An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. **KUSHNER.** *Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering.* 1978 [0093]
- **MANDEL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 53, 159 [0093]
- **TAKETO.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, vol. 949, 318 [0093]
- **CHASSY et al.** *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987, vol. 44, 173 [0093]
- **FIEDLER et al.** *Anal. Biochem*, 1988, vol. 170, 38 [0093]

- **AUGUSTIN et al.** *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990, vol. 66, 203 [0093]
- **BARANY et al.** *J. Bacteriol.*, 1980, vol. 144, 698 [0093]
- Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation. **HARLANDER.** *Streptococcal Genetics*. 1987, 111 [0093]
- **PERRY et al.** *Infect. Immun.*, 1981, vol. 32, 1295 [0093]
- **SOMKUTI et al.** *Proc. 4th Eur. Cong. Biotechnology*, 1987, vol. 1, 412 [0093]
- **MYANOHARA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 1 [0095]
- **COHEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 1078 [0096]
- **HENIKOFF et al.** *Nature*, 1981, vol. 283, 835 [0096]
- **HOLLENBERG et al.** *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 1981, vol. 96, 119 [0096]
- The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **HOLLENBERG et al.** *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*. 1979 [0096]
- **MERCERAU-PUIGALON et al.** *Gene*, 1980, vol. 11, 163 [0096]
- **PANTHIER et al.** *Curr. Genet.*, 1980, vol. 2, 109 [0096]
- **BOTSTEIN et al.** *Gene*, 1979, vol. 8, 17-24 [0102]
- **BRAKE et al.** *PNAS USA*, 1984, vol. 81, 4642-4646 [0102]
- **STINCHCOMB et al.** *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 158, 157 [0102]
- **ORR-WEAVER et al.** *Methods in Enzymol.*, 1983, vol. 101, 228-245 [0103]
- **RINE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 6750 [0103]

- **KURTZ et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 142 [0105]  
[0106]
- **KUNZE et al.** *J. Basic Microbiol.*, 1985, vol. 25, 141  
[0105] [0106]
- **GLEESON et al.** *J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, 3459  
[0105] [0106]
- **ROGGENKAMP et al.** *Mol. Gen. Genet.*, 1986, vol. 202, 302  
[0105] [0106]
- **DAS et al.** *J. Bacteriol.*, 1984, vol. 158, 1165 [0105]  
[0106]
- **DE LOUVENCOURT et al.** *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154, 737  
[0105]
- **VAN DEN BERG et al.** *Biol Technology*, 1990, vol. 8, 135  
[0105]
- **CREGG et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 3376 [0105]  
[0106]
- **HINNEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75,  
1929 [0105] [0106]
- **ITO et al.** *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 153, 163 [0105]  
[0106]
- **BEACH; NURSE.** *Nature*, 1981, vol. 300, 706 [0105] [0106]
- **DAVIDOW et al.** *Curr. Genet.*, 1985, vol. 10, 39 [0105]  
[0106]
- **GAILLARDIN et al.** *Curr. Genet.*, 1985, vol. 10, 49 [0105]  
[0106]
- **DE LOUVENCOURT et al.** *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154, 1165  
[0106]
- **VAN DEN BERG et al.** *BiolTechnology*, 1990, vol. 8, 135  
[0106]
- **ROBERT K. SCOPES.** *Protein Purification. Principles and  
Practice.* Springer Verlag, 2000 [0108]

- *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, 2002, 18-102229 [0109]
- Amersham Biosciences, and Doonan, *Protein Purification Protocols*. The Humana Press, 1996 [0109]
- **SULKOWSKI**. *Trends in Biochem.*, 1985, vol. 3, 1 [0111]
- *Meth. Enzymol.* 1990, vol. 182, 529 [0111]
- *Gel Filtration: Principles and Methods*, 2002, 18-102218 [0115]
- *Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods*, 2002, 18-111421 [0118]
- **SURMAN S et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, 4587-92 [0123]
- **ADORINI L et al.** *J. Exp. Med.*, 1988, vol. 168, 2091 [0123]
- **SO T. et al.** *Immunol. Let.*, 1996, vol. 49, 91-97 [0123]
- **GILLIS S et al.** *J. Immunol.*, 1978, vol. 120, 2027 [0123]
- **RAMSAY et al.** *Lancet*, 2001, vol. 357 (9251), 195-196 [0144]
- **LINDBERG**. *Vaccine*, 1999, vol. 17 (2), 28-36 [0144]
- **BUTTERY; MOXON**. *J R Coll Physicians Lond*, 2000, vol. 34, 163-168 [0144]
- **AHMAD; CHAPNICK**. *Infect Dis Clin North Am*, 1999, vol. 13, 113-133 [0144]
- **GOLDBLATT**. *J. Med. Microbiol.*, 1998, vol. 47, 563-567 [0144]
- *Conjugate Vaccines*. vol. 10, 48-114 [0144]
- **HERMANSON**. *Bioconjugate Techniques*, 1996, ISBN 0123423368 [0144]
- *Research Disclosure*, 453077, January 2002 [0144] • **ROBINSON; TORRES**. *Seminars in Immunology*, 1997, vol. 9, 271-283 [0148] [0201]

- **DONNELLY et al.** *Annu Rev Immunol*, 1997, vol. 15, 617-648 [0148] [0201]
- **SCOTT-TAYLOR; DALGLEISH.** *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, vol. 9, 471-480 [0148]
- **APOSTOLOPOULOS; PLEBANSKI.** *Curr Opin Mol. Ther*, 2000, vol. 2, 441-447 [0148]
- **ILAN.** *Curr Opin Mol. Ther*, 1999, vol. 1, 116-120 [0148]
- **DUBENSKY et al.** *Mol. Med*, 2000, vol. 6, 723-732 [0148]
- **ROBINSON; PERTMER.** *Adv Virus Res*, 2000, vol. 55, 1-74 [0148]
- **DONNELLY et al.** *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, vol. 162, 190-193 [0148]
- **DAVIS.** *Mt. Sinai J. Med.*, 1999, vol. 66, 84-90 [0148]
- Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. Plenum Press, 1995 [0152] [0153] [0160] [0189] [0191]
- **BARR et al.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, vol. 32, 247-271 [0152]
- **SJOLANDERET et al.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, vol. 32, 321-338 [0152]
- **PIZZA et al.** *Int J Med Microbiol*, 2000, vol. 290, 455-461 [0152]
- **SINGH et al.** *J Cont Release*, 2001, vol. 70, 267-276 [0152]
- **SIGNORELLI; HADDEN.** *Int Immunopharmacol*, 2003, vol. 3 (8), 1177-86 [0152]
- **COOPER.** *Pharm Biotechnol*, 1995, vol. 6, 559-80 [0152]
- Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. Methods in Molecular Methods series. vol. 42 [0153] [0160] [0197]
- **PODDA; DEL GIUDICE.** *Expert Rev Vaccines*, 2003, vol. 2, 197-203 [0160]

- **PODDA.** *Vaccine*, 2001, vol. 19, 2673-2680 [0160]
- **ALLISON; BYARS.** *Res Immunol*, 1992, vol. 143, 519-25 [0160]
- **HARIHARAN et al.** *Cancer Res*, 1995, vol. 55, 3486-9 [0160]
- **HAN et al.** *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference*, 09 June 2005 [0163]
- **HAYDEN et al.** *J Clin Invest*, 1998, vol. 101 (3), 643-9 [0164]
- **TASSIGNON et al.** *J Immunol Meth*, 2005, vol. 305, 188-98 [0165]
- **MYERS et al.** *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*, 1990, 145-156 [0166]
- *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols. Methods in Molecular Methods series.* vol. 42, 273-282 [0166]
- **JOHNSON et al.** *J Med Chem*, 1999, vol. 42, 4640-9 [0166] [0197]
- **BALDRICK et al.** *Regulatory Toxicol Pharmacol*, 2002, vol. 35, 398-413 [0166] [0197]
- **STANLEY.** *Clin Exp Dermatol*, 2002, vol. 27, 571-577 [0166]
- **WU et al.** *Antiviral Res.*, 2004, vol. 64 (2), 79-83 [0166]
- **VASILAKOS et al.** *Cell Immunol.*, 2000, vol. 204 (1), 64-74 [0166]
- **JONES.** *Curr Opin Investig Drugs*, 2003, vol. 4, 214-218 [0166]
- **JOHNSON et al.** *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, vol. 9, 2273-2278 [0168]
- **EVANS et al.** *Expert Rev Vaccines*, 2003, vol. 2, 219-229 [0168]

- **ANDRIANOV et al.** *Biomaterials*, 1998, vol. 19, 109-115 [0168]
- **PAYNE et al.** *Adv Drug Delivery Review*, 1998, vol. 31, 185-196 [0168]
- **THOMPSON et al.** *Methods in Molecular Medicine*, 2003, vol. 94, 255-266 [0171]
- **KANDIMALLA et al.** *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, 2393-2400 [0173]
- **KRIEG.** *Nature Medicine*, 2003, vol. 9, 831-835 [0173]
- **MCCLUSKIE et al.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2002, vol. 32, 179-185 [0173]
- **KANDIMALLA et al.** *Biochemical Society Transactions*, 2003, vol. 31, 654-658 [0173]
- **BLACKWELL et al.** *J Immunol*, 2003, vol. 170, 4061-4068 [0173]
- **KRIEG.** *Trends Immunol*, 2002, vol. 23, 64-65 [0173]
- **KANDIMALLA et al.** *BBRC*, 2003, vol. 306, 948-953 [0173]
- **BHAGAT et al.** *BBRC*, 2003, vol. 300, 853-861 [0173]
- **THOMPSON et al.** The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*, 2005, 78 [0177]
- **MERALDI et al.** *Vaccine*, 2003, vol. 21, 2485-2491 [0188]
- **PAJAK et al.** *Vaccine*, 2003, vol. 21, 836-842 [0188]
- **WONG et al.** *J Clin Pharmacol*, 2003, vol. 43 (7), 735-42 [0188]
- *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*. Plenum Press [0190]
- **KOHLER; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-96 [0205]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Mack Pub. Co, 1991 [0211]

- **HUG; SLEIGHT.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, vol. 1097, 1-17 [0222]
- **STRAUBINGER.** *Meth. Enzymol.*, 1983, vol. 101, 512-527 [0222]
- **FEIGNER.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7413-7416 [0223]
- **MALONE.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 6077-6081 [0223]
- **DEBS.** *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 10189-10192 [0223]
- **SZOKA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 4194-4198 [0224]
- **STRAUBINGER.** *Meth. Immunol.*, 1983, vol. 101, 512-527 [0226]
- **SZOKA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 4194-4198 [0226]
- **PAPAHADJOPOULOS.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, vol. 394, 483 [0226]
- **WILSON.** *Cell*, 1979, vol. 17, 77 [0226]
- **DEAMER; BANGHAM.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, vol. 443, 629 [0226]
- **OSTRO.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, vol. 76, 836 [0226]
- **FRALEY.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 3348 [0226]
- **ENOCH; STRITTMATTER.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 145 [0226]
- **FRALEY.** *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 10431 [0226]
- **SZOKA; PAPAHADJOPOULOS.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 145 [0226]
- **SCHAEFER- RIDDER.** *Science*, 1982, vol. 215, 166 [0226]
- **BRESLOW.** *Annu Rev. Biochem*, 1985, vol. 54, 699 [0229]

- **LAW.** *Adv. Exp Med. Biol.*, 1986, vol. 151, 162 [0229]
- **CHEN.** *J Biol Chem*, 1986, vol. 261, 12918 [0229]
- **KANE.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, vol. 77, 2465 [0229]
- **UTERMANN.** *Hum Genet*, 1984, vol. 65, 232 [0229]
- *Meth. Enzymol.*, 1986, 128 [0230]
- **PITAS.** *J. Biochem.*, 1980, vol. 255, 5454-5460 [0231]
- **MAHEY.** *J Clin. Invest*, 1979, vol. 64, 743-750 [0231]
- **ATKINSON.** *Annu Rev Biophys Chem*, 1986, vol. 15, 403 [0231]
- **RADDING.** *Biochim BiophysActa*, 1958, vol. 30, 443 [0231]

**REIVINDICAÇÕES**

1. Adesina bacteriana isolada em confórmero F, em que a adesina bacteriana é capaz de gerar uma resposta imunitária num indivíduo, em que adesina bacteriana em confórmero F não é retida por uma coluna de 'Q-sepharose', e em que a adesina bacteriana é a GBS80.

2. Adesina bacteriana isolada de acordo com a reivindicação 1, em que a adesina bacteriana é produzida por via recombinante.

3. Adesina bacteriana isolada de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, em que a adesina bacteriana:

a) é retida por uma coluna de hidroxiapatite;

b) migra sob a forma de uma banda única com um peso molecular aparente em SDS-PAGE, na ausência de desnaturação térmica, que é menor do que o da adesina bacteriana após desnaturação térmica,

c) é mais resistente à digestão com proteases do que a adesina bacteriana em confórmero A, em que a adesina bacteriana em confórmero A é retida por uma coluna de 'Q-sepharose'; ou

d) a sua eluição a partir de uma coluna de cromatografia de exclusão molecular ocorre sob a forma de um pico monodisperso único.

4. Anticorpo que se liga a uma adesina bacteriana em confórmero F de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, mas não à adesina bacteriana em confórmero A, em que a

adesina bacteriana em confórmero A é retida por uma coluna de 'Q-sepharose'.

5. Anticorpo de acordo com a reivindicação 4, em que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo totalmente humano.

6. Composição que compreende o anticorpo das reivindicações 4 ou 5.

7. Composição que compreende uma adesina bacteriana de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e que compreende menos do que 20% de adesina bacteriana em confórmero A, em que a adesina bacteriana em confórmero A é retida por uma coluna de 'Q-sepharose'.

8. Composição que compreende pelo menos uma ou várias partes de GBS80 em confórmero F e uma parte de GBS80 em confórmero A,

em que a GBS80 em confórmero F é capaz de gerar uma resposta imunitária num indivíduo, em que a GBS80 em confórmero F não é retida por uma coluna de 'Q-sepharose' e em que a GBS80 em confórmero A é retida por uma coluna de 'Q-sepharose'.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, a qual é uma composição imunogénica, uma composição de vacina ou uma composição de diagnóstico.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, para utilização como produto farmacêutico.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, para o tratamento ou prevenção de uma infecção por GBS.

12. Processo para separar uma GBS80 em confórmero F de uma GBS80 em confórmero A, o qual compreende os passos seguintes:

a) obter uma amostra que contenha uma mistura de GBS80 em confórmero F e de GBS80 em confórmero A;

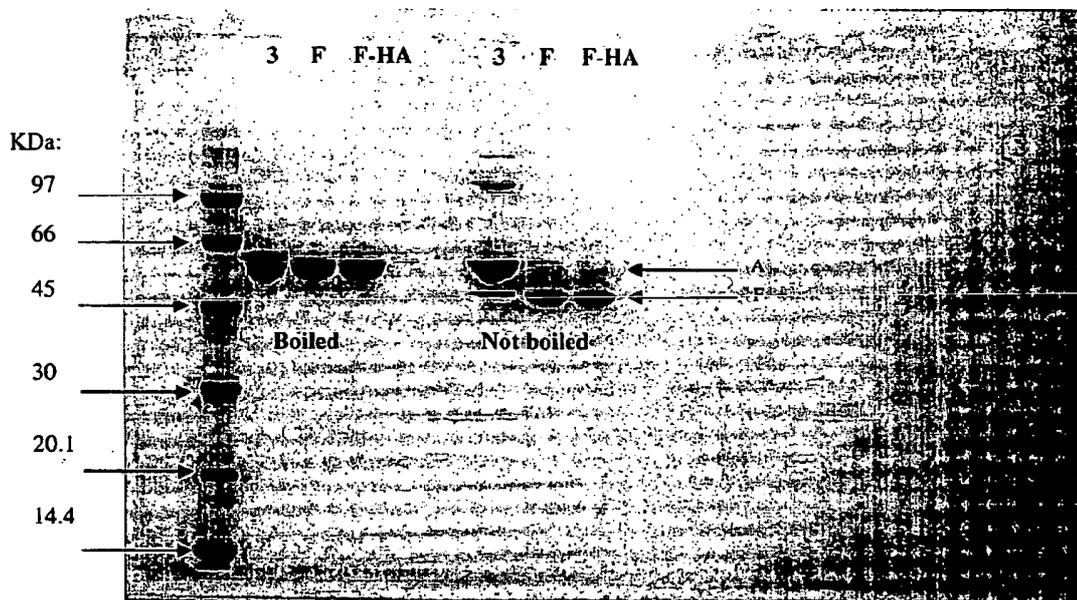
b) separar a GBS80 em confórmero F da GBS80 em confórmero A, utilizando uma tecnologia de separação seleccionada entre o conjunto constituído por tecnologia de separação de permuta aniónica, tecnologia de separação à base de hidroxiapatite e tecnologia de separação com base no coeficiente de atrito,

em que a GBS80 em confórmero F não é retida por uma coluna de 'Q-sepharose' e em que a GBS80 em confórmero A é retida por uma coluna de 'Q-sepharose'.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12, em que a tecnologia de separação com base no coeficiente de atrito é escolhida entre o conjunto constituído por electroforese em gel, cromatografia de exclusão molecular, fraccionamento por fluxo de um campo e centrifugação de sedimentação a alta velocidade.

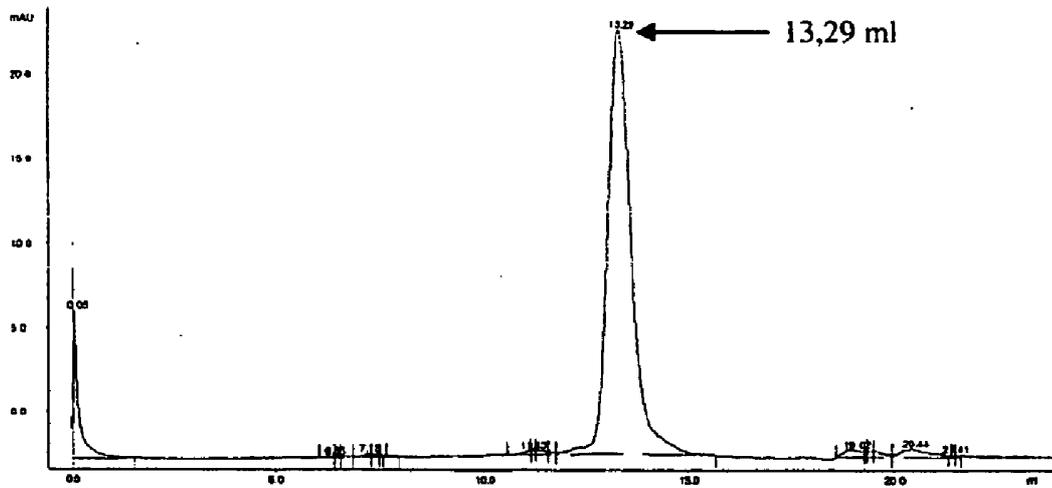
14. Processo para isolar o confórmero F de GBS80, o qual consiste em aplicar uma amostra que contenha uma mistura de confórmeros sobre uma coluna de cromatografia de permuta iónica, recuperar o fluxo de passagem e isolar o confórmero F num passo cromatográfico em hidroxapatite, em que a GBS80 em confórmero F não é retida por uma coluna de 'Q-sepharose'.

**Figura 1:** Isoformas de GBS80 purificadas por SDS-PAGE

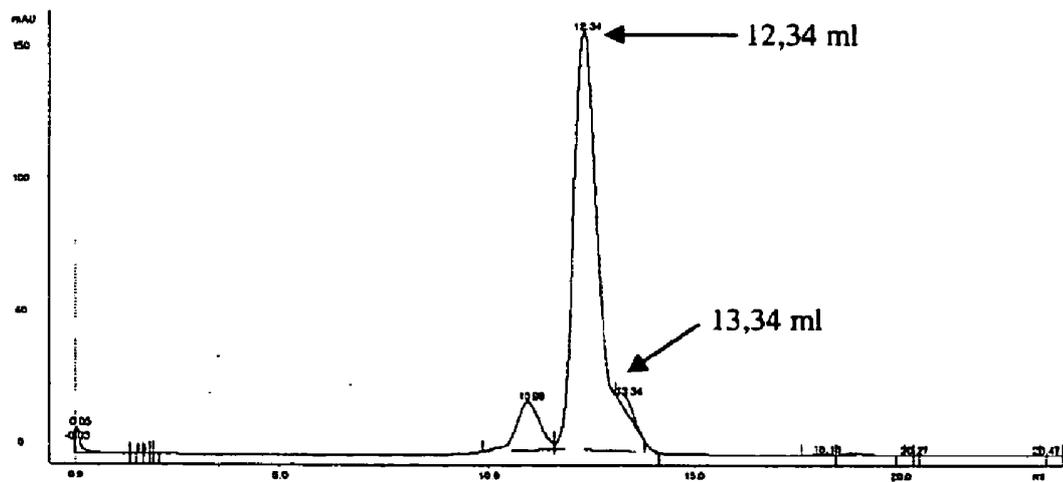


**Figura 2:** Filtração em gel analítico em Superdex 200 10/30 das mesmas amostras com tampão de PBS e caudal de 0,5 mL/minuto

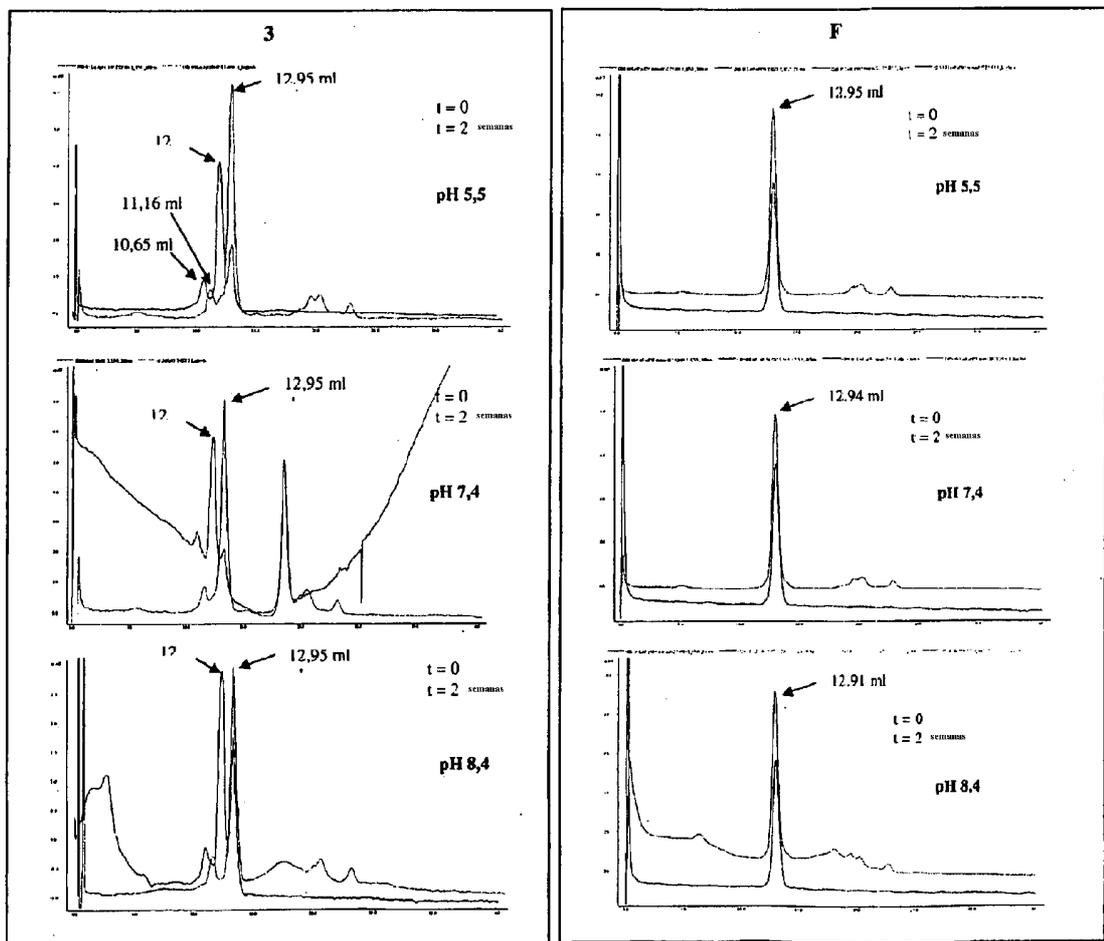
**Lote F**



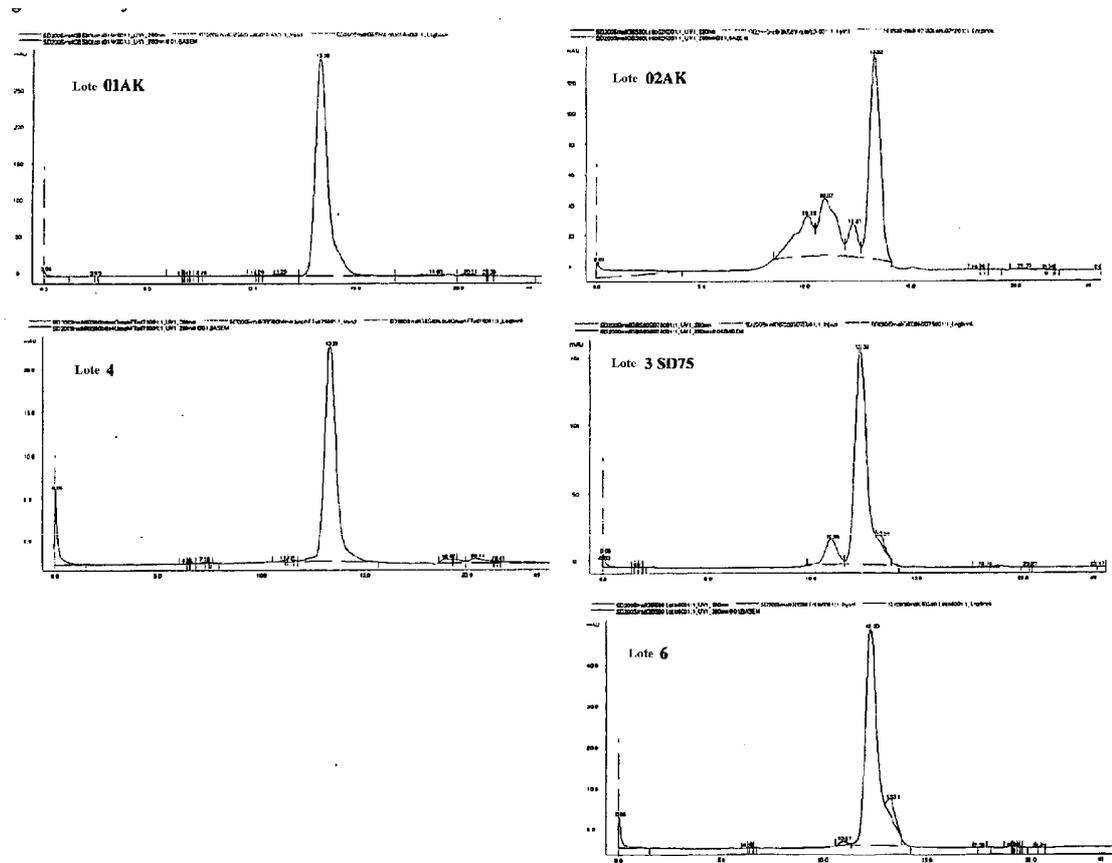
**Lote 3**



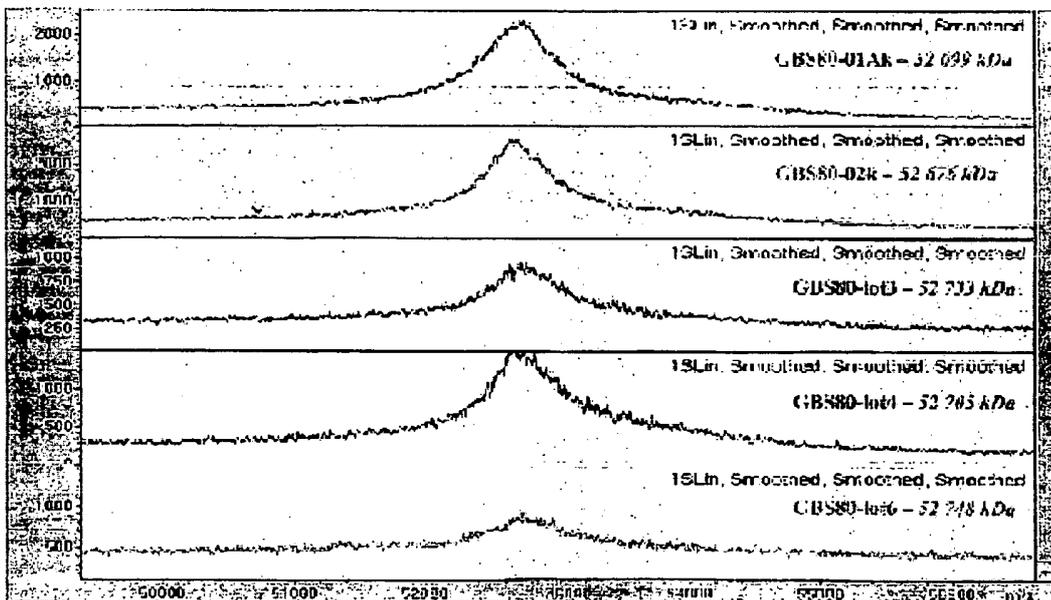
**Figura 3:** Filtração em gel analítico do lote 3 e do lote F para valores diferentes do tempo e pH



**Figura 4a:** Filtração em gel analítico de 5 lotes diferentes de GBS 80

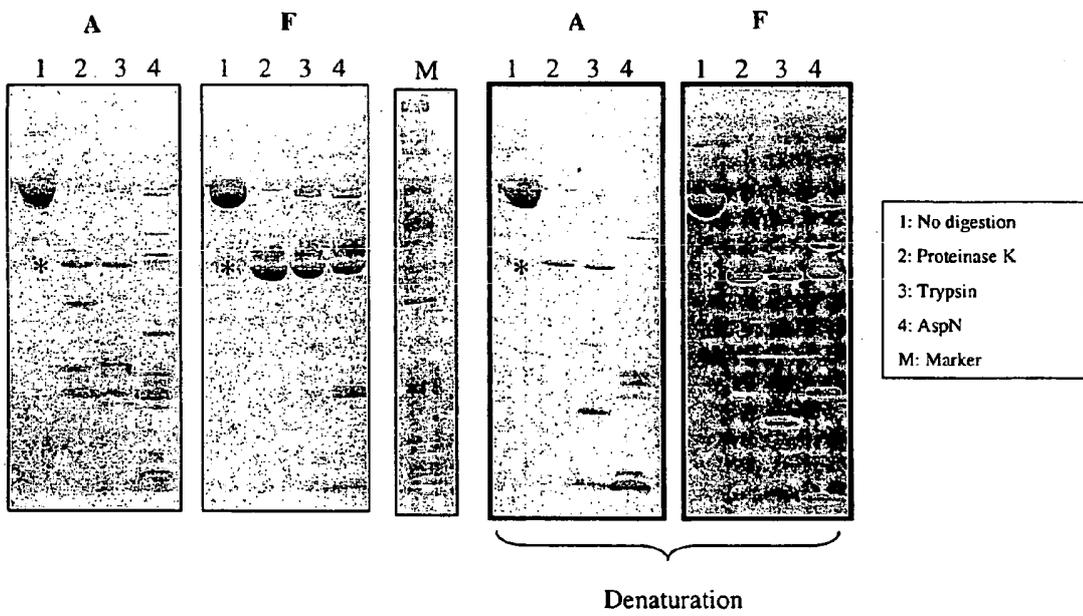


**Figura 4b:** Pesos moleculares de 5 lotes diferentes de GBS 80, conforme determinado por MALDI-TOF



Lot	Main conformer	MW (kDa)
Lot 01AK	F	52699
Lot 02K	A	52676
Lot 3	A	52733
Lot 4	F	52705
Lot 6	A	52748

**Figura 5:** SDS-PAGE após digestão com diferentes proteases, com e sem desnaturação com detergentes (RapidGest SF)



**Figura 6:** Resultados da imunização activa maternal

Lote	Protecção				
	COH1		COH1 >		
	Vivas/tratadas	%	Vivas/tratadas	%	
GBS 80	A	13/62	79	31/91	66
GBS 80	F	19/68	73	9/88	90
PBS		15/35	57	58/59	2

Estímulo

UFC
160
1600