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

(21) **PI0613525-0 A2**

BRPI0613525A2

(22) Data de Depósito: 13/07/2006
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)

(51) Int.Cl.:
A61K 39/00 2006.01
A61K 39/02 2006.01
A61K 39/12 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PARA MELHORAR A IMUNOGENICIDADE DE UMA COMPOSIÇÃO, PARA INTENSIFICAR A IMUNOGENICIDADE DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA, E PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE ESTRUTURAS BETA-CRUZADAS EM UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA, USOS DE ESTRUTURAS BETA-CRUZADAS, E DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA DE SUBUNIDADE, E, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA**

(30) Prioridade Unionista: 13/07/2005 EP 05076612.0

(73) Titular(es): CROSSBETA BIOSCIENCES B.V.

(72) Inventor(es): BAREND BOUMA, MARTIJN FRANS BEN GERARD GERBINK

(74) Procurador(es): MOMSEN, LEONARDOS & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT NL2006000362 de 13/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/008070de 18/01/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PARA MELHORAR A IMUNOGENICIDADE DE UMA COMPOSIÇÃO, PARA INTENSIFICAR A IMUNOGENICIDADE DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA, E PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE ESTRUTURAS BETA-CRUZADAS EM UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA, USOS DE ESTRUTURAS BETA-CRUZADAS, E DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA DE SUBUNIDADE, E, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA A invenção refere-se a novos métodos e meios para prover substâncias proteináceas, como peptídeos, polipeptídeos, glicoproteinas, lipoproteinas e compostos complexos compreendendo o primeiro em combinação com outras substâncias, como ácidos nucleicos, estruturas de membrana, estruturas de carboidratos, com estruturas e-cruzadas, que melhoram a imunogenicidade de referida substância proteinácea. Os peptídeos, proteínas, glicoproteinas, etc., resultantes são preferivelmenteusados em vacinas. A invenção provê um método para produzir uma composição imunogênica compreendendo pelo menos um peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteina, e/ou lipoproteina, compreendendo prover referida composição com pelo menos uma estrutura p-cruzada. A invenção também descreve o uso de estruturas e-cruzadas na preparação de uma vacina para a profilaxia de uma doença infecciosa. A invenção ainda provê um método para melhorar a imunogenicidade de uma composição compreendendo pelo menos um peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteina e/ou lipoproteina, compreendendo contatar pelo menos um dentre referido peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteina e/ou lipoproteina com um agente indutor e-cruzado, assim provendo referida composição com estruturas e-cruzadas adicionais.

"MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PARA MELHORAR A IMUNOGENICIDADE DE UMA COMPOSIÇÃO, PARA INTENSIFICAR A IMUNOGENICIDADE DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA, E PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE ESTRUTURAS BETA-CRUZADAS EM UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA, USOS DE ESTRUTURAS BETA-CRUZADAS, E DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA DE SUBUNIDADE, E, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA"

A invenção refere-se a novos métodos e meios para proporcionar substâncias proteináceas, como peptídeos, polipeptídios, glicoproteínas, lipoproteínas e compostos complexos compreendendo o primeiro em combinação com outras substâncias, como ácidos nucleicos, estruturas de membrana, estruturas de carboidratos, com estruturas β-cruzadas, que incrementam a imunogenicidade de referida substância proteinácea. Os peptídeos, proteínas, glicoproteínas, etc., resultantes são usados preferivelmente em vacinas.

Vacinas podem ser divididas em dois grupos básicos, i.e. vacinas profiláticas e vacinas terapêuticas. Vacinas profiláticas têm sido preparadas e/ou sugeridas contra substancialmente cada agente infeccioso conhecido (vírus, bactéria, levedura, fungos, parasita, micoplasma, etc.), que apresenta alguma patologia no Homem, animais domésticos e/ou animais de criação. Vacinas terapêuticas também têm sido preparadas e/ou sugeridas para agentes infecciosos, mas também para tratamentos de câncer e outras aberrações, e também para induzir respostas imunes contra outros auto-antígenos, compreendendo até mesmo, p. ex. LHRH, para imunocastração de javalis, ou para uso na prevenção da [doença] do enxerto versus hospedeiro (GvH, *graft versus host*) e/ou rejeições de transplante.

Em vacinas, em geral, há duas questões vitais. Vacinas precisam ser eficazes e vacinas precisam ser seguras. Freqüentemente parece

que as duas exigências são mutuamente exclusivas quando se tenta desenvolver uma vacina. As vacinas mais eficazes até aqui têm sido agentes infecciosos vivos modificados. Estes são modificados de uma maneira que sua virulência foi reduzida (atenuação) a um nivel aceitável. A cepa de vacina do agente infeccioso tipicamente não se replica no hospedeiro, mas em um nivel reduzido, de modo que o hospedeiro pode oeferecer uma resposta imune adequada, também dotando o hospedeiro com imunidade de longo prazo contra o agente infeccioso. O lado negativo de vacinas atenuadas é que os agentes infecciosos podem reverter a uma forma mais virulenta (e, portanto, patogênica).

Isto pode ocorrer em qualquer agente infeccioso, mas também é um problema muito sério em vírus rapidamente mutantes (como, em particular, vírus de RNA). Outro problema com vacinas vivas modificadas é que agentes infecciosos freqüentemente apresentam muitos serotipos diferentes. Provou-se que, em muitos casos, é difícil proporcionar vacinas que elicitam uma resposta imune em um hospedeiro que protege contra diferentes serotipos de agentes infecciosos.

Vacinas em que o agente infeccioso foi morto são seguras, mas freqüentemente sua eficácia é medíocre na melhor das hipóteses, mesmo quando a vacina contém um adjuvante.

Um tipo de vacina que recebeu bastante atenção porque o advento da biologia moderna é a vacina de subunidade. Nestas vacinas, apenas alguns elementos do agente infeccioso são usados para elicitar uma resposta imune. Tipicamente, uma vacina de subunidade compreende duas ou três proteínas (glicoproteínas) e/ou peptídios presentes em proteínas de um agente infeccioso (de um ou mais serotipos) que têm sido produzidos via meios recombinantes e/ou meios sintéticos. Embora, em teoria, estas vacinas sejam as vacinas mais promissoras, seguras e eficazes, na prática a eficácia provou ser uma barreira importante. Biologia molecular proporcionou mais

métodos alternativos para se chegar a vacinas seguras e eficazes que, teoricamente, também poderiam proporcionar proteção cruzada contra diferentes serotipos de agentes infecciosos. Estruturas de carboidrato derivadas de agentes infecciosos têm sido sugeridas como componentes de vacinas que elicitam respostas imunes específicas, bem como estruturas de lipopolissacarídeos, propôs-se até mesmo complexos de ácido nucleico. Embora estas vacinas de componente sejam geralmente seguras, sua eficácia e proteção cruzada relativamente a diferentes serotipos geralmente tem faltado. Combinações de diferentes tipos de componentes têm sido sugeridas (carboidratos com peptídios/proteínas e lipopolissacarídeo (LPS) com peptídios/proteínas opcionalmente com veículos), mas, até aqui, permanece a questão segurança versus eficácia.

Outra abordagem para proporcionar proteção cruzada consiste em preparar agentes infecciosos que compreendem componentes antigênicos de dois ou mais serotipos de um agente infeccioso. Estes podem ser produzidos, e foram produzidos por meio de modernas técnicas da biologia molecular. Eles podem ser produzidos como vacinas vivas modificadas, ou como vacinas com patógenos inativados ou mortos, mas também como vacinas de subunidade. Vacinas de coquetel compreendendo antígenos de agentes infecciosos completamente diferentes também são conhecidas. Em muitos países, crianças são vacinadas rotineiramente com vacinas de coquetel contra, p. ex., difteria, tosse ladrante, tétano e pólio. Vacinas recombinantes compreendendo elementos antigênicos de diferentes agentes infecciosos também foram sugeridas. Por exemplo, no caso de galináceos, sugeriu-se uma vacina baseada em um vírus de anemia de frangos complementada com elementos antigênicos do vírus da doença de Marek (MDV, *Marek disease virus*), mas sugeriu-se e produziu-se muito mais combinações.

Outra vantagem importante de modernas vacinas recombinantes é que elas proporcionaram a oportunidade de produzir vacinas

marcadoras. Vacinas marcadoras têm sido dotadas com um elemento adicional que não está presente em agente infeccioso de tipo selvagem, ou vacinas marcadoras não apresentam um elemento que está presente em agente infeccioso de tipo selvagem. A resposta de um hospedeiro a ambos os tipos de vacinas marcadoras pode ser diferenciada (tipicamente por meio de diagnóstico sorológico) da resposta contra uma infecção com tipo selvagem.

A presente invenção proporciona métodos e meio que melhoram a imunogenicidade de composições destinadas a elicitar uma resposta imune.

Em particular, a invenção proporciona composições com imunogenicidade incrementada para uso como vacinas, sejam profiláticas ou terapêuticas. A invenção também proporciona vacinas com imunogenicidade melhorada e segurança melhorada.

Em uma concretização, a invenção proporciona um método para produzir uma composição imunogênica compreendendo pelo menos um peptídio, polipeptídio, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína, compreendendo dotar referida composição com pelo menos uma estrutura β cruzada. Uma estrutura β cruzada é definida como uma parte de uma proteína ou peptídio, ou uma parte de uma montagem de peptídios e/ou proteínas, que compreende um grupo ordenado de filamentos β, tipicamente um grupo de filamentos β dispostos em uma lâmina β, em particular, um grupo de lâminas β empilhadas e estratificadas. Uma forma típica de lâminas β empilhadas encontra-se em uma estrutura similar a fibrilos em que as lâminas β podem ser empilhadas em qualquer direção do eixo do fibrilo, ou perpendicular à do eixo do fibrilo. O termo estrutura pode ser usado intercambiavelmente com o termo conformação. Evidentemente, o termo peptídio destina-se a incluir oligopeptídios e também polipeptídios, e o termo proteína inclui proteínas com e sem modificações pós-tradução, como glicosilação. Ele também inclui lipoproteínas e complexos compreendendo proteínas, como complexos de

proteína-ácido nucleico (RNA e/ou DNA), complexos de membrana-proteína, etc.

Para proporcionar uma composição imunogênica, particularmente uma composição imunogênica destinada a elicitar uma resposta imune específica contra um antígeno específico (grupo de [antígenos]) com uma estrutura β cruzada, uma proteína ou peptídio como definido acima compreendendo uma estrutura β cruzada pode ser simplesmente adicionada a referida composição. De preferência, referida proteína ou peptídio compreendendo referida estrutura β cruzada é um peptídio ou proteína de outra forma inerte. Inerte é definido como não elicitando uma resposta imune indesejada ou outra reação química indesejada em um hospedeiro, pelo menos não em um grau inaceitável, de preferência, apenas em um grau desprezível. A função desejada deveria estar presente evidentemente em virtude da presença de estruturas β cruzadas. A proteína ou peptídio compreendendo uma estrutura β cruzada pode ser adicionado a qualquer tipo de vacina, seja terapêutico ou profilático, seja um agente infeccioso inteiro atenuado ou morto, seja vacina de subunidade ou carboidrato ou vacina de LPS ou combinações dos mesmos. Uma estrutura β cruzada pode estar presente em um único composto proteináceo, ou pode ser uma estrutura compartilhada por vários compostos proteináceos. Estruturas β cruzadas podem ser induzidas por meio de muitos mecanismos diferentes. Muitos tipos de processos de desnaturação para proteínas e/ou polipeptídios levam à formação de estruturas β cruzadas. Referidos processos de desnaturação podem ser aplicados, portanto, para induzir estruturas β cruzadas em muitos tipos de polipeptídios e/ou proteínas. Exemplos compreendem tratamentos por meio de aquecimento, químicos com, p. ex., sais superiores, materiais ácidos ou alcalinos, pressão e outros tratamentos físicos, etc. A adição de uma estrutura β cruzada pode proporcionar uma composição com imunogenicidade em um hospedeiro, ela também pode

incrementar referida imunogenicidade já presente em uma composição. O proteína/polipeptídio/peptídio que proporciona estrutura β cruzada pode ser adicionado a uma composição *per se*, mas também é útil usar referida substância proteinácea que proporciona estrutura β cruzada como um veículo a que se associou elementos do(s) agente(s) infeccioso(s) e/ou antígeno(s). Esta ligação pode ser proporcionada por meio de ligação química (direta ou indireta) ou por meio de expressão do(s) antígeno(s) relevante(s) da substância proteinácea que proporciona estrutura β cruzada, como uma proteína de fusão. Em ambos os casos, podem estar presentes ligantes entre os dois. Em ambos os casos, é possível acoplar dímeros, trímeros e/ou multímeros do antígeno (ou um ou mais epítopos de um antígeno relevante) ao composto proteináceo proporcionando estrutura β cruzada. No entanto, veículos normais compreendendo antígenos ou epítopos relevantes acoplados aos mesmos também podem ser usados. A simples adição de uma substância proteinácea compreendendo estrutura β cruzada incrementará a imunogenicidade de um complexo do tipo referido. Isto é mais ou menos generalmente verdadeiro. Uma composição imunogênica de acordo com a invenção pode compreender tipicamente uma quantidade, ou todos, os constituintes normais de uma composição imunogênica (em particular, uma vacina), suplementada com um composto proteináceo compreendendo estrutura β cruzada (conformação).

Em uma concretização preferida o polipeptídio/proteína que proporciona a estrutura β cruzada é *per se* um componente de vacina (i.e., derivado do agente infeccioso ou antígeno contra o qual se deseja uma resposta imune).

Assim, em uma concretização adicional a invenção proporciona um método de acordo com a invenção, sendo que referida estrutura β cruzada é induzida em pelo menos parte do referido pelo menos um peptídio, polipeptídio, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína.

Nesta concretização, uma parte do antígeno e/ou antígenos desejados ou um ou mais epítopos de referido(s) antígeno(s) é usada como um composto que proporciona a estrutura β cruzada. Como indicado previamente, é possível introduzir estruturas β cruzadas de muitas maneiras. Uma maneira preferida de introduzir estruturas β cruzadas em um antígeno é por meio de um ou mais tratamentos de aquecimento, congelamento, oxidação, glicosamento PEGilação, sulfatação, exposição a um caotrófico, de preferência, o caotrófico é uréia ou guanidínio-HCl, fosforilação, proteólise parcial, lise química, de preferência, com HCl ou brometo de cianogênio, sonicação, dissolução em soluções orgânicas, de preferência, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol e ácido trifluoroacético, ou uma combinação dos mesmos.

Um epítopo *per se* pode ser muito pequeno para compreender estruturas β cruzadas. Como indicado previamente, vários epítopos em conjunto podem formar uma estrutura β cruzada e/ou o epítopo pode ser colocado (sinteticamente, quimicamente ou recombinantemente) em um ambiente compreendendo estruturas β cruzadas. Assim, em uma vacina de subunidade compreendendo, p. ex., dois antígenos proteináceos de um agente infeccioso, uma parte de um ou do outro, ou ambos os antígenos, podem ser dotados com estruturas β cruzadas e, depois, dispostos juntos com o resto do material antigênico para proporcionar, ou pelo menos incremental, a imunogenicidade de uma composição compreendendo estes antígenos. Novamente, é possível adicionar constituintes normais de composições imunogênicas (em particular vacinas), como veículos, adjuvantes, outros excipientes. Se o veículo for proteináceos, ele também pode induzir vantajosamente estruturas β cruzadas em pelo menos parte de referido veículo. Um ou mais dos componentes antigênicos da vacina de subunidade podem ser acoplados a referido veículo. Novamente, os componentes antigênicos podem estar presentes como monômeros, dímeros, multímeros,

em disposições de pé-a-cabeça (com ou sem espaçadores entre os mesmos), ou em outras disposições multiméricas (conhecidas como "árvores", ou "estrelas" e análogos). As composições imunogênicas composições imunogênicas produzidas com os métodos da invenção também são parte da presente invenção. Composições antigênicos de acordo com a invenção são tipicamente as vacinas conhecidas contra os antígenos desejados conhecidos, a que pelo menos um composto proteináceos é adicionado numa quantidade de até 30 porcento em peso do material antigênico presente na vacina. Em uma concretização preferida, os compostos que proporcionam estrutura β cruzada estão presentes em 10-30 % em peso com relação ao material antigênico. Quando o material compreendendo estrutura β cruzada da invenção é usado para substituir um veículo convencional em uma vacina, ele pode ser usado aproximadamente nas mesmas relações em peso que o veículo original. Quando parte do antígeno(s) relevente é usada para proporcionar os compostos de estrutura β cruzada, então a quantidade total de material antigênico deveria ser pelo menos a mesma que em uma vacina sem referidas estruturas β cruzadas. Tipicamente, isto significa que a quantidade total de antígeno (normal + compreendendo estrutura β cruzada) será de 10 a 50, de preferência, de 5 a 30 % maior do que a vacina sem estruturas β cruzadas. Do antígeno a ser usado como composto que proporciona estrutura β cruzada, tipicamente pelo menos 50 % são desnaturados, mais preferivelmente mais de 90 % são desnaturados. A combinação ótima de antígeno desnaturado e normal para cada vacina é determinada por meio de simples estudos de dose crescente. Produz-se faixas de composições antigênicos que compreendem 5, 10, 20, 30, 40 50, % em peso do material antigênico desnaturado para se determinar a quantidade adicionada apropriada de antígenos contendo estrutura β cruzada. Quando a faixa é determinada, faz-se o ajuste fino da mesma determinando-se uma faixa entre as melhores doses. O mesmo é realizado quando se usa material proteináceo inerte para proporcionar as

estruturas β cruzadas.

O uso intencionado das composições antigênicos de acordo com a invenção é como vacinas, sejam terapêuticas ou profiláticas. O uso preferido é na profilaxia contra agentes infecciosos. O campo da vacina é um velho campo da arte. Pessoas com prática na arte são mui capazes de adaptar a presente invenção a vacinas conhecidas. Adicionalmente, vacinas (p. ex. vacinas de subunidade) que não apresentavam suficiente eficácia (proteção) podem ser incrementadas com os métodos e meios da presente invenção.

Assim, em uma concretização adicional a invenção proporciona o uso de estruturas β cruzadas na preparação de uma vacina para a profilaxia de uma doença infecciosa, ou, mais preferivelmente, o uso de estruturas β cruzadas induzidas em um componente de proteína de um agente infeccioso na preparação de uma vacina que induz uma resposta imune contra referido agente infeccioso, em particular o uso acima, sendo que referido componente de proteína é uma proteína viral ou bacteriana e sendo que referido agente infeccioso é um vírus, ou uma bactéria.

Em outra concretização a invenção proporciona uma vacina de subunidade compreendendo pelo menos uma proteína viral, sendo que pelo menos 4-50 %, de preferência, 10-30 % de referida proteína viral encontra-se numa conformação compreendendo estruturas β cruzadas.

Em outra concretização adicional a invenção proporciona uma vacina de subunidade compreendendo pelo menos uma proteína bacteriana, sendo que pelo menos de 4 a 50 %, de preferência, de 10 a 30 % de referida proteína bacteriana encontra-se numa conformação compreendendo estruturas β cruzadas.

Em outra concretização adicional a invenção proporciona uma vacina de subunidade compreendendo pelo menos dois proteínas virais, sendo que pelo menos de 4 a 50 %, de preferência, de 10 a 30 % de pelo menos uma de referidas proteínas virais encontra-se numa conformação compreendendo

estruturas β cruzadas.

Em outra concretização adicional a invenção proporciona uma vacina de subunidade compreendendo pelo menos duas proteína bacterianas, sendo que pelo menos de 4 a 50 %, de preferência, de 10 a 30 % de pelo menos uma de referidas proteína bacterianas encontra-se numa conformação compreendendo estruturas β cruzadas.

Em uma concretização adicional a invenção proporciona um uso de estruturas β cruzadas na preparação de uma composição imunogênica para a profilaxia e/ou tratamento de câncer. Referida composição imunogênica é, de preferência, uma vacina para a profilaxia e/ou tratamento de um tumor ou metástase. Estruturas β cruzadas induzidas em um componente de proteína de uma vacina são usadas, de preferência, para induzir uma resposta imune contra um tumor ou metástase. Referido componente de proteína compreende, de preferência, um antígeno de tumor. Conseqüentemente, a indução de estruturas β cruzadas em um tumor antígeno é particularmente vantajosa para a produção de uma composição imunogênica capaz de elicitar uma resposta imune contra referido tumor. Alternativamente, ou adicionalmente, referido componente de proteína é combinado com outro composto compreendendo estruturas β cruzadas. Referido outro composto compreende, de preferência, um adjuvante. De preferência, usa-se ovalbumina em que a formação de estruturas β cruzadas foi induzida e/ou acentuada.

Em uma concretização preferida um método de acordo com a invenção é usado para preparar uma composição imunogênica contra um tumor que é induzido por um agente infeccioso, como por exemplo um vírus. Da forma mais preferível, estruturas β cruzadas são usadas na preparação de uma composição imunogênica contra um tumor relacionado com papilomavírus humano (HPV, *Human papillomavirus*). De preferência, estruturas β cruzadas são induzidas e/ou acentuadas em uma proteína de HPV E6 e/ou proteína de HPV E7. Referida proteína de HPV E6 e/ou proteína de

HPV E7 em que a formação de estruturas β cruzadas foi induzida e/ou acentuada é particularmente vantajosa para elicitar uma resposta imune contra um tumor relacionado com HPV. Alternativamente, ou adicionalmente, uma proteína de HPV E6 e/ou proteína de HPV E7 é combinada com outro composto compreendendo estrutura β cruzada. Referido outro composto compreende, de preferência, um adjuvante. De preferência, usa-se ovalbumina em que a formação de estruturas β cruzadas foi induzida e/ou acentuada.

Em outra concretização adicional a invenção proporciona um uso de estruturas β cruzadas na preparação de uma composição imunogênica para imuno-castração. Nesta concretização a formação de estruturas β cruzadas é, de preferência, induzida e/ou acentuada em LHRH. Alternativamente, ou adicionalmente, um LHRH é combinado com outro composto compreendendo estrutura β cruzada. Referido outro composto compreende, de preferência, um adjuvante.

Proporciona-se também com isso um uso de estruturas β cruzadas na preparação de uma composição imunogênica para a profilaxia e/ou tratamento de aterosclerose, amiloidoses, doenças autoimunes, rejeições enxerto-versus-hospedeiro e/ou rejeições de transplante. Referida composição imunogênica compreende, de preferência, uma vacina. Estruturas β cruzadas são induzidas, de preferência, em um componente de proteína de uma vacina capaz de induzir uma resposta imune contra um componente de proteína envolvido em pelo menos uma das doenças indicadas acima, de preferência, aterosclerose, amiloidoses e/ou uma doença auto-imune, sendo que referido componente de proteína é um antígeno e sendo que referida doença é associada com acúmulo de referido componente de proteína. Em outra concretização adicional a invenção proporciona o uso de estruturas β cruzadas na preparação de uma composição imunogênica, de preferência, uma vacina, para induzir uma resposta imune na profilaxia ou tratamento de outras aberrações, e também para induzir uma resposta imune contra qualquer outra

porção ou auto-antígeno, de preferência, mas sem limitação, nicotina, haptenos e/ou LHRH. Em uma concretização, estruturas β cruzadas são induzidas em um componente de proteína de uma vacina capaz de induzir uma resposta imune contra componentes envolvidos em rejeições de enxerto-versus-hospedeiro (GvH) ou rejeições de transplante.

Em outra concretização adicional a invenção proporciona uma composição imunogênica compreendendo um antígeno bacteriano ou parasítico ou viral, sendo que referido antígeno compreende pelo menos entre de 4 a 50 %, de preferência, de 10 a 30 %, de referido antígeno em uma conformação de estrutura β cruzada. Referido antígeno compreende, de preferência, proteína de HPV E6, proteína de HPV E7, hemaglutinina de Influenza H5, hemaglutinina de Influenza H7, proteína do pestivírus E2, proteína de *Fasciola hepatica* CL3 e/ou proteína PorA de Neisseria. Referida composição imunogênica é, de preferência, uma vacina.

Também se proporciona com isso um método de acordo com a invenção para produzir uma composição imunogênica e/ou para aperfeiçoar a imunogenicidade de uma composição, sendo que referida composição compreende pelo menos um peptídio, polipeptídio, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína sendo que referido pelo menos um peptídio, polipeptídio, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína, compreende HPV E6, HPV E7, *Fasciola hepatica* CL3, Influenza H5, Influenza H7, proteína do pestivírus E2 e/ou proteína PorA de Neisseria.

De acordo com a presente invenção a imunogenicidade de uma proteína ou peptídio é incrementada após indução e/ou incrementação da formação de estruturas β cruzadas em referida proteína. Referida proteína compreende, por exemplo, β2glicoproteína I, que é uma auto-proteína. O aumento da imunogenicidade de auto-proteínas é muito útil para a indução de uma resposta imune contra referidas proteínas, que normalmente não são facilmente reconhecidas pelo sistema imunológico como antígenos. Exemplos

de referidas proteínas são, por exemplo, LHRH, B2glicoproteína I, e antígenos de tumor. A indução e/ou aumento da conformação da estrutura β cruzada em uma referida proteína ou peptídio antigênico da mesma em uma resposta imune (incrementada) quando da administração de referida proteína ou peptídio antigênico a um animal ou humano.

Em um aspecto a invenção proporciona uma composição imunogênica compreendendo uma β2glicoproteína I ou um peptídio antigênico da mesma, sendo que referida composição imunogênica compreende pelo menos entre 4-67 %, de preferência, de 10 a 33 % de referida proteína ou peptídio em uma conformação de estrutura β cruzada. Outra concretização proporciona uma composição imunogênica compreendendo uma β2glicoproteína I ou um peptídio antigênico da mesma, sendo que referida β2glicoproteína I, ou um peptídio antigênico da mesma, é acoplada a ou misturada com outra proteína ou peptídio da mesma compreendendo pelo menos entre 4-67 %, de preferência, de 10 a 33 % de referida outra proteína ou peptídio em uma conformação de estrutura β cruzada. Em uma concretização proporciona-se uma composição imunogênica que compreende uma β2glicoproteína I ou um peptídio antigênico da mesma, sendo que referida composição imunogênica compreende pelo menos entre 4-67 %, de preferência, de 10 a 33 % de referida proteína ou peptídio de β2-glicoproteína I em uma conformação de estrutura β cruzada e sendo que referida β2glicoproteína I ou peptídio antigênico é acoplada a ou misturada com outra proteína ou peptídio, sendo que pelo menos entre 4-67 %, de preferência, de 10 a 33 % de referida outra proteína ou peptídio é em uma conformação de estrutura β cruzada. Referidas composições imunogênicas são usadas, de preferência, como uma vacina. Em uma concretização preferida referidas composições imunogênicas são usadas para a profilaxia ou tratamento de uma doença autoimune.

Em outra concretização adicional a invenção proporciona uma

composição imunogênica compreendendo a proteína bacteriana ou parasítica ou viral ou um peptídio antigênico da mesma, sendo que referida proteína compreende pelo menos entre 4-67 %, de preferência, de 10 a 33 % de referida proteína ou peptídio em uma conformação de estrutura β cruzada. Também se proporciona aqui uma composição imunogênica compreendendo uma proteína bacteriana ou parasítica ou viral ou um peptídio antigênico da mesma, sendo que referida proteína ou peptídio antigênico é acoplado a ou misturado com outra proteína ou peptídio da mesma compreendendo pelo menos entre 4-67 %, de preferência, de 10 a 33 % de referida outra proteína ou peptídio em uma conformação de estrutura β cruzada. Uma concretização preferida proporciona uma composição imunogênica compreendendo uma proteína bacteriana ou parasítica ou viral ou um peptídio antigênico da mesma, sendo que referida proteína compreende pelo menos entre 4-67 %, de preferência, de 10 a 33 % de referida proteína ou peptídio em uma conformação de estrutura β cruzada, sendo que referida proteína ou peptídio antigênico é acoplado a ou misturado com outra proteína ou peptídio, sendo que pelo menos entre de 4 a 67 %, de preferência, de 10 a 33 % de referida outra proteína ou peptídio é em uma conformação de estrutura β cruzada. As composições imunogênicas mencionadas acima compreendem, de preferência, uma vacina. Referida outra proteína compreende, de preferência, OVA ou KLH ou uma combinação de ambos, porque estes compostos são particularmente bem capazes de incrementar imunogenicidade. Assim, a invenção proporciona adicionalmente uma composição imunogênica e/ou vacina de acordo com a presente invenção, sendo que referida outra proteína compreende OVA ou KLH ou uma combinação de ambos.

Proporciona-se aqui também uma composição imunogênica ou vacina de acordo com a invenção compreende adicionou-se um adjuvante. Um adjuvante incrementa adicionalmente a imunogenicidade.

Está claro que as vacinas de acordo com a invenção

compreendem todos os tipos de vacinas de subunidade conhecidos, quer compreendam proteínas de um ou mais agentes infecciosos, epítopos de um ou mais agentes (ou combinações de epítopos e proteínas de um ou mais agentes), opcionalmente com outros compostos antigênicos (polissacarídeos, lipídeos, LPS, DNA, oligodesoxinucleotídeos (ODN), ODN-CpG),), ou complexos incluindo proteínas de um ou mais agentes. Está claro que vacinas de acordo com a invenção compreendem todos os tipos de vacinas, incluindo vacinas para profilaxia de infecções causadas por, mas sem limitação, vírus, bactérias, fungos, levedura, ou parasitas.

A invenção em uma concretização proporciona composições que são substancialmente não-imunogênicas com a desejada imunogenicidade. Em outra concretização a invenção proporciona composições imunogênicas conhecidas com imunogenicidade incrementada ou melhorada.

Assim, em uma concretização adicional a invenção proporciona um método para aperfeiçoar a imunogenicidade de uma composição compreendendo pelo menos um peptídio, polipeptídio, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína, compreendendo contactar pelo menos um de referido peptídio, polipeptídio, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína com um agente indutor de estrutura β cruzada, proporcionando com isso referida composição com estruturas β cruzadas adicionais.

Em particular, a invenção objetiva o incremento da imunogenicidade de vacinas conhecidas. Assim, em uma concretização adicional a invenção proporciona um método para incrementar a imunogenicidade de uma composição de vacina compreendendo pelo menos um peptídio, polipeptídio, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína, compreendendo contactar pelo menos um de referido peptídio, polipeptídio, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína com um agente indutor de estrutura β cruzada, dotando assim referida composição de vacina com estruturas β

cruzadas adicionais. Para determina se uma composição de vacina pode ter a imunogenicidade aperfeiçoada dotando-se referida composição com estruturas β cruzadas adicionais, uma determina a quantidade de estruturas β cruzadas já presentes ali com meios como divulgados aqui, particularmente por meio de ligação com um composto de ligação de estrutura β cruzada, como manchamento com vermelho Congo ou Tioflavina T. De uma maneira preferida, referida quantidade de estrutura β cruzada é determinada por meio de ligação de um composto de ligação de estrutura β cruzada, como listados na Tabela 1-3, de preferência, tPA ou Fator XII, e detectando-se a quantidade de estrutura β cruzada ligada de uma maneira conhecida per se, e determinando-se se a adição de estruturas β cruzadas adicionais incrementa a resposta imune.

Assim, a invenção proporciona adicionalmente um método para determinar a quantidade de estruturas β cruzadas em uma composição de vacina, compreendendo contactar referida composição de vacina com pelo menos um composto de ligação de estrutura β cruzada e relacionando-se a quantidade de estruturas β cruzadas ligadas com a quantidade de estruturas β cruzadas presentes na composição de vacina.

A invenção será ilustrada de forma mais detalhada na seção experimental a seguir.

Exemplos 1-5

Procedimentos experimentais

Ensaio de ativação de plasminogênio, ensaio de ativação de fator XII e ensaio de ativação de Fator XII/precalicreína.

A atividade de plasmina (Plm) foi analisada como descrito[1]. Peptídios e proteínas que foram testados quanto a sua capacidade estimuladora foram usados a 100 μg ml^{-1}, exceto se indicado de outra forma. Ativador de plasminogênio de tipo tissular (tPA [*Tissue-type Plasminogen Activator*], Actilyse, Boehringer-Ingelheim) e plasminogênio (Plg, plasma

humano em forma purificada por meio de cromatografia de afinidade de lisina) foram usados a concentrações de 400 pM e 1,1 ou 0,22 μM, respectivamente. Usou-se substrato cromogênico S-2251 (Chromogenix, Instrumentation Laboratory SpA, Milano, Itália) para medir a atividade de PIs. Para determinar as propriedades de ativação de tPA de adjuvantes, misturou-se 1600 pM de tPA e 0,22 μM de Plg com os seguintes adjuvantes: 5 μg/ml de sulfato de dextrano MW = 500 kDa (DXS500k, Pharmacia, Suécia), 20x adjuvante de Freund completo diluído (CFA, DIFCO, Brunswig, #0368-60), 2,1 μg/ml de CpG (Coley Pharmaceutical Group, MA, E.U.A.), 1 % vol/vol de suspensão de aluma (Imject, Pierce, Rockford, IL, E.U.A.) com 0,5 % vol/vol de plasma humano citrato combinado, ou suspensão a 100 μg/ml de brometo de dimetil dioctadecil amônio (DDA, Sigma, D2779). Concentrações são as concentrações finais de adjuvante usadas no ensaio.

Conversão do fator de zimogênio XII (#233490, Calbiochem, EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) a fator proteoliticamente ativo XII (fator XIIa) foi analisada indiretamente por meio de medição da conversão do substrato cromogênico Chromozym-PK (Roche Diagnostics, Almere, Países Baixos) formado com calicreína por meio de clivagem de precalicreína com fator XIIa. Cromozima-PK foi usada a uma concentração de 0,3 mM. Fator XII, precalicreína derivada de plasma humano (#529583, Calbiochem) e o cofator para a reação, quininogênio com alto peso molecular derivado de plasma humano (#422686, Calbiochem) foram usados a concentrações de 1 μg ml^{-1}. O tamponador de ensaio continha HBS (10 mM de HEPES, 4 mM de KCl, 137 mM de NaCl, pH 7,2, 5 μM de $ZnCl_2$, 0,1 % m/v de BSA (A7906, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.)). Realizou-se ensaios usando placas de microtitulação (#2595, Costar, Cambridge, MA, E.U.A. ou *Exiqon Peptide/Protein Immobilizer*, Vadbaek, Dinamarca). Peptídios e proteínas foram testados quanto a sua capacidade de ativar fator XII. Usou-se 150 μg ml^{-1} de caulim, um ativador estabelecido de fator XII como controle positivo,

e solvente (H_2O) como controle negativo. A conversão de Cromozima-PK foi registrada cineticamente a 37°C. Em poços de controle o fator XII foi omitido das soluções de ensaio.

Alternativamente, mediu-se a ativação de fator XII diretamente usando substrato cromogênico S-2222 (Chromogenix). A ativação de fator XII no plasma foi medida usando-se 60 % vol/vol de plasma, diluído com substrato e H_2O com ou sem cofator potencial. Auto-ativação de fator XII purificado foi medida incubando-se 53 $\mu g\ ml^{-1}$ de fator XII purificado em 50 mM de tamponador de Tris-HCl pH 7,5 com 1 mM de EDTA e 0,001 % vol/vol de Triton-X100, com S-2222 e H_2O, com ou sem cofator potencial.

Ligação de tPA agregados de proteína contendo conformação de estrutura β cruzada

A ligação de tPA a agregados similares a amilóide foi determinada com ELISAs. Agregados com conformação de estrutura β cruzada foram imobilizados em Exiqon (Vadbaek, Denmark), Nunc (tiras de amino, nº de catálogo 076901) placas Immobilizer ou placas com alta ligação de Greiner microlon (Greiner Bio-One, Países Baixos). A ligação de tPA foi detectada com um anticorpo monoclonal 374b (American Diagnostica, Tebu-Bio, Países Baixos). K2P-tPA, um análogo de tPA que não apresenta o domínio kringle 1 similar a R-EGF N-terminal (Reteplase, Boehringer-Ingelheim, Alemanha), foi usado como controle. A ligação de tPA e K2P-tPA foi testada na presença de 10 mM de ácido ε-amino capróico (εACA), um análogo de lisina que elimina a ligação do domínio kringle2 de tPA com radicais lisina expostos com solvente.

Preparação de agregados similares a amilóide e soluções de peptídio de controle

Preparações amilóides de γ-globulinas humanas foram preparadas como a seguir. γ-globulinas liofilizadas (G4386, Sigma-Aldrich)

foram dissolvidas numa relação volumétrica de 1(:)1 de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol e ácido trifluoroacético e secadas subseqüentemente sob um fluxo de ar. γ-globulinas secas foram dissolvidas em H_2O a uma concentração final de 1 mg ml^{-1} e mantidas à temperatura ambiente durante pelo menos três dias. Frações foram armazenadas a -20^{0}C.

Outras bateladas de peptídios com propriedades similares a amilóide foram preparadas como a seguir. Peptídios usados foram o tipo holandês [Dutch] humano Aβ(1-40) (DAEFRHDSGYE VHHQKLVFFAQDVGSNKGAIIGLMVGGW), fragmento amilóide de transtiretina (TTR11, YTIAALLSPYS), peptídio de núcleo amilóide de laminina de cadeia α1 (2097- 2108) (LAM12, AASIKVAVSADR), núcleo não amiloidogênico de camundongo IAPP(20-29) (mIAPP, SNNLGPVLPP), fragmento não-amilóide FP10 da cadeia α da fibrina humana (148-157) (KRLEVDIDIK)[1] e fragmento amilóide de cadeia α da fibrina humana (148-160) com mutação Lys157A1a (FP13, KRLEVDIDIAIRS) (BB, não publicado e [1,2]). Aβ, IAPP, FP13 e LAM12 foram desagregados numa mistura a 1:1 (v/v) de álcool de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-isopropila e ácido trifluoroacético, secados ao ar e dissolvidos em H_2O (Aβ, LAPP, LAM12: 10 mg ml^{-1}, FP13: 1 mg ml^{-1}). Após três dias a 37°C, peptídios foram mantidos à temperatura ambiente durante duas semanas, antes do armazenamento a 4°C. AB recentemente dissolvido (10 mg ml^{-1}) em álcool de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-isopropila e ácido trifluoroacético foi diluído em H_2O antes da imobilização em placas de ELISA. TTR11 (15 mg ml^{-1}) foi dissolvido em 10 % (v/v) de acetonitrila em água, a pH 2 (HCl), e mantido a 37°C durante três dias e, subseqüentemente, à temperatura ambiente durante duas semanas. mIAPP e FP10 foram dissolvidos a uma concentração de 1 mg ml^{-1} em H_2O e armazenados a 4°C. Soluções de peptídio foram testadas quanto à presença de conformação amilóide por meio de Tioflavina T- (ThT, #T3516, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) ou fluorescência de vermelho Congo como

descrito[3-5]. Vermelho Congo foi da Aldrich Chemical Company (#86,095-6, Milwaukee, WI, E.U.A.).

Fluorescência de tioflavina T

A fluorescência de produtos de adição química de peptídio/proteína similar a amilóide - ThT foi medida como a seguir. Soluções de 25 μg ml^{-1} de preparações de proteína ou peptídio foram preparadas em tamponador de 50 mM de glicina pH 9,0 com 25 μM de ThT. A fluorescência foi medida a 485 nm com excitação a 435 nm. Sinais de fundo do tamponador, tamponador com ThT e solução de proteína/peptídio sem ThT foram subtraídos medições correspondentes com solução de proteína incubada com ThT. Regularmente, a fluorescência de Aβ foi usada como um controle positivo, e a fluorescência de FP10, um fragmento de fibrina não-amilóide[1], e tamponador foi medido como um controle negativo. A fluorescência foi medida em triplicata em um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japão).

Para determinar a capacidade indutora de fluorescência de ThT apresentada por adjuvantes, plasma humano diluído 80x ou 20x foi incubado com um adjuvante e subseqüentemente diluído 40 vezes antes de se determinar a fluorescência de ThT. Adjuvantes e plasma diluído foram incubados durante 30 min. à temperatura ambiente, antes da diluição em tamponador de ensaio ThT. DEAE-dextrano (Pharmacia, 17-0350-01) foi usado a 5 μg ml^{-1}, DXS500k foi usado a 5 μg ml^{-1}, DDA foi usado a 1 μg ml^{-1}. Specol (7925000, ID-DLO, Países Baixos) foi diluído a uma relação de 5:4 com plasma diluído 40x ou 10x. CFA, adjuvante de Freund incompleto (IFA) e suspensão de aluma foram usados numa relação de 1:1 com plasma diluído 40x ou 10x. CpG foi usado a uma concentração de 11 μg ml^{-1}. Experimentos com plasma diluído 80x incluíram uma etapa de agitação com vórtice durante a misturação de plasma diluído com todos os adjuvantes, exceto alume. Alume foi misturado com plasma rolando-se um banco de rolamento durante

30 min. Quando se usou plasma diluído 20x, misturou-se plasma diluído por meio de centrifugação com DXS500k, DEAE-dextrano, DDA e CpG, enquanto que plasma e adjuvante foram misturados por meio de agitação com vórtice durante 20 s quando se usou CFA, IFA, Specol ou alume. CpG a uma concentração de 10,7, 21,4 e 42,8 μg ml^{-1} foi incubado subseqüentemente durante 30 min. à temperatura ambiente ou o/n [de um dia para o outro] a 4°C, em um banco de rolamento com 1 mg ml^{-1} de lisozima ou endostatina. Incremento da fluorescência de ThT de maneira análoga como descrito acima.

Alternativamente, CpG a 21,4 μg ml^{-1} foi misturado com 1 mg ml^{-1} de lisozima branca de ovo de galinha (Fluka, #62971), albumina de soro bovino (ICN, #160069, fração V), endostatina fragmento XVIII de colágeno humano recombinante (Entremed, Inc, Rockville, MD), γ-globulinas humanas, β2-glicoproteína I de plasma humano (ver abaixo) e β2-glicoproteína I humana recombinante (ver abaixo), e isto foi incubado de um dia para o outro em um dispositivo de rolamento a 4°C, antes de medições de fluorescência de ThT. Para tal fim, soluções de proteína a 2 mg ml^{-1} foram ultracentrifugadas durante 1 hora a 100.000*g antes do uso, e subseqüentemente isto foi diluído a 1:1 em tamponador com 42,9 μg ml^{-1} de CpG. Também se obteve imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM, *transmission electron microscopy*) com amostras de CpG, CpG com lisozima, amostras de lisozima. Adicionalmente, lisozima foi incubada com 250 μg ml^{-1} DXS500k e imagens de TEM são registradas com lisozima com DXS500k e com DXS500k apenas.

Ativação de tPA por β_2-glicoproteína I, ligação de fator XII e tPA a β_2-glicoproteína I e ThT e análise de TEM de β_2-glicoproteína I

Purificação de β_2-glicoproteína I (β_2GPI) foi realizada de acordo com métodos estabelecidos [6,7]. β_2GPI humano recombinante foi preparado usando-se células de inseto e purificado como descrito [6]. β_2GPI derivado de plasma usado em um ELISA de fator XII, o ensaio de ativação de

Plg e no ELISA de anticorpo da síndrome de antifosfolipídeo (ver abaixo), foi purificado de plasma humano fresco como descrita[7]. Alternativamente, β2GPI foi purificado, ou de plasma humano fresco, ou de plasma congelado usando-se uma coluna de afinidade de anticorpo anti-β_2GPI [8].

Ativação de tPA (Actilyse, Boehringer-Ingelheim) por meio de meio de preparações de β_2GPI foi testada em um ensaio de ativação de Plg (ver acima). Cem μg ml^{-1} de β_2GPI de plasma ou β_2GPI recombinante foram testados quanto a sua atividade estimuladora no ensaio de ativação de Plg e comparou-se com a atividade estimuladora do peptídio FP13[1].

Ligação de fator XII humano de plasma (Calbiochem) ou de tPA humano recombinante a β_2GPI purificado de plasma humano, ou a β_2GPI humano recombinante foi testada em um ELISA. Dez μg de fator XII ou tPA em PBS foram aplicados revestindo poços de uma placa de ELISA Costar 2595 e recobertos com concentrações seriais de β_2GPI. A ligação de β_2GPI foi avaliada com anticorpo monoclonal 2B2[8]. Ligação de fator XII a β2GPI também foi testada usando-se imuno-manchamento. β_2GPI (33 μg) purificado de plasma fresco ou de plasma congelado carregado sobre um gel de poli-acrilamida a 7,5 %. Após manchamento numa membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell), o manchamento foi incubado com anticorpo de fator XII anti-humano policlonal de coelho diluído 1000x (#233504, Calbiochem) e, após lavagem com imunoglobulinas anti-coelho de porco acoplado com peroxidase diluído 3000x (SWARPO, #P0217, DAKO, Dinamarca). Fluorescência de ThT de β_2GPI foi medida como a seguir. β_2GPI purificado de plasma humano (400 μg ml^{-1} de concentração final) foi incubado com ou sem 100 μM de vesículas de cardiolipina ou 250 μg ml^{-1} do adjuvante DXS500k, em 25 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,3. No ensaio de fluorescência de ThT, fluorescência de B_2GPI em tamponador, de cardiolipina ou DXS500k em tamponador, de tamponador e ThT apenas, e de produtos de adição química de 62GPI-cardiolipina e produtos de adição química de

β_2GPI-DXS500k, com ou sem ThT, foi registrado como descrito acima (fluorescência de ThT de seção). Adicionalmente, imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM, *transmission electron microscopy*) foram registradas com cardiolipina, β_2GPI de plasma humano, com ou sem cardiolipina, e com β_2GPI recombinante, como descrita[3].

Interferência com ligação de auto-anticorpos anti-β_2GPI de pacientes autoimunes com síndrome de antifosfolipídeo a β_2GPI imobilizado com β_2GPI recombinante e não de β_2GPI derivado de plasma.

Quando β_2GPI derivado de plasma é revestido sobre placas ELISA hidrofílicas, podem ligar-se auto-anticorpos anti-β_2GPI isolados de plasma de pacientes autoimunes com síndrome de antifosfolipídeo[9]. Para estudar a influência de co-incubações do β_2GPI revestido com os anticorpos juntamente com β_2GPI de plasma ou β_2GPI recombinante, adicionou-se concentrações seriais de β_2GPI aos anticorpos dos pacientes. Subseqüentemente, determinou-se a ligação dos anticorpos a β2GPI revestido.

Análise de estrutura de proteína após exposição a adjuvantes

Proteínas liofilizadas foram dissolvidas em solução salina tamponada com HEPES (HBS, 10 mM de HEPES, 4 mM de KCl, 137 mM de NaCl, pH 7,2) a uma concentração final de 2 mg ml^{-1}. Proteínas foram dissolvidas cuidadosamente em um dispositivo de rolamento à temperatura ambiente, durante 10 min, a 37°C durante 10 min e, novamente, à temperatura ambiente, durante 10 min. Suspensão de caulim (6564, Genfarma, Zaandam, Países Baixos) e soluções de consumo de DXS500k de 500 μg ml^{-1} foram preparadas em HBS. Albumina (ICN, 160069), lisozima (ICN, 100831), γ-globulinas (G4386, Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Baixos), endostatina (EntreMed, Inc., Rockville, MD) e fator XII (Calbiochem, 233490) foram diluídos a 1:1 em HBS apenas ou em HBS com caulim ou DXS500k.

Plasma citrado combinado humano foi diluído 40x em HBS antes do uso para se obter uma concentração total estimada de proteína de 2

mg ml^{-1}, e subseqüentemente diluída 1:1 em tamponador ou suspensão/solução de adjuvante. Amostras de controle de proteína e as amostras de proteína-adjuvante foram incubadas de um dia para o outro a 4°C em um dispositivo de rolamento. Após incubação, 25 µl das amostras foram analisados quanto à ligação de ThT (ver acima). Fluorescência do tamponador ou os adjuvantes foi registrada para fins de subtração de fundo. Amilóide-β(1-40) E22Q foi usado como um controle positivo. Alternativamente, proteínas de controle e proteínas incubadas com o adjuvante solúvel DXS500k foram imobilizadas sobre placas ELISA de alta ligação microlon Greiner. Poços foram bloqueados com reagente de bloqueio [*Blocking reagent*] (Roche). Hemoglobina glicosada (Hb-AGE) foi imobilizada como um controle positivo para ligação de tPA a um agregado de proteína com propriedades similares a amilóide. Hb-AGE i) aparece como estruturas fibrosas sob o microscópio eletrônico de transmissão (não mostrado), ii) contém uma quantidade incrementada de estrutura secundária de lâmina β, como determinado com dicroísmo circular por via espectropolarimétrica (não mostrado), e iii) acentua a fluorescência de vermelho Congo (não mostrado). Amostras foram recobertas com concentrações seriais de tPA de comprimento pleno ou K2P-tPA, na presença de 10 mM de εACA.

Análise de fluorescência de ThT de estrutura de lisozima após exposição a lipopolissacarídeo

Lipopolissacarídeo (LPS) liga-se a lisozima[10], que pode prevenir atividades biológicas de LPS[11], e LPS ativa fator XII[12]. Nós testamos se a ligação de lisozima é acompanhada por uma alteração conformacional na proteína com introdução de estrutura similar a amilóide. Para este fim, 0, 10, 25, 100, 200, 600 e 1200 µg ml^{-1} LPS (de Escherichia coli sorotipo 011:B4, #L2630, lote 104K4109, Sigma-Aldrich) foram incubados de um dia para o outro a 4°C ou durante 30 min. à temperatura ambiente, em um dispositivo de rolamento com 1 mg ml^{-1} lisozima (ICN, 100831) em HBS.

Subseqüentemente, a capacidade de acentuar fluorescência de ThT foi determinada com solução diluída 40x, como descrito acima.

Alternativamente, de maneira análoga ao descrito acima para CpG, LPS a 600 μg ml^{-1} foi misturado com 1 mg ml^{-1} de lisozima, albumina, endostatina, γ-globulinas, β2-glicoproteína I do plasma (β2GPI) e β2GPI recombinante, e incubado de um dia para o outro em um dispositivo de rolamento a 4^0C, antes das medições de fluorescência de ThT. Novamente, soluções de proteína a 2 mg ml^{-1} foram ultracentrifugadas durante 1 h a 100.000*g antes do uso, e diluídas subseqüentemente a 1:1 em tamponador com 1200 μg ml^{-1} de LPS.

Ativação de células monocíticas U937 por meio de LPS e polipeptídios compreendendo conformação de estrutura β cruzada

Monócitos de U937 foram cultivados em placas de seis poços. Células foram estimuladas com tamponador (controle negativo), 1 μg ml^{-1} de LPS (controle positivo), 100 μg ml^{-1} de endostatina amilóide[1,3], 260 μg ml^{-1} de hemoglobina glicada e 260 μg ml^{-1} de hemoglobina de controle. Após 1 h de estimulação, células foram colocadas sobre gelo. Após lavagem, RNA foi isolado e quantificado espectrofotometricamente. Usou-se quantidade normalizadas de RNA para 26 ciclos de RT-PCR com iniciador de TNF-α humano e 18 ciclos de RT-PCR com iniciador 18S ribossômico para fins de normalização. DNA foi analisadas em um gel de agarose a 2 %.

Preparação de ovalbumina similar a amilóide, glucagônio humano, Etanercept e albumina de soro murino

Para preparar ovalbumina (OVA) alterada estruturalmente com conformação de estrutura β cruzada amilóide, aqueceu-se OVA purificada (Sigma, A-7641, lote 071k7094) a 85^0C. Um mg ml^{-1} de OVA em 67 mM de tamponador NaPi pH 7,0/100 mM de NaCl, foi aquecido durante dois ciclos em recipientes de PCR em um ciclizador térmico PTC-200 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, E.U.A.). Em cada ciclo, OVA foi aquecida de 30 a 85°C

a uma taxa de 5°C/min. OVA nativa (nOVA) e OVA desnaturada com calor OVA (dOVA) foram testadas no ensaio de fluorescência de ThT e no ensaio de ativado de Plg. No ensaio de fluorescência e no ensaio de ativação de Plg, testou-se 25 e 100 μg ml^{-1} de nOVA e dOVA, respectivamente. Obteve-se imagens TEM de nOVA e dOVA para verificar a presença de agregados grandes.

Obteve-se albumina de soro murino (MSA, *murine serum albumin*) modificada por meio de redução e alquilação. MSA (#126674, Calbiochem) foi dissolvido em 8 M de uréia, 100 mM de Tris-HCl pH 8,2, a 10 mg ml^{-1} de concentração final. Adicionou-se ditiotreitol (DTT) a uma concentração final de 10 mM. Ar foi substituído por N_2 e a solução foi incubada durante 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi transferida para gelo e adicionou-se iodoacetamida de uma solução 1 M a uma concentração final de 20 mM. Após uma incubação de 15 min. sobre gelo, MSA reduzido-alquilado (alquila-MSA) foi diluído a 1 mg ml^{-1} adicionando-se H_2O. Alquila-MSA foi dialisado contra H_2O antes do uso. MSA nativo (nMSA) e alquila-MSA foram testados no ensaio de fluorescência de ThT e no ensaio de ativação de Plg. No ensaio de fluorescência-ThT, testou-se 25 μg ml^{-1} de nMSA e alquila-MSA, e no ensaio de ativação de Plg, testou-se 100 μg ml^{-1}. A presença de agregados ou fibrilos foi analisada com TEM.

Propriedades similares a amilóide no glucagônio humano (Glucagen, #PW60126, Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca) foram introduzidas como a seguir. Glucagônio liofilizado foi dissolvido a 1 mg ml^{-1} em H_2O com 10 mM de HCl. A solução foi mantida subseqüentemente a 37°C durante 24 h, a 4°C durante 14 dias e novamente a 37°C durante 9 dias. Determinou-se fluorescência de ThT como descrito acima, e comparou-se com glucagônio recentemente dissolvido. Propriedades de ativação de tPA de ambos, glucagônio desnaturado com calor e glucagônio dissolvido recentemente, foram testadas a 50 μg ml^{-1}. Realizou-se análise TEM para

avaliar a presença de grandes estruturas multiméricas.

Imunização de camundongos Balb/c com ovalbumina e ovalbumina similar a amilóide

Camundongos Balb/c fêmeas com de oito a dez semanas de vida são imunizados com OVA de acordo com dois regimes de imunização (Central Animal Laboratories, Utrecht University, Países Baixos). Soro pré-imune foi recolhido antes das imunizações. Em um regime, dois grupos de cinco camundongos são injetados subcutaneamente cinco dias consecutivos por semana, durante três semanas consecutivas. Doses constituídas de 10 μg OVA nativa ou de OVA desnaturada com calor OVA desnaturada com calor para cada injeção.

Alternativamente, de acordo com o segundo protocolo, três grupos de cinco camundongos recebem injeção uma vez intraperitonealmente com doses compreendendo 5 μg de nOVA, 5 μg de OVA ou 5 μg de OVA nativa misturada a 1:1 com adjuvante de Freund completo. A cada semana coletou-se sangue. Após três semanas, administrou-se uma segunda dose. Usou-se adjuvante de Freund incompleto em lugar de adjuvante de Freund completo. Coletou-se sangue após uma semana do início da imunização. Titulações de anticorpos em soros foram determinadas e soros foram analisados quanto à presença de anticorpos específicos para conformação de estrutura β cruzada. Para tal fim, nOVA foi aplicado revestindo poços de placas ELISA de 96 poços e isto foi incubado com diluições seriais de soros. Soros dos grupos de cinco camundongos foram combinados antes das análises. Placas foram lavadas e subseqüentemente incubadas com imunoglobulinas anti-camundongo de coelho acopladas com peroxidase (RAMPO, P0260, DAKOCytomation, Glostrup, Dinamarca). Placas foram reveladas subseqüentemente com substrato de tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi terminada com H_2SO_4.

Exemplo de resultados de 1-5

Exemplo de resultado

Fator XII é ativado por meio de superfícies carregadas negativamente e por meio de peptídios com conformação de estrutura β cruzada.

Ativação de fator XII com agregados de proteína com conformação de estrutura β-cruzada similar a amilóide

É de conhecimento geral que contactar fator XII com superfícies artificiais carregadas negativamente, como caulim e DXS, resulta em sua ativação. Aqui, nós demonstramos que agregados de peptídios com conformação de estrutura β cruzada também estimulam ativação de fator XII, como medido por meio de conversão de precalicreína a calicreína, que pode converter substrato cromogênico Cromozima-PK. (Fig. 1A, B). Nós também mostramos a capacidade de agregados de proteína com conformação de estrutura β cruzada de induzirem auto-ativação de fator XII (Fig. 1C). Para este fim, fator XII purificado foi incubado com substrato S-2222 e tamponador ou 1 μg ml^{-1} de DXS500k, 100 μg ml^{-1} de FP13 K157G, 10 μg ml^{-1} de Aβ(1-40) E22Q e 10 μg ml^{-1} de Hb-AGE. Todos os três agregados similares a amilóide são capazes de induzir auto-ativação de fator XII. FP13 K157G e Hb-AGE apresentam uma potência de induzir auto-ativação que é similar ao ativador de superfície estabelecido DXS500k, enquanto que a potência do A6(1-40) E22Q é um tanto menor.

Exemplo de Resultados 2

Adjuvantes introduzem propriedades similares a amilóide em proteínas

Adjuvantes atuam como desnaturadores e induzem conformação de estrutura β cruzada em proteínas

Fator XII e tPA ligam-se a agregados de proteínas ou peptídios com conformação de estrutura β cruzada similar a amilóide[1,3,13] e resultados não-publicados B Bouma/MFBG Gebbink. Adicionalmente, a ligação a agregados contendo estrutura β cruzada resulta em ativação de ambas serina proteases (ver exemplo 1 e [1]. Adicionalmente, a ligação de ThT a

conformações de proteína similares a amilóide resulta em um sinal fluorescente específico. Além disso, a agregação de peptídios e proteínas com conformação de estrutura β cruzada pode resultar finalmente em formação de precipitados fibrilares ou amorfos que podem ser visualizados com microscopia eletrônica de transmissão (TEM, *transmission electron microscopy*). Estes métodos foram usados, portanto, para determinar se a exposição de uma proteína ou peptídio a vários adjuvantes que são usados em regimes de vacinação, introduz propriedades similares a amilóide.

Nós teorizamos que pelo menos parte da atividade e função adjuvante pode basear-se na capacidade de introduzir conformação de estrutura β cruzada ou qualquer outra conformação similar a amilóide, seja no antígeno ou em qualquer outra proteína ou peptídio que contacta o adjuvante. Alternativamente, adjuvantes baseados em peptídio ou proteína podem apresentar, eles próprios, propriedades similares a amilóide. A conformação de proteína similar a amilóide é então o fator imunogênico que induz uma resposta imune.

Para testar esta hipótese, expôs-se albumina purificada, γ-globulinas, lisozima, fator XII, endostatina e plasma diluído, a caulim ou DXS500k, dois compostos que são bem conhecidos por sua capacidade de ativar FXII, mas também são usados como adjuvante. Subseqüentemente determinou-se a fluorescência de ThT. Fator XII 5 só foi exposto a DXS500k. Após subtração de sinais de fundo, caulim induz um sinal incrementado de fluorescência de ThT de 1,6 até 6,6 vezes. DXS500k acentua a fluorescência de ThT 2,6 vezes (fator XII) a 17,8 vezes (albumina) (Fig. 2A). Em um ELISA de tPA e K2P-tPA avaliou-se a ligação a proteínas de controle imobilizadas e misturas de proteínas com DXS500k (Fig. 2A). K2P-tPA não se ligou a qualquer das proteínas ou misturas de proteína-DXS500k (não mostrado). Exposição de proteínas ou plasma diluído a DXS500k aumentou a ligação de tPA por um fator de 1,3 (albumina) até 10,5 (endostatina), quando

comparado com a ligação de tPA a proteínas que foram incubadas apenas com tamponador. Os dados de fluorescência de ThT e os dados de ligação de tPA indicam que a exposição de proteínas a adjuvantes a caulim e DXS500k induz ou acentua propriedades similares a amilóide em proteínas.

Em seguida, avaliou-se o papel da conformação de estrutura β cruzada similar a amilóide na ativação de fator XII. Para este fim, um peptídio de fibrina amilóide FP13 K157G, um ativador efetivo de fator XII (Fig. 1C), foi incubado com fator XII purificado, na presença de substrato de fator XII ativado S2222, e com ou sem ThT (Fig. 2B). Os resultados mostram que ThT, um corante com afinidade estabelecida para agregados similares a amilóide inibe efetivamente a atividade estimuladora de FP13 K157G (Fig. 2B). Isto proporciona evidência direta para um papel da conformação de estrutura β cruzada na ativação de fator XII. Já há bastante tempo, compostos como vidro, caulim, DXS500k, aço cirúrgico, platina e ácido elágico são conhecidos por sua capacidade de induzir atividade de fator XII. A visão corrente é que fator XII é ativado por meio de interação específica da proteína com cargas negativas. Com base em nossas observações de que vários agregados similares a amilóide também são capazes de ativar fator XII, nós conjecturamos que compostos carregados negativamente ativam fator XII de uma maneira indireta, por meio de conformação de estrutura β cruzada formada em proteínas expostas a superfícies carregadas negativamente. Assim, compostos ativadores de fator XII, incluindo adjuvantes, servem como agentes desnaturadores que induzem agregação proteína/peptídio acompanhada pela formação de propriedades similares a amilóide. Para testar esta hipótese, nós usamos condições de ensaio durante as quais fator XII não é ativado ou só é ativado com dificuldade por DXS500k (Fig. 2C). Nestas condições fator XII pode ser ativado adicionando-se plasma diluído 80x. Ativação é totalmente inibida por meio de introdução de ThT. Estas observações indicam que as proteínas desnaturadas (plasma) compreendendo

conformação de estrutura β cruzada são os verdadeiros ativadores de fator XII, ao invés da carga negativa propriamente dita. Na Fig. 2D nós mostramos que outro adjuvante adicional, $Ca_3(PO_4)_2$, é um ativador de fator XII. Quando se usa quantidades suficientes de fator XII no ensaio, não é necessária proteína adicional para ativação. Nós também estabelecemos que fator XII propriamente dito pode assumir conformação similar a amilóide quando exposto a adjuvantes (Fig. 2A). Assim, autoativação de fator XII pode ser explicada agora pelo fator de que fator XII contendo estrutura β cruzada desnaturada e, talvez, agregado, na superfície de uma superfície carregada negativamente pode servir como a substância ativadora para outras moléculas de fator XII. Além de plasma diluído ou níveis elevados de fator XII nós verificamos que é possível usar albumina e endostatina (Fig. 2E, F). Nem albumina ou endostatina sozinhas, nem caulim ou DXS500k sozinhos, são ativadores suficientes de fator XII, enquanto que combinações de cofator de proteína e adjuvante resultam em fator XII e subseqüentemente atividade de precalicreína. Considerados em conjunto, a ativação de fator XII requer (1) uma superfície desnaturadora e (2) quantidades suficientes de uma proteína que é capaz de desnaturação nas superfícies proporcionadas.

Nós testamos em seguida se superfícies carregadas negativamente e adjuvantes também poderiam induzir ativação de tPA. Todos Os adjuvantes DXS500k, CFA, CpG, alume e DDA mostraram ser ativadores de tPA (Fig. 2G, H). Nas condições testadas, i.e. 1600 pM de tPA, 0,22 μM Plg, somente alume requer um cofator de proteína adicional (plasma diluído) para sua propriedade de ativação de tPA. Da mesma forma, com os outros adjuvantes, tPA e/ou Plg propriamente ditos desnaturam-se parcialmente na superfície do adjuvante, induzindo com isso a formação da conformação de estrutura β cruzada de amilóide que, subseqüentemente, pode ativar tPA.

Os mesmos adjuvantes, em conjunto com IFA, Specol e DEAE-dextrano, também foram analisados quanto a sua capacidade de

induzir fluorescência de ThT quando incubados com plasma diluído 80x ou 20x (Fig. 21 e 2 J, respectivamente). Com plasma diluído 80x, CFA, Specol, DXS500k e CpG induzem fluorescência de ThT, e com plasma diluído 20x, CFA, Specol, DXS500k, CpG, e também IFA induzem fluorescência de ThT, indicativa da formação de agregados de proteína similares a amilóide com conformação de estrutura β cruzada. Adicionalmente, CpG a 10,7, 21,4 e 42,8 μg ml^{-1} incubada de um dia para o outro com 1 mg ml^{-1} de lisozima acentuou a fluorescência de ThT por um fator de 1,1, 1,2 e 1,4, respectivamente, também indicativo da capacidade desnaturadora de CpG (não mostrado). Adicionalmente, quando 10,4 ou 21,7 μg ml^{-1} de CpG são incubados com 1 mg ml^{-1} de lisozima ou endostatina durante 30 min. à temperatura ambiente., observou-se um aumento da fluorescência de ThT de aproximadamente de 8 a 7 vezes para lisozima e de 39 a 56 vezes para endostatina, respectivamente (Fig. 2K, L). Adicionalmente, exposição de 1 mg ml^{-1} de albumina, endostatina, β_2GPI do plasma ou β_2GPI rec. a 21,4 μg ml^{-1} CpG resulta em maior fluorescência de ThT com aproximadamente um fator 3, 10, 2 e 5, respectivamente (Fig. 2M). Com estas condições de ensaio não se observou qualquer efeito com lisozima e γ-globulinas. Análise com TEM de CpG, lisozima e lisozima com CpG, todos após incubação de um dia para o outro, revelou que estão presentes agulhas pequenas na solução de CpG (Fig. 2N) e alguns poucos agregados na solução de lisozima (Fig. 2O). Quando CpG e lisozima são incubadas conjuntamente, observa-se uma alta densidade de agregados relativamente espessos que parecem ser constituídos de filamentos de precipitados globulares (Fig. 2P). Observa-se uma grande quantidade de redes ainda maiores de filamentos similares de agregados globulares no caso de lisozima exposta a agulhas de DXS500k (Fig. 2Q, R). As agulhas nas soluções de CpG e DXS500k desaparecem após exposição a lisozima.

Análises adicionais por meio de espectropolarimetria de dicroísmo circular, espectroscopia infra-vermelho *Fourier Transform*,

microscopia eletrônica de transmissão, estudos de ligação com compostos de ligação de conformação de estrutura β cruzada, proteínas e fragmentos de proteínas e estudos de difração de fibras de raios-X poderiam proporcionar informação adicional sobre a presença de agregados similares a amilóide com conformação de estrutura β cruzada em proteínas e peptídios que são expostos a adjuvantes.

Em princípio, qualquer adjuvante estabelecido ou qualquer adjuvante recentemente descoberto pode ser analisado quanto a sua capacidade desnaturadora, acompanhado da formação de agregados com conformação de estrutura β cruzada, ou quanto à presença de conformação de proteína similar a amilóide no próprio adjuvante. Ensaios de imunização com espécies de tipo selvagem ou espécies transgênicas, ou ensaios imunológicos à base de células com antígenos combinados com adjuvantes desnaturadores, ou com antígeno apenas, ou com antígeno desnaturado compreendendo conformação de estrutura β cruzada revelarão se adjuvantes atuam como indutores de uma resposta imune em virtude de sua capacidade de induzir agregação acompanhada com conformação de estrutura β cruzada. Talvez adjuvantes não sejam estritamente necessários, ou seja, um antígeno com conformação de estrutura β cruzada pode ser por si só imunogênico. Para testar esta visão, é possível realizar uma comparação entre imunizações com 1) antígenos nativos, com 2) antígenos com conformação de estrutura β cruzada ou com um adjuvante que induz ou compreende conformação de estrutura β cruzada, e com 3) antígenos nativos combinados com um adjuvante convencional, como CFA, Specol, alume, LPS ou derivados dos mesmos, e CpG. Ensaios de imunização com camundongos ou com ensaios à base de células *in vitro* podem ser realizados, por exemplo, com 1) OVA nativa, glucagônio, albumina ou β_2GPI do plasma, 2) OVA desnaturada com calor, glucagônio desnaturado com calor/ácido, albumina desnaturada com calor, albumina alquilada, β_2GPI produzido recombinantemente, β_2GPI do

plasma em conjunto com DXS500k ou cardiolipina, e 3) CFA com OVA nativa, glucagônio, albumina ou β2GPI. Estes experimentos também contribuirão para a compreensão do mecanismo de trabalho da classe de adjuvantes similares a CpG-like.

Estes adjuvantes transmitem sua atividade imunogênica via receptor similar a toll 9, via um mecanismo pouco compreendido. A interação direta entre CpG e TLR9 ainda não foi demonstrada. Nossos resultados sugerem que é necessária uma proteína desnaturada. Esta proteína é desnaturada, de preferência, com CpG. O papel da conformação de estrutura β cruzada na potencialização da imunogenicidade com CpG mas pode ser facilmente testada por uma pessoa versada na arte. Se verdadeiro, a imunopotencialização de CpG deveria ser diminuída na presença de um inibidor de formação de estrutura β cruzada ou por um inibidor da interação da conformação de estrutura β cruzada com uma de suas moléculas-alvo que transduz o sinal imunogênico. Um inibidor do tipo referido poderia ser qualquer composto de ligação de estrutura β cruzada, como ThT, tPA ou um equivalente do mesmo, um anticorpo contra a conformação relevante de estrutura β cruzada ou um anticorpo contra o receptor-alvo. O receptor-alvo poderia ser qualquer um dos receptores de multi-ligantes que se ligam ou possivelmente ligam proteínas compreendendo estrutura β cruzada, como tPA, fator XII, fibronectina, ativador de fator de crescimento de hepatótitos, CD 14, proteína similar a receptor de lipoproteína de baixa densidade, CD36, receptores de aglutinadores A, receptores de aglutinadores B, receptores similares a *toll* e receptores para produtos finais de glicosamento avançado.

Exemplo de Resultados 3

A relação entre a estrutura de β_2-glicoproteína I, o antígeno-alvo em pacientes com a síndrome de antifosfolipídeo, e antigenicidade.

A síndrome de antifosfolipídeo e β_2-glicoproteína I alterada conformacionalmente

A síndrome do [anticorpo] antifosfolipídeo (APS, *anti-phospolipid syndrome*) é uma doença autoimune caracterizada pela presença de auto-anticorpos anti-β_2-glicoproteína I. Duas das principais preocupações clínicas da APS são a propensão de auto-anticorpos induzirem trombose e o risco de ressorção fetal. Sabe-se pouco acerca do início da doença autoimune. Trabalho recente demonstrou a necessidade de alterações conformacionais no antígeno principal na APS, β_2-glicoproteína I (β_2GPI), antes que o epítopo inicialmente oculto para auto-anticorpos seja exposto[14]. A ligação de β_2GPI nativo a determinados tipos de placas ELISA emula a exposição dos epítopos crípticos que estão aparentemente presentes em pacientes com APS pacientes[14]. Demonstrou-se que auto-anticorpos anti-β_2GPI não se ligam a β_2GPI globular em solução, mas somente quando β_2GPI foi imobilizado em determinados tipos de placas ELISA plates[14]. A forma globular (nativa) da proteína não é imunogênica, mas requer a adição de cardiolipina, células apoptósicas ou modificação por oxidação[15-16]. Assim, a geração de auto-anticorpos parece ser disparada por, e elicitada contra, uma forma de β_2GPI alterada conformacionalmente. Propôs-se previamente que a indução de uma resposta imune adaptativa requer um assim-chamado sinal de "perigo" que, entre outros efeitos estimula a apresentação de antígeno e liberação de citocina por células dendríticas [17]. Os resultados a seguir implicam em que a cardiolipina induz conformação de estrutura β cruzada em β_2GPI que, então, serve como um sinal de perigo. Em analogia, outros fosfolippideos carregados negativamente, ou estruturas que contêm lipídeos carregados negativamente, como liposomas ou células apoptósicas, ou outros indutores de conformação de estrutura β cruzada, incluindo LPS, CpG que apresentam propriedades indutoras de conformação de estrutura β cruzada, podem ser imunogênicos devido ao fato de que, pelo menos em parte, eles podem induzir conformação de estrutura β cruzada.

Fator XII e tPA ligam-se a β_2GPI recombinante e a β_2GPI purificado de

plasma congelado, mas não a β_2GPI purificado de β_2GPI de plasma fresco.

β_2GPI recombinante, mas não β_2GPI purificado de plasma fresco estimula conversão mediada-com-tPA de Plg a plasmina, conforme medido como a conversão do substrato cromogênico específico para plasmina S-2251 (Fig. 3A). Usando um ELISA mostra-se que o tPA e fator XII ligam-se a β_2GPI recombinante, mas não se ligam a β_2GPI purificado de plasma humano fresco (Fig. 3B, C). β2GPI recombinante liga-se a fator XII com uma k_D de 20 nM (Fig. 3C) e a tPA com uma k_D de 51 nM (Fig. 3B). Adicionalmente, β_2GPI purificado de plasma que foi congelado a -20^{0}C e subseqüentemente descongelado, fator XII co-elui da coluna de afinidade de anticorpo anti-β_2GPI, como mostrado em Western blot após incubação do blot com anticorpo anti-fator XII (Fig. 3D). Isto sugere que β2GPI redobra em uma conformação contendo estrutura β cruzada ao congelar. Na Figura 3E, mostra-se o efeito inibidor de β_2GPI recombinante sobre a ligação de auto-anticorpos anti-β2GPI isolados de pacientes com APS a β_2GPI imobilizado. Observa-se que β2GPI derivado de plasma em solução dificilmente apresenta um efeito sobre a ligação de anticorpo sobre β2GPI imobilizado. Fig. 3F mostra que a exposição de β_2GPI a cardiolipina ou DXS500k introduz um sinal incrementado de fluorescência de ThT, indicativo de uma alteração conformacional na β_2GPI, acompanhado da formação de conformação de estrutura β cruzada. Novamente, β_2GPI recombinante já forneceu inicialmente um maior sinal de fluorescência de ThT do que β2GPI nativa purificada de plasma. Adicionalmente, exposição de β2GPI do plasma e β2GPI rec. a adjuvantes/desnaturadores LPS ou CpG também induz um aumento da fluorescência de ThT, que é maior com β2GPI rec. do que com β2GPI do plasma para ambos os adjuvantes (Fig. 2M e Fig. 4C). Estes dados não só indicam que β_2GPI compreende mais conformação de estrutura β cruzada do que β2GPI do plasma, mas que β2GPI recombinante também assume mais

facilmente esta conformação quanto contactado com vários adjuvantes e superfícies, i.e. cardiolipina, DXS500k, LPS e CpG. Na figura 3G mostrou-se que a exposição de β_2GPI a cardiolipina, imobilizada nos poços de uma placa ELISA, torna β_2GPI com capacidade de ligação de tPA. A ligação de β_2GPI diretamente na placa ELISA resulta em menos ligação de tPA. Estas observações também mostram que a cardiolipina tem um efeito desnaturador, induzindo com isso conformação similar a amilóide na β_2GPI, necessária para ligação de tPA. Estas observações, em conjunto com a observação de que exposição de β_2GPI a vesículas de cardiolipina induziu capacidade de ligação de ThT (Fig. 3F), mostram que exposição de β_2GPI a uma superfície desnaturadora induz formação de conformação de estrutura β cruzada similar a amilóide.

Epítopos para auto-anticorpos são expostos especificamente em conformações não-nativas de β_2GPI compreendendo conformação de estrutura β cruzada

Figura 3 mostra que preparações de β_2GPI reagem com marcadores de ThT de estrutura β cruzada amilóide, tPA e fator XII. Adicionalmente, exposição de 62GPI a cardiolipina introduz capacidade de ligação de tPA (Fig. 3G). Adicionalmente, observa-se grandes estruturas fibrilares em imagens TEM de B2GPI do plasma em contato com cardiolipina (Fig. 3H, imagem 2 e 3). Vesículas pequenas de cardiolipina parecem ser ligadas à β2GPI fibrilar. Imagens de β2GPI do plasma apenas (Fig. 3H, imagem 1) ou cardiolipina apenas (não mostrado) revelaram que não estão presentes ultra-estruturas visíveis. Em contraste, é possível observar agregados não-fibrilares e fibrilos relativamente finos e ondulados em imagens de β2GPI recombinante (Fig. 3H, imagem 4). Esta observação mostra que exposição de β_2GPI a cardiolipina e expressão e purificação de β2GPI recombinante resultam em uma estrutura multimérica alterada de β_2GPI, quando comparado com a estrutura monomérica observada com

cristalografia de raios-X[18]. As preparações β_2GPI com conformação de estrutura β cruzada expressam epítopos que são reconhecidos por auto-anticorpos anti-β2GPI isolados do plasma de pacientes com APS. Adicionalmente, exposição de β_2GPI a cardiolipina ou DXS500k induz uma maior fluorescência quando se adiciona ThT, indicativo da formação de conformação de estrutura β cruzada quando β_2GPI contacta uma superfície carregada negativamente. Interessante observar que se verificou previamente que exposição de β_2GPI a cardiolipina é um pré-requisito para a detecção de anticorpos anti-β_2GPI em soros de camundongos imunizados[15]. Estas combinações combinadas apontam para um papel para alterações conformacionais em β2GPI nativa, necessário para expor novos sítios imunogênicos. Nossos resultados indicam que o elemento de estrutura β cruzada é parte deste epítopo. Nós predizemos que a conformação de estrutura β cruzada pode ser formada de maneira relativamente fácil por um ou mais dos cinco domínios da molécula de β_2GPI estendida [18]. Cada domínio compreende pelo menos uma lâmina β que pode funcionar como uma semente para redobramento local em conformação de estrutura β cruzada. Uma pessoa versada na arte é agora capaz de testar a hipótese de que a conformação de estrutura β cruzada é o essencial para elicitar anticorpos anti-β_2GPI. Estudos de imunização com β2GPI nativa e β2GPI alterada conformacionalmente, com ou sem conformação de estrutura β cruzada, podem ser realizados na presença ou ausência de um composto, incluindo ThT, tPA, RAGE, CD36, anticorpos anti-estrutura β cruzada ou um equivalente funcional dos mesmos, que inibe a atividade de conformação de estrutura β cruzada. Alternativamente, é possível realizar estudos *in vitro* com células apresentadoras de antígeno (APC, *antigen presenting cells*), incluindo células dendríticas (DC). Fontes de β2GPI alterada conformacionalmente são β_2GPI recombinante, ou β_2GPI exposto a qualquer superfície desnaturadora, p. ex. plásticos, cardiolipina, DXS500k e potencialmente outros adjuvantes.

Adicionalmente, β2GPI alterada estruturalmente pode ser obtida por meio de qualquer outro tratamento químico ou físico, p. ex. aquecimento, alterações de pH, redução-alquilação. Uma pessoa versada na arte é capaz de projetar e realizar ensaios celulares *in vitro* e modelos de camundongo *in vivo* para se obter evidência adicional para o papel da conformação de estrutura β cruzada na autoimunidade (ver abaixo). Para estabelecer se o elemento de estrutura β cruzada é essencial para elicitar uma resposta imune ou para ligação de anticorpo, é possível realizar estudos de inibição com qualquer composto de ligação de estrutura β cruzada que pode competir com a ligação de anticorpos ou que pode prevenir uma resposta imune. Nossas observações indicam que a conformação de estrutura β cruzada é necessária para a indução de uma resposta imune adaptativa. A conformação de estrutura β cruzada também poderia ser parte de um epítopo reconhecido por anticorpos autoimunes. Com base em nossos estudos pode-se esperar que outras doenças e complicações, em que auto-anticorpos estão implicados, sejam mediadas por uma proteína compreendendo conformação de estrutura β cruzada. Adicionalmente à síndrome do [anticorpo] antifosfolipídeo (APS, *anti-phospolipid syndrome*) referidas condições incluem, embora sem limitação, lupus eritematoso sistêmico (SLE, *systemic lupus erythematosus*), diabetes de tipo I, aplasia de células vermelhas e a formação de anticorpos inibidores em pacientes com hemofilia tratados com fator VIII. Uma pessoa versada na arte é agora capaz de selecionar pacientes de hemofilia com auto-anticorpos anti-fator VIII quanto à presença de anticorpos em seu plasma que reconhecem a conformação de estrutura β cruzada. Uma análise mais detalhada revelará se anticorpos de ligação de estrutura β cruzada putativa se ligam especificamente (em parte) à conformação de estrutura β cruzada no antígeno, ou se os anticorpos se ligam à conformação de estrutura β cruzada presente em qualquer proteína não-relacionada.

Exemplo de Resultados 4

Incubação de monócitos U937 cultivados com proteínas compreendendo conformação de estrutura β cruzada resulta em regulação-para-cima de níveis de mRNA de fator α de necrose de tecido, e LPS induz a formação de estruturas similares a amilóide na lisozima.

Compostos ricos em estrutura β cruzada induzem expressão de RNA de TNFα em monócitos

Após exposição de monócitos U937 a LPS ou endostatina amilóide rica em estrutura β cruzada ou Hb-AGE, DNA de TNFα é obtido após RT-PCR com RNA isolado (Fig. 4A). Hemoglobina de controle efetivamente induz regulação-para-cima de RNA de TNFα na mesma extensão, mas não excede aproximadamente 30 % dos valores obtidos após estimulação de Hb glicosada ou endostina amilóide. Quantidades de DNA de TNFα obtidas após RT-PCR com RNA de monócitos são normalizadas para as quantidades de DNA de 18S ribossômico presentes nas amostras correspondentes.

LPS atua como um desnaturador e induz conformação de estrutura β cruzada

Após exposição de 1 mg ml^{-1} lisozima a 10, 25, 100, 200, 600 e 1200 μg ml^{-1} de LPS em solução, fluorescência de ThT é acentuada 1,1, 1,3, 1,6, 2,3, 5,7 e 13,1 vezes respectivamente quando comparado com lisozima incubada em tamponador apenas, indicativo da formação de conformação similar a amilóide com estrutura β cruzada (Fig. 4B). Quando lisozima e endostatina são expostas a 200, 400 e 600 μg ml^{-1} de LPS, fluorescência de ThT é acentuada aproximadamente 5, 11 e 18 vezes e 8, 20 e 26 vezes, respectivamente (Fig. 2K, L). Alternativamente, de maneira similar ao que se observa com CpG (Fig. 2M), quando 1 mg ml^{-1} de lisozima, albumina, γ-globulinas, endostatina, B2GPI do plasma ou β2GPI rec. é exposto a 600 μg ml^{-1} de LPS, fluorescência de ThT é acentuada aproximadamente 10, 3, 2, 10, 2 e 4 vezes, respectivamente (Fig. 4C). Diagnóstico por imagem adicional

com TEM poderia verter mais luz sobre se as proteínas expostas a LPS rearranjaram sua conformação em fibrilos similares a amilóide ou em outros agregados visíveis. Os dados de incremento da fluorescência de ThT mostram que LPS atua como um desnaturador que converte uma proteína inicialmente globular em um polipeptídio similar a amilóide. Já se demonstrou previamente que lisozima pode ligar-se a LPS purificado e a adjuvante de Freund completo, compreendendo fragmentos de parede celular bacteriana com LPS, acompanhado de alterações estruturais na proteína. Adicionalmente, Morrison & Cochrane[12] mostraram que LPS pode ativar potencialmente fator XII, que corrobora nossa visão de que LPS atua como um desnaturador de proteína que, por sua vez, introduz propriedades ativadoras de fator XII (ver também Fig. 2E, F). Nossos resultados revelam agora que a ligação de LPS induz conformação de estrutura β cruzada e que ativação de fator XII com LPS é mediada por proteína com conformação de estrutura β cruzada, proporcionando uma explicação para estas observações previamente reportadas.

Discussão: Proteínas ricas em estrutura β cruzada, similares a LPS, induzem regulação-para-cima de TNFα em monócitos, e LPS induz conformação de estrutura β cruzada amilóide em lisozima

Estimulação de monócitos U937 com proteínas que compreendem conformação de estrutura β cruzada como parte de seu dobramento terciário/quaternário resulta em expressão de RNA de TNFα, similar à regulação-para-cima de RNA de TNFα por LPS. A observação de que hemoglobina de controle efetivamente influenciou níveis de RNA de TNFα apenas até certo ponto indica que a presença de conformação de estrutura β cruzada é um fator importante para a regulação-para-cima observada. Como nós mostramos aqui que LPS atua como um agente indutor de conformação de estrutura β cruzada, nós concluímos que a ativação de células, incluindo células do sistema imunológico, por LPS é induzida, pelo

menos em parte, por uma proteína alterada conformacionalmente compreendendo conformação de estrutura β cruzada. Assim, LPS atua como uma superfície desnaturadora ou adjuvante que induz formação de conformação de estrutura β cruzada em uma proteína que está presente na superfície celular ou no ambiente celular, similar à nossa observação de que LPS introduz conformação de estrutura β cruzada similar a amilóide na lisozima. A conformação formada de estrutura β cruzada é então um estimulador da resposta imune. Nossos resultados, hipóteses e conclusões são corroborados pelas observações na literatura de que a atividade endotóxica de LPS é incrementada na presença de albumina ou hemoglobina. Além disso, LPS induz formação de lâminas β em albumina, um elemento estrutural que está ausente no dobramento da albumina nativa e que sugere que a conformação de estrutura β cruzada seja formada[19]. Respostas similares de células microgliais no sentido de LPS e Aβ agregados são reportadas[20]. Nossas observações fornecem um apoio lógico para estas e outras observações adicionais recentes de que o receptor de LPS CD 14 está envolvido na fagocitose de Aβ [21]-[22]. À luz de nossos resultados, talvez CD14 interaja com uma proteína desnaturada associada com LPS e com Aβ via uma conformação de proteína não-nativa similar nos ligantes. Isto poderia sugerir que CD 14 é um possível membro da classe de proteínas de ligação de estrutura β cruzada similar a amilóide [3]. Para uma pessoa versada na arte, estas observações proporcionam o meio de realizar ensaios celulares in vitro adicionais que corroboram o papel da conformação de estrutura β cruzada sobre a ativação do sistema imunológico. Uma pessoa versada na arte pode agora selecionar os ensaios celulares apropriados, para reunir compreensão sobre o tipo de resposta imune induzida por conformação de estrutura β cruzada. Por exemplo, é possível testar a potência de ativar o sistema imunológico adaptativo e/ou inato do hospedeiro e induzir uma resposta imune celular e/ou humoral. Mesmo num nivel mais detalhado, o tipo de

resposta, i.e. um tipo de resposta de auxiliar 1 de célula T que resulta na elicitação de imunoglobulinas da subclasse IgG2a, ou um tipo de resposta de tipo 2 de auxiliar de célula T resultando primariamente na elicitação de IgG1, ou um tipo de resposta regulador de células T. Experimentos de bloqueio usando compostos de ligação de estrutura β cruzada e proteínas, p. ex. ThT, vermelho Congo, Tioflavina S (ThS), tPA e fragmentos dos mesmos, fator XII e fragmentos dos mesmos, hibridomas anti-estrutura β cruzada, podem proporcionar evidência adicional para o papel do elemento de estrutura β cruzada na ativação do sistema imunológico. Adicionalmente, é possível usar ensaios celulares para estudar qual aspecto da conformação de estrutura β cruzada apresenta a natureza imunogênica, i.e. oligômeros solúveis, fibrilos, ou outros aspectos. Também é possível usar ensaios imunológicos celulares para selecionar adjuvantes estabelecidos e novos quanto a sua capacidade de induzir uma resposta imune, mediada pela conformação de estrutura β cruzada, no próprio adjuvante ou induzido pelos adjuvantes (ver Fig. 2). Novamente, pré-tratamento de misturas de adjuvantes/proteína com proteínas ou compostos de ligação de estrutura β cruzada potencialmente neutralizadores pode prevenir uma resposta imune. Compreensão adicional sobre o papel da capacidade desnaturadora do LPS na indução de uma resposta imune pode provir de estudos comparativos em que variantes endotóxicas ativas e inativas de LPS são testadas quanto a sua capacidade de introduzir conformação de estrutura β cruzada em proteínas e quanto aos efeitos sobre o sistema imunológico. Exemplos de LPS endotóxico inativo são LPS de Rhodobacter capsulatus e lipídeo A tetra- ou penta-acilado [19]. Adicionalmente, é possível estudar o efeito de Polymyxin B, que inibe a atividade endotóxica de LPS, sobre as propriedades indutoras de estrutura β cruzada de LPS. Alternativamente, Polimixina B pode atuar diretamente sobre proteínas contendo estrutura β cruzada. Nesse caso, adiciona-se polimixina B à lista de compostos de ligação de estrutura β cruzada.

Nossos resultados indicam que a os efeitos potencializadores de LPS, quando é usado como um adjuvante em experimentos de imunização, são atribuídos, pelo menos em parte, à introdução de conformação de estrutura β cruzada imunogênica no antígeno administrado, em um proteína co-administrada ou em endógena ou conjunto de proteínas endógenas. Prediz-se agora que a determinação da(s) proteína(s) endógena(s) que formam preferivelmente a conformação de estrutura β cruzada quando exposta a LPS proporcionará uma ferramenta para o projeto de regimes de imunização mais seguros. Prediz-se que LPS pode ser reduzido ou omitido quando estas proteínas endógenas ou conjunto de proteínas desnaturadas, em que a conformação de estrutura β cruzada é introduzida, é usado diretamente como o adjuvante. Para uma pessoa versada na arte está claro que estes resultados e conclusões também podem ser obtidos com outros adjuvantes, incluindo, mas sem limitação CpG ou Alume.

Exemplo de Resultados 5

Imunização de camundongos na ausência de adjuvante com polipeptídios compreendendo conformação de estrutura β cruzada.

Preparação de antígenos com conformação de estrutura β cruzada

Os dados no Exemplo 2 e Exemplo 4 mostram que vários adjuvantes usados em regimes de vacinação animal e humana induzem a conformação de estrutura β cruzada em proteínas. A presença de conformação de estrutura β cruzada em vários terapêuticos à base de proteína induz imunogenicidade. Isto sugere que a imunogenicidade pode ser atribuída, pelo menos em parte, à estrutura β cruzada compreendendo proteínas ou polipeptídios. Isto nos instou a preparar ensaios de imunização com compostos ricos em conformação de estrutura β cruzada, sem adição de um adjuvante. Com base nos resultados descritos acima prediz-se que a presença da 0conformação de estrutura β cruzada imunogênica é essencial e até mesmo suficiente para induzir uma resposta imune, como observado, por exemplo,

com vários farmacêuticos à base de proteína que não contêm adjuvante. Efetivamente, obtivemos titulações superiores de anticorpos quando nós usamos OVA de frango com conformação de estrutura β cruzada (dOVA) em comparação com OVA sem conformação de estrutura β cruzada (nOVA) em experimentos de imunização (Fig. 5L). Também se obteve titulações com OVA sem conformação de estrutura β cruzada. Como a formação de estrutura β cruzada em OVA pode ocorrer facilmente, prediz-se que a geração de anticorpos após imunização com nOVA também é mediada com moléculas com conformação de estrutura β cruzada. Neste caso, a conformação de estrutura β cruzada é induzida durante ou após a injeção subcutânea. Estes experimentos estabelecem que a presença da conformação de estrutura β cruzada em uma proteína pode induzir imunogenicidade que pode ser nociva. No caso de um terapêutico de proteína, a remoção ou diminuição do teor de estrutura β cruzada do terapêutico auxiliará a se obter uma droga mais segura.

Obteve-se OVA similar a amilóide por meio de desnaturação com calor a 85°C (Fig. 5A, B, I, K). A presença da conformação de estrutura β cruzada foi estabelecida com fluorescência de ThT e ensaios de ativação de Plg e por meio de diagnóstico por imagem TEM. As estruturas fibrilares com comprimento de pelo menos até 2 μm, como observado nas imagens TEM, provavelmente não são as únicas montagens de OVA com a presença de conformação de estrutura β cruzada, como se conclui da observação de que filtração através de um filtro de 0,2 μm não reduz o incremento de fluorescência de ThT. Uma pessoa versada na arte pode realizar experimentos similares com soluções de consumo de albumina de soro murino, glucagônio humano e soluções de consumo de Etanercept com a conformação de estrutura β cruzada, como aquelas descritas abaixo (Fig. 5).

O dobramento de proteína similar a amilóide foi induzido na albumina por meio de desnaturação com calor a 85°C e por meio de redução e alquilação de ligações dissulfeto (Fig. 5A-D). Nós também observamos que

albumina nativa incrementou fluorescência de ThT até certo grau, mas isto não foi refletido por meio de estimulação de ativação de tPA. Embora albumina desnaturada com calor e albumina alquilada acentuem fluorescência de ThT em grau similar, elas diferem quanto ao potencial ativador de tPA. Isto sugere que tPA e ThT interagem com aspectos distintos da conformação de estrutura β cruzada. Nós observamos previamente que vermelho Congo, outro corante específico para amilóide, pode competir eficientemente pela ligação de tPA a agregados similares a amilóide em ELISAs, enquanto que ThT não inibiu completamente ligação de tPA (pedido de patente WO 2004/004698).

Conformação de estrutura β cruzada similar a amilóide foi induzida em glucagônio por meio de desnaturação com calor a 37°C a pH baixo em tamponador de HCl (Fig. 5E, F, J). Desta maneira, obteve-se um potente ativador de tPA que incrementou fluorescência de ThT em grande parte. Adicionalmente, formam-se fibrilos longos e não-ramificados dobrados, como visualizado em imagens TEM (Fig. 5J). É digno de nota que, em concentrações elevadas de glucagônio, glucagônio nativo também apresenta algum potencial de ativação de tPA, indicativo da presença de uma determinada quantidade de proteína rica em conformação de estrutura β cruzada.

Etanercept alquilado não ativa tPA, enquanto que Etanercept desnaturado com calor apresenta potencial similar ativador de tPA como γ-globulinas amilóides (Fig. 5G). Após desnaturação com calor, Etanercept também induz eficientemente fluorescência de ThT incrementada (Fig. 5H). Etanercept nativo induz tanto um pouco de ativação de tPA e proporcionou algum incremento de fluorescência de ThT.

Para imunizações de camundongos Balb/c, usou-se nOVA, dOVA e nOVA com adjuvante de Freund completo. É possível realizar análises e imunizações similares com n-MSA, MSA desnaturado com calor,

alquila-MSA, glucagônio nativo, glucagônio desnaturado com calor, Etanercept nativo, Etanercept desnaturado, β_2GPI nativo, alquila-β_2GPI, β_2GPI desnaturado, β2GPI recombinante, β_2GPI dimérico[23], β_2GPI juntamente com CpG, B2GPI juntamente com cardiolipina e β_2GPI juntamente com DXS500k. Adicionalmente, a análise das diversas titulações pode apontar para protocolos de imunização aperfeiçoados com relação à dose, número de injeções, via de injeção, pré-tratamento do antígeno para introduzir conformação de estrutura β cruzada mais imunogênica.

Por exemplo, 25 μg de Etanercept, Etanercept desnaturado com calor, glucagônio e glucagônio desnaturado com calor/ácido serão administrados subcutaneamente sem adjuvante no dia 0 e no dia 18. Sangue para determinações de titulação será coletado da veia safena no dia -3, dia 18 e dia 25. β_2GPI nativa (15 μg), β2GPI reduzida/alquilada (15 μg) e β_2GPI nativa (15 μg) com 1,35 μg de cardiolipina serão administradas intravenosamente no dia 0, dia 4, dia 14 e dia 18. A β_2GPI e cardiolipina serão misturadas e incubadas a 400 μg ml^{-1} e concentrações finais de 25 μM. Sangue será coletado no dia -3, dia 9, dia 25. Inicialmente, titulações serão determinadas com ELISA's usando placas revestidas com as proteínas nativas.

Concluímos, de nossas análises, que β_2GPI com cardiolipina, dOVA, alquila-MSA, glucagônio desnaturado com calor/ácido e Etanercept desnaturado com calor compreendem a conformação de estrutura β cruzada. A presença da conformação de estrutura β cruzada pode ser estabelecida adicionalmente por meio de análises de espectropolarimetria de dicroísmo circular, experimentos de difração de fibras de raios-X, espectroscopia infravermelha de transformação de Fourier, birrefringência/fluorescência do vermelho Congo, ligação de tPA, ativação de fator XII e ligação, e mais.

Avaliação da imunogenicidade de compostos com conformação de estrutura β cruzada com um ensaio de 'sangue integral'

Uma maneira de avaliar se uma proteína com conformação de

estrutura β cruzada ativa células do sistema imunológico é por meio do uso de um ensaio de 'sangue integral'. Para este fim, no dia 1 adiciona-se sangue-EDTA humano recentemente coletado numa relação a 1:1 com meio RPMI-1640 (tamponado com HEPES, com L-glutamina, Gibco, Invitrogen, Breda, Países Baixos), que é pré-aquecido a 37°C. Subseqüentemente é possível adicionar proteínas compreendendo conformação de estrutura β cruzada. De preferência, inclui-se um controle positivo, de preferência, LPS. Um inibidor que pode ser usado para LPS é Polimixina B, concentração final de 5 $\mu g\ ml^{-1}$. Polipeptídios convencionais ricos em conformação de estrutura β cruzada que podem ser testados são Aβ, γ-globulinas amilóides, proteínas glicosadas, FP 13, OVA desnaturada com calor e outros. Controles negativos são γ-globulinas nativas, albumina nativa, Hb nativa, Aβ ou FP13 recentemente dissolvida, OVA nativa. Como um controle, todas as amostras de proteína podem ser testadas na ausência ou presença de 5 $\mu g\ ml^{-1}$ de Polimixina B para excluir efeitos observados devido a contaminações com endotoxina. Adicionalmente, proteínas nativas, sozinhas ou pré-expostas a adjuvantes desnaturadores, p. ex. LPS, DXS500K, caulim e CpG, ou a novos adjuvantes, podem ser testadas quanto à atividade imunogênica. O sangue e o meio deveriam ser misturados cuidadosamente e incubados de um dia para o outro em um incubador com CO_2 com tampas que permitem a entrada de CO_2. No dia 2, meio será recolhido após centrifugação durante 10 minutos a 1.000*g, à temperatura ambiente. O pellet de células será armazenado congelado. O meio será centrifugado novamente durante 20' a 2.000*g, à temperatura ambiente. Sobrenadante será analisado empregando-se ELISAs para concentrações de marcadores de uma resposta imune, p. ex. fator-α de necrose de tecido. Quando controles positivos e negativos são estabelecida e também uma curva de titulação confiável, é possível testar qualquer solução quanto à carga de estrutura β cruzada com relação a concentrações de marcadores para imunogenicidade. Adicionalmente, é possível testar inibidores putativos da

resposta imune. Por exemplo, domínios de dedos, ThT, vermelho Congo, sRAGE e tPA podem prevenir uma resposta imune quando da adição a soluções terapêuticas de proteína compreendendo agregados.

Imunogenicidade de proteínas com estrutura β cruzada

A presente invenção divulga que proteínas contendo conformação de estrutura β cruzada são imunogênicas. Para uma pessoa versada na arte está evidente agora que é possível obter evidência adicional que corrobora o papel proposto para a conformação de estrutura β cruzada na imunogenicidade. Por exemplo, a imunogenicidade de proteínas, incluindo OVA, β_2GPI e/ou terapêuticos à base de proteína, como fator α de necrose de tumor, testa-se glucagônio ou Etanercept. De preferência, a imunogenicidade do estado nativo destas proteínas é comparado com um estado em que se introduziu a conformação de estrutura β cruzada. De preferência, a conformação de estrutura β cruzada é induzida por meio de aquecimento, oxidação, glicosamento ou tratamento com um adjuvante, como oligonucleotídeos de CpG, LPS ou cardiolipina. O conteúdo de conformação de estrutura β cruzada é, de preferência, medida por meio de ThT, vermelho Congo, TEM, cromatografia de exclusão de tamanho, atividade de ativação de tPA, e ou ligação de qualquer outra proteína de ligação de estrutura β cruzada listada nas Tabelas 1-3. A imunogenicidade de referida proteína é testadas, de preferência, *in vitro* e *in vivo*. Para uma pessoa versada na arte, vários ensaios *in vitro* são preferíveis para determinar a imunogenicidade de referida proteína.

De preferência, a ativação de células apresentando antígeno (APC, *antigen presenting cells*), de preferência, células dendríticas (DC) é testada após tratamento com referida proteína compreendendo estrutura β cruzada ou nativa. De preferência, isto é realizada de acordo com protocolos estabelecidos. Ativação de células apresentando antígeno pode ser determinada por meio de análise com Separador de Células Ativadas com

Fluorescência [FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*)]. De preferência, os níveis de assim-chamadas células co-estimuladoras, como B7,1, B7,2, MHC classe II, CD40, CD80, CD86 são determinadas sobre, de preferência, células CD11c positivas. Alternativamente, a ativação de NF-κB e/ou expressão de citocinas pode ser usada como indicadores de ativação de células envolvidos na imunogenicidade, como APC e DC.

De preferência, as citocinas a seguir deveriam ser quantificadas: TNFα, IL-I, IL-2, IL-6, ou IFNγ ou outras. De preferência, os níveis de citocinas poderiam ser quantificados por meio de ELISA. Alternativamente, é possível quantificar os níveis de mRNA. Para uma pessoa versada na arte é evidente que a função de APC e DC também pode ser testada.

De preferência, pode-se testar a apresentação cruzada de antígeno. De preferência, isto pode ser obtido com o uso de OVA, em sua conformação nativa e em conformações com conformação de estrutura β cruzada, como proteína-modelo. A capacidade de DC ou APC em ativar células T restritas a MHC de classe II ou restritas a MHC de classe I deveria ser analisada. Para uma pessoa versada na arte isto pode ser realizado de acordo com protocolos estabelecidos [43,44]. O papel de proteínas com conformação de estrutura β cruzada na ativação de APC e seu papel na apresentação de antígeno pode ser tratado adicionalmente com estes procedimentos experimentais previamente indicados usando-se compostos de ligação de estrutura β cruzada em ensaios de competição. De preferência, a ativação de DC [células dendríticas] e apresentação de antígeno funcional são testadas na presença ou ausência de ThT, vermelho Congo, tPA, ou qualquer outra proteína de ligação de estrutura β cruzada, incluindo aquelas listadas na Tabela 1-3 ou um equivalente funcional da mesmas. A imunogenicidade de proteínas com conformação de estrutura β cruzada é demonstrada adicionalmente *in vivo*. Por exemplo, testa-se a indução de anticorpos e a

indução e atividade de linfócitos T citotóxicos (CTL, *cytotoxic T lymphocyte*) quando da imunização de proteínas, incluindo OVA, β_2GPI e/ou terapêuticos à base de proteína, como fator α de necrose de tumor, glucagônio ou Etanercept. De preferência, a imunogenicidade do estado nativo destas proteínas é em comparação com um estado em que a conformação de estrutura β cruzada foi introduzida. De preferência, a conformação de estrutura β cruzada é induzida por meio de aquecimento, oxidação, glicosamento ou tratamento com um adjuvante, como oligonucleotídeos de CpG, LPS ou cardiolipina. O conteúdo da conformação de estrutura β cruzada é, de preferência, medido por meio de ThT, vermelho Congo, TEM, cromatografia de exclusão de tamanho, atividade de ativação de tPA, e ou ligação de qualquer outra proteína de ligação de estrutura β cruzada listada nas Tabelas 1-3. De preferência, as titulações de anticorpos são medidas após imunização com ELISA e mede-se a atividade de CTL usando ensaio de liberação de ^{51}Cr. Alternativamente, é possível medir a liberação de citocinas, incluindo IL-2. Para uma pessoa versada na arte está claro agora que, para cada proteína compreendendo conformação de estrutura β cruzada, o efeito sobre a imunogenicidade pode ser testado como tal. Estes experimentos propostos elucidarão adicionalmente o papel da conformação de estrutura β cruzada na imunogenicidade.

Imunogenicidade de adjuvantes

A presente invenção revela que adjuvantes induzem conformação de estrutura β cruzada. Para uma pessoa versada na arte está agora evidente que é possível obter evidência adicional que corrobora o papel proposto para a conformação de estrutura β cruzada na imunogenicidade de adjuvantes. Por exemplo, é possível testar adjuvantes adicionais e novos. Por exemplo, enterotoxina instável ao calor de Escherichia coli (EtxB), oligodesoxinucleotídeos relacionados com CpG diferentes e/ou variantes de LPS, ou moléculas relacionadas com LPS, como lipídeo de monofosforila A

(MPL). Esta capacidade indutora de estrutura β cruzada é medida usando-se uma proteína nativa ou conjunto de proteínas, de preferência, OVA, lisozima, endostatina, y- globulinas, albumina, plasma ou uma proteína derivada de plasma ou conjunto de proteínas. O teor de estrutura β cruzada é, de preferência, medido por meio de ThT, vermelho Congo, TEM, cromatografia de exclusão de tamanho, atividade de ativação de tPA, e ou ligação de qualquer outra proteína de ligação de estrutura β cruzada listada nas Tabelas 1-3. De preferência, a capacidade de indução de estrutura β cruzada destes compostos é comparada com a imunogenicidade *in vitro* e *in vivo* usando-se os ensaios descritos acima. Para uma pessoa versada na arte é possível agora identificar a proteína ou conjunto de proteínas que se redobra numa conformação com estrutura β cruzada quando exposto a um adjuvante. Por exemplo, um adjuvante, de preferência, CpG, LPS ou um equivalente funcional do mesmo é imobilizado e usado subseqüentemente como adjuvante. Em seguida, recolhe-se o adjuvante imobilizado e, após lavagem extensiva, isola-se as proteínas ligadas com conformação de estrutura β cruzada. Se necessário, as proteínas podem ser purificadas adicionalmente por meio de procedimentos convencionais, de preferência, cromatografia de exclusão de tamanho. A identidade das proteínas é revelada, de preferência, por meio de espectrometria de massa, i.e. proteômicos à base de espectrometria de massa.

O papel da conformação de estrutura β cruzada na ação de adjuvantes é tratado adicionalmente com estes procedimentos experimentais previamente indicados usando-se composto de ligação de estrutura β cruzadas em ensaios de competição. De preferência, testa-se ativação de DC e apresentação de antígeno funcional, na presença ou ausência de ThT, vermelho Congo, tPA, ou qualquer outra proteína de ligação de estrutura β cruzada, incluindo aquelas listadas na Tabela 1-3 ou um equivalente funcional das mesmas.

Estes experimentos elucidam adicionalmente o papel da conformação de estrutura β cruzada na imunogenicidade. Além disso, para

uma pessoa versada na arte é exeqüível selecionar proteínas que se redobram em conformação de estrutura β cruzada e se tornam imunogênicas quando da ligação a um adjuvante. Referidas proteínas também podem ser usadas como adjuvantes propriamente ditos. Finalmente, para uma pessoa versada na arte é possível selecionar as proteínas compreendendo estrutura β cruzada ótima para imunização e geração de uma resposta imune com base na ligação de compostos de ligação de estrutura β cruzada, incluindo aqueles listados na Tabela 1-3, a estas proteínas compreendendo estrutura β cruzada.

Imunização com proteínas compreendendo conformação de estrutura β cruzada promovem proteção contra exposição a patógeno

A presente invenção revela que proteínas contendo conformação de estrutura β cruzada são imunogênicas. Para uma pessoa versada na arte é evidente agora que a imunização com proteínas compreendendo conformação de estrutura β cruzada induz ou acentua a proteção contra patógenos. Por exemplo, proteínas patogênicas que são bons componentes candidatos para desenvolvimento de vacina são combinadas com proteínas compreendendo conformação de estrutura β cruzada. Referidas proteínas patogênicas incluem, embora sem limitação, proteínas envolvidas na virulência de bactérias, como proteína similar a M, e proteínas de ligação de fibronectina de espécies de Streptococcus, ou proteínas de opacidade (Opa) de Neisseria meningitidis. Alternativamente, referidas proteínas são de origem viral, como a proteína de hemaglutinina (HA) e/ou neuraminidase (NA) do vírus de influenza. Referidas proteínas patogênicas que elicitam uma resposta imune protetora são combinadas com uma proteína compreendendo uma quantidade efetiva de proteína compreendendo conformação de estrutura β cruzada e injetadas em um animal, de preferência, um camundongo. Alternativamente, as proteínas patogênicas que induzem uma resposta imune protetora são tratadas de tal forma que se redobram em uma conformação compreendendo estrutura β cruzada. Referidos tratamentos consistem, de

preferência, de aquecimento, oxidação, e/ou sonicação ou qualquer outro tratamento que induz conformação de estrutura β cruzada. O teor de conformação de estrutura β cruzada é, de preferência, medido por meio de ThT, vermelho Congo, TEM, cromatografia de exclusão de tamanho, atividade de ativação de tPA, e ou ligação de qualquer outra proteína de ligação de estrutura β cruzada listada nas Tabelas 1-3. Após imunização a pessoa versada na arte será capaz de determinar facilmente a resposta imune com o auxílio de protocolos estabelecidos para a determinação da titulação de anticorpos e indução de uma resposta CTL. O efeito protetor da imunização, com proteínas compreendendo estrutura β cruzada com uma dada proteína patogênica ou conjunto de proteínas patogênicas que se espera induzir uma resposta imune protetora é analisadas expondo-se camundongos imunizados com o patógeno de se derivam as proteínas patogênicas e comparando a sobrevida ou gravidade de infecção com camundongos que não são imunizados. Por exemplo, camundongos podem ser infectados com Streptococcus aqui após imunização com proteínas de ligação de fibronectina (FNZ e/ou SFS) e/ou EAG (α2-macroglobulina, albumina, e proteína de ligação de IgG) tratado para induzir conformação de estrutura β cruzada ou combinado com uma proteína compreendendo uma conformação de estrutura β cruzada. Outro exemplo é obtido usando-se imunização com proteínas meningocócicas recombinantes OpaB e OpaJ ou outras vesículas de membrana contendo proteínas PorA e PorB tratadas de forma a induzir conformação de estrutura β cruzada ou imunizadas com proteínas compreendendo conformação de estrutura β cruzada. Usando protocolos estabelecidos os camundongos são expostos a Neisseria meningitis. O efeito da imunização é analisado mediante determinação da resposta de anticorpos. Em outro adicional, camundongos são imunizados com baculovírus recombinante produziram vacinas NA e NA tratadas de forma a induzir conformação de estrutura β cruzada ou usada em combinação com uma

proteína ou conjunto de proteínas compreendendo conformação de estrutura β cruzada. Subseqüentemente os camundongos são expostos a vírus de influenza para determinar o efeito protetor da imunização com estrutura β cruzada compreendendo proteínas por exemplo, de acordo com protocolos estabelecidos.

A proteína ideal ou conjunto de proteínas ideal a ser usado em combinação, sendo que a proteína patogênica ou conjunto de proteínas é obtida, de preferência, a partir da análise de proteínas que estão implicadas na resposta de adjuvantes, como CpG ou LPS.

Considerados em conjunto, os resultados dos experimentos ilustram adicionalmente que proteínas compreendendo estrutura β cruzada são componentes valiosos de vacinas.

Exemplo 6

A cada vez usa-se duas doses de uma vacina de antígeno de superfície de influenza inativado comercialmente obtenível (Agrippal®) para determinar a dose relevante de estruturas β cruzadas.

Uma dose é usada "tal qual" (A) e a outra (B) é desnaturada com um ou mais tratamentos de aquecimento, congelamento, oxidação, glicosamento PEGilação, sulfatação, exposição a um caotrófico, de preferência, o caotrófico é uréia ou guanidínio-HCl, fosforilação, proteólise parcial, lise química, de preferência, com HCl ou brometo de cianogênio, sonicação, dissolução in soluções orgânicas, de preferência, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol e ácido trifluoroacético, ou uma combinação dos mesmos.

Prepara-se as combinações a seguir.

A %	B %
50	50
60	40
70	30
80	20
90	10
100	0
100	10
100	20
100	30
100	40
100	50

Camundongos são imunizados com combinações de AB como descrito acima, ou com um placebo.

Após três semanas, camundongos recebem reforço com a mesma composição.

Após mais três semanas os camundongos são expostos ao patógeno.

Mede-se a resposta imune.

Exemplo 7

Proteínas compreendendo estrutura β cruzada também são usadas como componente para aplicações médicas no tratamento e/ou profilaxia de câncer, de preferência, mas sem limitação, câncer associado com infecção viral. Referido câncer é, de preferência, associado com infecção por papilomavírus humano (HPV).

Uma resposta imune é induzida, por exemplo, para neutralizar, tratar e/ou pelo menos prevenir parcialmente a ocorrência e/ou desenvolvimento de câncer, de preferência, cânceres cervical, anal, vulvar, vaginal, e/ou peniano e/ou verrugas genitais associadas com infecção por HPV, de preferência, câncer associado com HPV16 e/ou HPV18 e/ou HPV6 e/ou HPV11 antígeno associado com tumor. De preferência, objetiva-se papiloma vírus humano (HPV) de proteína de tipo E6 e/ou E7. A indução de estrutura β cruzada em referido antígeno, de preferência, um antígeno E6 e/ou E7, ou combinação de referido antígeno com um componente de proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, resulta em um composto e/ou composição que é particularmente vantajosa para elicitar uma resposta imune específica para antígeno. De preferência, elicita-se uma resposta específica para E6 e/ou E7. De preferência, produz-se um composto e/ou composição que é capaz de proteger camundongos contra exposição a tumores expressando referido antígeno, de preferência, E6 e/ou E7. Da forma mais preferível, produz-se um composto e/ou composição é que é capaz de

proteger, pelo menos em parte, humanos de desenvolver câncer e/ou verrugas genitais causadas por infecção com HPV. Usa-se quantidade terapeuticamente efetivas, de preferência, entre 1 e 100 μg de antígeno de tumor, em combinação com quantidades terapeuticamente efetivas, de preferência, de 1 a 100 μg, de um componente de proteína compreendendo estrutura β cruzada. Referido componente de proteína compreendendo estrutura β cruzada é, de preferência, ovalbumina. Ainda mais preferivelmente, referido componente de proteína compreendendo estrutura β cruzada é um antígeno associado com tumor. Conseqüentemente, estruturas β cruzadas são induzidas, de preferência, em um antígeno associado com tumor, que torna uma composição compreendendo referido antígeno associado com tumor mais imunogênica. Desejando-se tratamento pelo menos parcial e/ou profilaxia de Cânceres associados com HPV, sendo que referido antígeno associado com tumor é, de preferência, E6 e/ou E7.

Camundongos são imunizados, de preferência, duas vezes por via intramuscular, de preferência, com um intervalo de duas a três semanas e, de preferência, expostos com células de tumor, de preferência, 5 x 10^4 células de tumor TC-I e, de preferência, o crescimento do tumor é medido e monitorado ao longo do tempo. Sujeitos humanos são imunizados, de preferência, duas vezes ou mais vezes da mesma maneira, e, de preferência, monitora-se a eficácia por meio de determinação do número, início e/ou crescimento de câncer e/ou desenvolvimento de verrugas entre indivíduos imunizados e indivíduos não-imunizados.

Exemplo 8

Proteínas compreendendo estrutura β cruzada também são usadas como componente para aplicação médica para induzir imunogenicidade na profilaxia e/ou tratamento de outras aberrações, de preferência, mas sem limitação aterosclerose ou amiloidoses, de preferência, doença de Alzheimer, e também para induzir respostas imunes contra outros

auto-antígenos, abrangendo até mesmo, p. ex., LHRH para imunocastração de javalis, ou para uso na prevenção da doença enxerto versus hospedeiro (GvH) e/ou rejeições de transplante.

Por exemplo, para tratar aterosclerose objetiva-se, de preferência, LDL oxidado ou proteínas glicosadas ou epítopos específicos das mesmas. De preferência, usa-se LDL oxidado e/ou proteínas glicosadas, compreendendo estrutura β cruzada, como componente de uma tal aplicação médica para induzir uma resposta imune específica para proteína ox-LDL- e/ou glicosada. Usa-se quantidades terapeuticamente efetivas, de preferência, entre 1 e 100 μg de proteína ox-LDL e/ou glicada, em combinação com quantidades terapeuticamente efetivas, de preferência, de 1 a 100 μg, de um componente de proteína compreendendo estrutura β cruzada, sendo que referido componente de proteína é, de preferência, oxLDL e/ou uma proteína glicosada.

Para tratar amiloidose ou qualquer doença que causa mau dobramento de proteína, de preferência, doença de Alzheimer, de preferência, usa-se uma proteína ou fragmento de proteína combinado com uma amiloidose particular como imunógeno para induzir uma resposta imune específica contra referida proteína ou fragmento de proteína. De preferência, usa-se quantidades terapeuticamente efetivas, de preferência, entre 1 e 100 μg, de referida proteína ou fragmento de proteína em combinação com quantidades terapeuticamente efetivas, de preferência, de 1 a 100 μg, de um componente de proteína compreendendo estrutura β cruzada, sendo que referido componente de proteína é, de preferência, sendo que referida proteína ou componente de proteína.

Para elicitar uma resposta imune contra um auto-antígeno, compreendendo até mesmo, por exemplo, para imunocastração de javalis, ou para uso na prevenção da doença de enxerto versus hospedeiro (GvH) e/ou rejeições de transplante, de preferência, usa-se um auto-antígeno como

imunógeno, de preferência, com um componente de proteína compreendendo estrutura β cruzada. De preferência, referido componente de proteína compreendendo estrutura β cruzada é referido auto-antígeno em que estruturas β cruzadas se induziu. De preferência, usa-se quantidades terapeuticamente efetivas, de preferência, entre 1 e 100 μg, de referida auto-proteína em combinação com quantidades terapeuticamente efetivas, de preferência, de 1 a 100 μg, de um componente de proteína compreendendo estrutura β cruzada, sendo que referido componente de proteína compreendendo estrutura β cruzada é, de preferência, referida auto-proteína em que estruturas β cruzadas foram induzidas. Uma resposta imune elicitada é determinada, de preferência, por meio de um método imunológico, por exemplo, por meio de ELISA ou determinação da resposta CTL. A eficácia de referido tratamento é determinada, por exemplo, por meio de monitoração do desenvolvimento específico das aberrações objetivadas.

Exemplo 9

Imunogenicidade de vacinas meningocócicas de proteína de membrana exterior de sorogrupo B adjuvantadas com estrutura beta cruzada

Imunização de camundongos com uma vacina de PprA trivalente contra Neisseria meningitidis

Objetivo

Determinar se antígeno de PorA com conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide elicita titulações de anticorpos. Analisou-se soros de camundongo para determinar titulações de anticorpos totais e titulações de anticorpos bactericidas contra PorA a partir de três diferentes cepas de Neisseria meningitidis, após duas vacinações com PorA adjuvantada com alume, PorA nativa, placebo (tamponador para injeção), ou duas preparações de PorA com, respectivamente, PorA com dobramento incorreto a 25 % ou 75 % com propriedades similares a amilóide (adjuvantado com estrutura beta cruzada).

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação de vacinas

Solução de antígeno de PorA foi obtida do Dr. G. Kersten e Dr. G. van den Dobbelsteen do *The Netherlands Vaccine Institute* (NVI, Bilthoven, Países Baixos). PorA em vesículas de membrana exterior (OMV, *outer membrane vesicles*) bacterianas foi preparada substancialmente como descrito ([1]). Concentração de proteína na solução de OMV foi determinada usando-se técnicas convencionais. O teor de PorA foi determinado por meio de análise densitométrica de um gel de poliacrilamida manchado com Coomassie após eletroforese em gel da preparação de PorA, e foi de 400 μg/ml. O tamponador de PorA consiste de 10 mM de Tris, 3 % de sacarose, pH 7,4. Para fins de preparação de vacina, preparou-se 10x tamponador de PorA (30 % peso/peso de sucrose, 100 mM de Tris pH 7,4, esterilizado através de filtro de 0,45 μm). As OMV usadas para os estudos foram obtidas de uma cepa trivalente expressando três subtipos séricos de PorA, i.e. P1,5-2,10, P1,12-1,13 e P1,7-2,4. Alume adjuvante (Adju-Phos, Brenntag, 2 % de $AlPO_4$, 0,44 % de Al^{3+}, batelada 8981) foi fornecido pela NVI, e também tamponador de PorA simples. Estas soluções de consumo estéreis foram armazenadas a 4°C.

Introdução de conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide em proteínas

Para a preparação de PorA com dobramento incorreto similar a amilóide usou-se os três métodos a seguir.

Método do dobramento incorreto I: desnaturação com calor por meio de ciclização térmica

Um mg de OVA de frango purificada (Sigma; número de catálogo A5503) em 875 μl de tamponador de PorA e 125 μl de solução de consumo de PorA ([PorA] = 50 μg/ml; [OVA] = 1 mg/ml) foi aquecido durante cinco ciclos em recipientes de PCR em um ciclizador térmico PTC-

200 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, E.U.A.). Em cada ciclo, solução de proteína foi aquecida de 30°C a 85°C a uma taxa de 5°C/min. Soluções de proteína desnaturadas com calor foram armazenadas a -80°C.

Método do dobramento incorreto II: acoplamento de PorA a ovalbumina

Para acoplamento de PorA a OVA usando N-etil-N'-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, estoque é de 400 mM) e N-hidroxisuccinimida (NHS, estoque é de 100 mM), compostos e proteína foram misturados em tamponador MES (0,02 % (m/v) NaN_3, 100 mM de MES, 150 mM de NaCl, pH 4,7; diluído de um estoque de 10x tamponador de MES). De maneira resumida, adicionou-se 200 µl de 10x tamponador de MES a 250 µl de estoque de EDC e 350 µl de H_2O (solução 1). OVA (0,2 mg) foi dissolvida em 100 µl de solução de consumo de PorA. Oitenta µl de solução 1 foram adicionados a esta solução de PorA/OVA; então adicionou-se 20 µl das soluções de consumo de NHS. As misturas foram incubadas durante 2 h à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento, e subseqüentemente adicionou-se 800 µl de PBS antes de diálise extensiva contra PBS a 4°C ([PorA] = 40 µg/ml; [OVA] = 1 mg/ml). Na solução com conjugados de PorA-OVA foram visíveis pequenas partículas. A solução de conjugado foi aquecida subseqüentemente durante cinco ciclos térmicos como descrito acima. O conjugado foi armazenado a -80°C.

Método do dobramento incorreto III: acoplamento de polipeptídio-A a polipeptídio-B por meio de ativação de glutaraldeído/NaBU4

Para acoplamento de PorA a OVA, ambas as proteínas foram ativadas com glutaraldeído e boroidreto de sódio e misturadas. Para este fim dissolveu-se 100 µg de OVA em 250 µl de solução de consumo de PorA e adicionou-se 250 µl de tamponador de PorA. Solução de glutaraldeído (25 % (v/v) em H_2O, Merck, Hohenbrunn, Alemanha, 8.20603.1000 (UN2927, tóxico), lote S4503603 549), pré-diluída a uma solução de consumo 100x a 4 % em H_2O foi adicionada a uma concentração final de 0,04 %. Após agitação

com vórtice e uma incubação de 2 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 5 µl de uma solução de consumo de 100x $NaBH_4$ 120 mM (aprox. 98 %, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A., S9125, lote 53H3475) a uma concentração final de 1,2 mM. A solução foi submetida a agitação suficiente para se obter um vórtice e incubada durante 42 h à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento. Durante esta incubação tornaram-se visíveis pequenas partículas flotantes. Em seguida, a solução foi dialisada extensivamente contra PBS. A solução de conjugado foi aquecida subseqüentemente durante cinco ciclos térmicos como descrito acima. As concentrações finais de PorA e OVA foram de 200 µg/ml em PBS.

Análise da presença de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide com estrutura beta cruzada em soluções de PorA

Fluorescência de Tioflavina T

Para determinar o incremento da fluorescência do corante Tioflavina T (ThT, *Thiflavin T*) que é específico para amilóide, por meio de preparações de PorA, adicionou-se 90 µl de 25 uM de solução de ThT em 50 mM de tamponador de glicina (pH 9,0) a 10 µl de amostra em poços duplicatas de placas pretas de 96 poços. Usou-se amilóide-β (Aβ) a uma concentração de estoque de 1 mg/ml como um controle positivo. Fluorescência de duplicatas foi medida em um equipamento *Thermo Fluoroskan Ascent* 2,5, com comprimentos de onda de 435 nm de excitação e 485 nm de emissão. Em um ensaio, PorA e PorA com dobramento incorreto de acordo com métodos de dobramento incorreto I-III foram testadas com soluções de consumo de PorA diluídas 400 vezes. Em um segundo ensaio, as cinco soluções de vacina (a-e) foram testadas a uma diluição de 20 vezes.

Ativador de plasminogênio de tipo tissular — ensaio de ativação de plasminogênio

Ativador de plasminogênio de tipo tissular (tPA, *tissue-type plasminogen activator*) liga-se e é ativado por meio de proteína com

dobramento incorreto similar a amilóide. A ativação de tPA resulta na conversão de seu substrato plasminogênio a plasmina, que pode ser acompanhado ao longo do tempo usando-se um substrato de plasmina cromogênio. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços (placas de ELISA Costar 2595). As concentrações de tPA- (Actilyse, Boehringer-Ingelheim) e plasminogênio (Plg, purificado de plasma humano) concentrações foram de 400 pM e 0,2 μM, respectivamente. Substrato cromogênico S-2251 (Chromogenix, Milano, Itália), a 0,5 mM, foi usado para medir atividade de Plm. Tamponador de ensaio foi HBS (10 mM de HEPES, 4 mM de KCl, 137 mM de NaCl, pH 7,3). Controle negativo foi de H_2O, controle positivo foi de 20 μg/ml γ-globulinas com dobramento incorreto similar a amilóide dissolvido em H_2O. Em um ensaio, PorA e PorA com dobramento incorreto de acordo com métodos de dobramento incorreto I-III foram testados com soluções de consumo de PorA diluídas 400 vezes. Em um segundo ensaio, as cinco soluções de vacina (a-e) foram testadas a uma diluição de 20 vezes. Amostras foram testadas em poços duplicados, completados com um poço de controle negativo em que não se adicionou tPA. O volume de ensaio total foi de 50 μl. Realizou-se leituras cinéticas com um espectrofotômetro (Spectramax) a $_{405\ nm}$, e foram efetuadas de minuto em minuto durante 3 h, a 37°C, com agitação antes de cada leitura.

Montagem experimental de imunização

BalB/CAnNHSd fêmeas com de 7 a 9 semanas de vida (BalB/C, Harlan) foram alojados em gaiolas *filtertop* em cinco grupos de cinco camundongos por grupo (Instalação Animal Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium', Utrecht University, Países Baixos). Após aproximadamente uma semana de ajuste ao ambiente, retirou-se sangue para coletar soro pré-imune (dia -3). No dia 0 e dia 28, cada camundongo recebeu uma vacinação injetada subcutaneamente com um volume de 300 μl de acordo com o esquema a seguir:

grupo a vacina de PorA adjuvantada com alume (controle positivo)
grupo b PorA não-adjuvantado (amostras de referência)
grupo c tamponador de PorA (placebo)
grupo d PorA não-adjuvantado a 75 %, PorA com dobramento incorreto a 25 % (Item de teste 1)
grupo e PorA não-adjuvantado a 25 %, PorA com dobramento incorreto a 75 % (Item de teste 2)

Soros foram recolhidos no dia 7, 14, 21, 28, 35 e 42 e armazenados a -20^{0}C. A dose de PorA foi de 3 pg para cada animal. Vacinas (aproximadamente 6 doses) foram preparadas como a seguir:

-> Grupo a: 1. 50 µl de estoque de PorA, 2. 200 µl de tamponador 10x, 3. 50 µl de estoque de alume, 4. 1,7 ml de H_2O, 5. 30 minutos no dispositivo de rolamento à temperatura ambiente.

-> Grupo b: 1. 50 µl de estoque de PorA, 2. 1950 µl de tamponador 1x de PorA.

-> Grupo c: tamponador 1x de PorA.

-> Grupo d: 1. 37,5 µl de estoque de PorA, 2. 50 µl de (PorA + OVA) desnaturado com calor em PBS (Método do dobramento incorreto I), 3. 50 µl de EDC/NHS acoplado (PorA + OVA), 307 µg/ml em PBS (Método do dobramento incorreto II), 4. 20 µl de $NaBH_4$/glutaraldeído desnaturado com calor copulado (PorA-OVA) em PBS (Método do dobramento incorreto III), 5. 1813 µl de tamponador 1x de PorA.

-> Grupo e: 1. 12,5 µl de estoque de PorA, 2. 150 µl de (PorA + OVA) desnaturado com calor (Método do dobramento incorreto I), 3. 150 µl de EDC/NHS acoplada (PorA + OVA), 307 µg/ml em PBS (Método do dobramento incorreto II), 4. 60 µl de NaBHU/glutaraldeído desnaturado com calor acoplado (PorA-OVA) em PBS (Método do dobramento incorreto III), 5. 1628 µl de tamponador 1x de PorA.

ELISA de anticorpo anti-PorA

Titulações de IgG específicas para PorA foram determinadas por meio do uso de montagens ELISA convencionais com cada um dos três diferentes subtipos de PorA, ou com a solução de PorA trivalente aplicada

revestindo os poços. Resumidamente, para o ELISA com os três subtipos separados de PorA, placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano (Immulon 2, Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram revestidas de um dia para o outro à temperatura ambiente com vesículas de membrana exterior (OMVs, *outer membrane vesicles*) compreendendo um dos três subtipos de PorA de cepas de Neisseria, respectivamente P1.5-2,10, P1.12-1,13 e P1.7-2,4 (3 μg/ml). Controle negativo consistia de OMVs revestidas sem PorA. Após incubação de um dia para o outro, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de Tween 80 a 0,03 % em água potável. As placas foram então incubadas durante 80 minutos a 37°C com diluições triplas das amostras de soro de cada camundongo individual, recolhidas no dia -3 (pré-imune), 14, 28 (segunda vacinação) e 42, em PBS contendo 0,05 % de Tween 80. A diluição inicial foi de 100 vezes. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com 0,03 % de Tween 80 em água potável. Níveis de IgG específicos para PorA foram medidos com o uso de conjugado de peroxidase de rabanete - IgG anti-camundongo de cabra (Southern Biotechnology Associated Inc., Birmingham, ALA, E.U.A.) O conjugado foi diluído a 1:5000 em PBS contendo 0,05 % de Tween 80 e 0,5 % de leite em pó desnatado (Protifar; Nutricia, Zoetermeer, Países Baixos), e adicionou-se 100 μl nos poços. As placas foram então lavadas três vezes com 0,03 % de Tween 80 em água potável e uma vez com água potável apenas. Adicionou-se um substrato de peroxidase (100 μl de 3,3'5,5'-tetrametilbenzidina com 0,01 % de H_2O_2 em 110 mM de tamponador de acetato de sódio (pH 5,5) em cada poço, e as placas foram então incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se 100 μl de 2 M H_2SO_4 em cada poço. As titulações de anticorpos IgG foram expressas como o $\log_{10}$ da diluição de soro que dá 50 % da densidade óptica máxima a 450 nm. Quando não se obteve mais sinal com o soro diluído inicialmente 100 vezes, a titulação foi ajustada arbitrariamente em 50. Os ELISAs são realizados no NVI (Dr G. van

den Dobbelsteen).

Para a determinação de titulação de anticorpos anti-PorA trivalente, 5 μg/ml de PorA trivalente foi introduzido revestindo poços de Placas Microlon de alta ligação (Greiner). Após bloqueio com Reagente de Bloqueio (Roche), poços foram recobertos com diluições seriais de soros que foram coletados no dia 21 e que foram combinados para cada grupo de camundongos de a até e. Tamponador de diluição foi PBS/0,1 % Tween20. A ligação de anticorpos de camundongo foi detectada usando-se RAMPO a 1:3000, e uma mancha com TMB/H_2SO_4. Absorbância foi lida a 450 nm.

Ensaio bactericida em soro

O ensaio bactericida em soro (SBA, *serum bactericidal assay*) com soros de camundongo após imunização com PorA da cepa trivalente (1. P1.5-2,10; 2. P1.12-1,13; 3. P1.7-2,4) foi realizado após duas imunizações, com soros coletados no dia 28 (segunda vacinação) e dia 42, como descrito acima. Em resumo, soros foram diluídos a 1:10 em Solução salina balanceada de Grey contendo 0,5 % de albumina de soro bovino e complemento inativado (30 minutos, 56°C), e adicionou-se diluições seriais em placas de 96 poços. Bactérias são desenvolvidas em caldo de Mueller-Hinton (aproximadamente 80 minutos, 37°C) até uma densidade óptica a 620 nm atingisse de 0,220 a 0,240, diluídas em GBSS contendo 0,5 % albumina de soro bovino, e adicionadas nos poços (concentração total, 10^4 CFU/ml). Cada preparação foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se Complemento de coelho bebê (80 %), plaqueou-se amostras de momento zero, e as placas de 96 poços foram incubadas a 37°C durante 60 minutos. A titulação de SBA foi calculada determinando-se a $\log_2$ recíproca da diluição de soro que resultou em ≥90 % de eliminação com base na concentração nas amostras de momento zero. Quando não se obteve mais sinal com o soro diluído inicialmente 10 vezes, a titulação foi ajustada arbitrariamente em 5. Determinações de titulação de SBA foram realizadas no

NVI (Dr G. van den Dobbelsteen).

Estatísticas

A titulação de IgG é expressa como o valor log_{10} da titulação geométrica média (GMT, *geometric mean titer*) obtida para cada grupo de camundongos mais o erro padrão da média. A titulação de SBA é expressa como o valor médio de log_2 obtido para cada grupo de camundongos. Experimentos foram realizados em duplicata. Diferenças entre titulações foram consideradas significativas a valores P de ≤0,05, como determinado pelo teste t de Student.

Resultados

Análise da presença de PorA com dobramento incorreto com conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide compreendendo estrutura beta cruzada

PorA trivalente obtida do NVI foi desnaturada de acordo com três métodos: desnaturação com calor cíclico na presença de OVA (Método I), desnaturação com calor cíclico de PorA conjugado a OVA usando acoplamento de EDC/NHS (Método II) e desnaturação com calor cíclico de PorA conjugada a OVA usando acoplamento de glutaraldeído/$NaBH_4$ (Método III). A presença de conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide foi determinada usando-se dois ensaios diferentes. Avaliou-se o incremento da fluorescência do corante ThT específico para amilóide foi avaliado (Figura 6A, C), e determinou-se o incremento de atividade de tPA, que é uma serina protease que se liga a, e é ativada por, proteínas compreendendo conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide (Figura 6B, D). Na Figura 6A e B observa-se que todas as soluções de consumo de PorA a diluição de 400 vezes compreendem estrutura beta cruzada. Após formulação das vacinas de a até e, vacina de controle adjuvantada com alume e 75 % de vacina de PorA adjuvantada com beta cruzado testou positiva para a presença de proteína com

dobramento incorreto similar a amilóide no ensaio de ativação de tPA (Figura 6D). Com base na análise de fluorescência de ThT (Figura 6C), contudo, aquela testou negativa para PorA adjuvantada com alume, nós concluímos que a ativação incrementada de tPA observada com PorA adjuvantada com alume devida ao dobramento incorreto no-ensaio de tPA/plasminogênio na superfície de alume precipita, resultando em subseqüente ligação de tPA e ativação. Concluindo, material de partida PorA e PorA com dobramento incorreto compreende estrutura beta cruzada similar a amilóide.

SBA e ELISA de anticorpo anti-PorA

Os resultados de determinações de titulações de anticorpo anti-PorA usando o antígeno de PorA trivalente, ou os três subtipos separados de PorA como o antígeno, são ilustrados nas Tabelas 4-18 e Figura 7A e B. Titulações totais anticorpo anti-PorA trivalente em soros combinados coletados no dia 21 são mostradas na Figura 7A. Está claro que soros combinados de grupos de camundongos a, b, d, e, que receberam (todos) vacina com antígeno de PorA, apresentam titulações totais de anticorpo anti-PorA similares, sendo que grupo c (tamponador/placebo) e soro pré-imune testaram negativos quanto à presença de anticorpos anti-PorA. Quando se avaliou titulações contra cada um dos três subtipos de PorA, observa-se diferenças entre camundongos dentro de grupos com relação aos valores de titulação. O grupo de placebo c testou negativo para todos os camundongos, e também o soro pré-imune. Dentro de cada um dos grupos que receberam vacina de PorA, um ou mais camundongos não elicitaram titulações de modo algum. Não se observa diferenças entre os grupos a, b, d e e.

Na Figura 7C e Tabelas 19-23, mostra-se resultados das determinações de titulação de SBA com cada um dos três subtipos de PorA. Como com o ELISA de antígeno, quando se avaliar as titulações por SBA contra cada um dos três subtipos de PorA, observa-se diferenças entre camundongos dentro dos grupos com relação a seus valores de titulação. O

grupo de placebo c testou negativo para todos os camundongos. Dentro de cada um dos grupos que receberam vacina de PorA, um ou mais camundongos não elicitou titulações de modo algum. Não se observou diferenças entre grupos a, b, d e e.

Na Tabela 24, titulações de anticorpo de subtipo anti-PorA e titulações de SBA específicas para subtipo são comparadas para cada camundongo. Está claro que titulações observadas no SBA para camundongo 3/grupo a/subtipo P1.7-2,4, camundongo 1/b/P1.12-1,13, camundongo 4/b/P1.7- 2,4 e camundongo 3/d/P1.5-2,10 são acompanhadas da ausência de uma titulação conforme determinado no ELISA de antígeno. O oposto, significando uma titulação observada no ELISA de antígeno sem titulação no SBA, é observada em camundongos 4/a/P1.7-2,10, 2/b/P1.7-2,10, 2/d/P1.5-2,10, 1/e/P1.5-2,10 e 4/e/P1.7-2,4. Isto mostra claramente uma das dificuldades que surge quando se desenvolve vacinas de subunidade de Neisseria meningitidis. Um resultado positivo em um ensaio não tem valor preditivo consistente para o resultado esperado no segundo ensaio. Diferenças em epítopos para os anticorpos elicitados e/ou afinidade/avidez dos anticorpos elicitados são a base desta discrepância. Adicionalmente, pode-se observar claramente que camundongos não elicitam titulações de anticorpos relevantes contra todos os três subtipos de PorA. Na maior parte dos casos, desenvolve-se titulações contra um ou dois subtipos de PorA. A imunogenicidade relativa dos três subtipos de PorA (P1.5-2, 10 » P1.12-2, 4 ≈ P1.7-2,4) é refletida no número de camundongos que desenvolveram titulações contra os dois subtipos menos imunogênicos, quando comparado com o subtipo mais imunogênico P1.5-2,10. Quando se compara PorA não-adjuvantado e PorA adjuvantada convencional com alume com vacina de beta cruzado-PorA adjuvantada, não se observa diferenças com relação a números de camundongos que desenvolveram anticorpos, nem se observa diferenças com relação ao subtipo a que titulações são elicitadas, nem se observa diferenças

com relação ao poder preditivo do ELISA para antígeno quando se considera a titulação de SBA acompanhada. Assim, concluindo, no primeiro teste a elicitar anticorpos bactericidas contra PorA está provado que a tecnologia de Adjuvação-através-de-estrutura beta cruzada proporciona vacinas potentes como PorA adjuvantada com alume usado convencionalmente. A tecnologia Adjuvação-através-de-estrutura beta cruzada proporciona vários meios para o melhoramento das vacinas correntemente disponíveis de subtipo de PorA multivalentes de Neisseria meningitidis. Por exemplo, agora usa-se menos material para elicitar titulações protetoras. Mais importante, quando se considera subtipos menos imunogênicos, obtém-se melhoramento da imunogenicidade protetora efetiva por meio do uso de tecnologia de Adjuvação-através-de-estrutura beta cruzada especificamente para estes subtipos problemáticos. Após aplicação da tecnologia de Adjuvação-através-de-estrutura beta cruzada, o subtipo com estrutura beta cruzada ótima, com relação ao potencial de elicitar anticorpos protetores, é administrado, por exemplo, em uma vacina de subunidade multivalente. Alternativamente, a tecnologia é aplicada em uma vacina de subunidade multivalente completa. Ligação de subtipos de PorA com baixa intensidade imunogênica para outra proteína que compreende uma potente estrutura beta cruzada imunogênica incrementa o desenvolvimento de anticorpos desejados. Adicionalmente, quando se aplica, além de PorA, uma proteína com estrutura beta cruzada com potente intensidade imunogênica em uma vacina multivalente, titulações de antígeno com relação à proteína não-relacionada proporcionam uma ferramenta preditiva com relação ao presença de anticorpos bactericidas.

Finalmente, hoje em dia usa-se alume como o adjuvante de escol em formulações de vacinas de PorA. Quando a tecnologia de Adjuvação-através-de-estrutura beta cruzada é aplicada no desenvolvimento de vacinas, p. ex. no desenvolvimento de vacinas de PorA, não é mais necessário implicar um adjuvante diferente de uma molécula proteinácea

compreendendo estrutura beta cruzada, p. ex. alume, para formulação de vacina de PorA, na formulação final. Evidentemente, em outras ocasiões reduz-se a quantidade de adjuvantes correntemente usados, ao invés de completamente omitida, que também é benéfica com relação, entre outras coisas, a questões de segurança, redução de custo, facilidade de uso, e estabilidade.

Exemplo 10

Imunização de camundongos com um antígeno humano compreendendo estrutura beta cruzada elicita titulações de anticorpos contra antígeno humano não-tratado e quebra a tolerância nos camundongos

β2-glicoproteína I humana, o auto-antígeno na doença auto-imune Síndrome Antifosfolipídeo, com estrutura beta cruzada induz uma titulação contra auto- β2-glicoproteína I em camundongos

Materiais e Métodos

Imunizações com β2-Glicoproteína I com dobramento incorreto

Soluções de consumo

Solução de consumo de β2-Glicoproteína I humana; 800 μg/ml em 1x Solução salina tamponada com Tris, pH 7,2 (1x TBS). Vesículas de cardiolipina foram preparadas de uma solução lamelar de cardiolipina (Sigma; C-1649) de acordo com um protocolo por Subang *et al.*([2]). Duzentos μl de cardiolipina foram colocados em um tubo de vidro e etanol foi evaporado com um fluxo constante de N_2. A cardiolipina secada foi reconstituída em 104 μl de 1x TBS e submetida cuidadosamente a agitação suficiente para se obter um vórtice. A solução resultante continha 10 mg/ml (7,14 mM) de vesículas de cardiolipina. Esta solução poderia ser armazenada durante 14 dias a 4^0C, maximamente. Todas as diluições foram em TBS e, após armazenamento, a solução foi submetida a agitação suficiente para se obter um vórtice antes do uso.

Modificações: preparação de alquila-β2gpi

β2-GPI foi reduzida e alquilada como a seguir. Seiscentos e quarenta µl de estoque de β2-GPI foram misturados com 640 µl de uréia 8 M (solução resfriada) em 0,1 M de Tris pH 8,2. A solução foi desgaseificada com gás de N_2 durante aproximadamente 6 minutos. Adicionou-se à solução 12,8 µl de estoque de DTT 1 M, isto foi misturado e incubado durante 3 horas à temperatura ambiente. Preparou-se 1 M de iodoacetamida (Sigma; 1-6125), de que 25,6 µl foram adicionados à mistura de reação β_2GPI. A solução foi dialisada subseqüentemente contra PBS. Dobramento incorreto da resultante alquila-β_2GPI foi determinada medindo-se o incremento da fluorescência de ThT e por meio da maior capacidade de ativar tPA/plasminogênio, resultando em plasmina no ensaio cromogênico. O ensaio cromogênico foi realizado com 400 pM de tPA, 20 µg/ml de plasminogênio. Sinais obtidos com alquila-β_2GPI foram comparados com aqueles obtidos com material de partida de β_2GPI nativa.

Imunizações de camundongos com β2GPI nativa, alquila-β2gpi e cardiolipina-β2gpi

Balb/C AnNHSd fêmeas (BalB/C, Harlan) com de 7 a 9 semanas de vida foram alojados em gaiolas *filtertop* em grupos de 5 camundongos por grupo. Após aproximadamente um semana de ajuste ao ambiente, coletou-se soros pré-imunes. No início da primeira semana, camundongos receberam, ou 100 µl de plasma (150 µg/ml) β2- Glicoproteína I, 100 µl de alquil- β2-Glicoproteína I (150 µg/ml) ou 100 µl de uma mistura de 150 µg/ml de β2-Glicoproteína I com 9,33 µM de cardiolipina (CL-β_2GPI). Esta última amostra foi preparada por meio de pré-incubação de 400 µg/ml de β2-GPI com 25 µM de vesículas de cardiolipina durante pelo menos 10 minutos à temperatura ambiente após misturação da amostra por meio de pipetação; em seguida, amostras foram diluídas a 150 µg/ml. A presença de β2GPI com dobramento incorreto na preparação de CL-β_2GPI foi determinada medindo-se o incremento da fluorescência de ThT e o potencial incrementado

de estimular ativação de tPA/plasminogênio. Todas as diluições foram preparadas recentemente em TBS e mantidas sobre gelo. Injeções foram administradas intravenosamente nas veias caudais dos camundongos e dadas às segundas-feiras e sextas-feiras da primeira e terceira semana. Sangue foi coletado três dias antes do início do estudo, e às quartas-feiras da semana 2 e 4 por meio de punção da veia safena. Sangue foi coletado em tubos Easycollect, com ativador de coagulação do soro Z. Soros foram preparados por meio de centrifugação em uma centrífuga de mesa, com um diâmetro do rotor de 7 cm, a 3800 rpm durante 10 minutos (início e parada lentos) e armazenada a -20°C até análise posterior.

Determinações de titulação

Soros foram analisados quanto a anticorpos contra β_2GPI nativa não-modificada (revestida). Placas de 96 poços Microlon com alta ligação (Greiner, Alphen aan den Rijn, Países Baixos) foram revestidas com 50 µl de β_2GPI nativa (5 µg/ml em 100 mM de $NaHCO_3$, pH 9,6, 0,05 % NaN_3) por poço durante 1 hora. Em seguida, os poços foram drenados e lavados duas vezes com 300 µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 0,1 % de Tween20 (PBST). Após lavagem, poços foram bloqueados por meio de incubação com 200 ul de Reagente de Bloqueio (Roche, Almere, Países Baixos) em PBS durante 1 hora. Os poços foram drenados e lavados duas vezes com 300 µl de PBST. Titulações de anticorpos foram determinadas adicionando-se soros combinados de cada grupo experimental (n=5) em diluições seriais triplas (partindo de 1:30, 50 ul/poço) nas placas cobertas com β_2GPI humana nativa. As placas foram lavadas quatro vezes com 300 µl de PBST. Anticorpos anti-camundongo de coelho conjugado com peroxidase (RAMPO), diluído a 1:3000 em PBST, foram adicionados nos poços e incubados durante 1 hora. Placas foram drenadas e lavadas quatro vezes com 300 µl de PBST e duas vezes com 300 µl de PBS. As placas foram então manchado durante aproximadamente 5 minutos usando

100 µl/poço de substrato de TMB (Biosource Europe, Nivelles, Bélgica), a reação foi interrompida com 50 µl/poço de H_2SO_4 2M e efetuou-se a leitura a 450 nm em uma leitora de microplacas Spectramax340. Os valores de absorbância foram plotados contra a diluição log. Curvas foram adequadas com uma curva sigmoidal (GraphPad Prism versão 4.02 para Windows, Graphpad Software, CA, E.U.A.). Para comparação, a diluição que deu uma absorbância residual após subtração de fundo de 0,1 foi tomada arbitrariamente como a titulação dos vários soros.

Em uma abordagem de ELISA similar, avaliou-se a ligação de soros diluídos 100 vezes após imunização com β2GPI humana nativa, alquila-β_2GPI, CL-β_2GPI e soro pré- imune sobre β_2GPI murina imobilizada. Desta maneira, determina-se se as imunizações de camundongos com β_2GPI humana elicitam uma resposta auto-imune humoral contra β_2GPI murina.

Resultados

Imunização de camundongos com β2GPI com dobramento incorreto adjuvantada com beta cruzada sem o uso de um adjuvante convencional

Exposição de β2GPI humana nativa a cardiolipina, ou alquilação de radicais cisteína em β_2GPI induz conformação de proteína similar a amilóide (Figura 8A, B).

Imunização de camundongos que receberam quatro injeções de 15 µg de antígeno/animal, revelou que alquila-β_2GPI e CL-β_2GPI elicitou respostas imunes humorais muito maiores do que β_2GPI nativa (Figura 8C, D). Isto mostra que adjuvação beta cruzada unicamente por meio de dobramento incorreto de β_2GPI acompanhado do aparecimento de características similares a amilóide, confere-lhe potencial imunogênico mais elevado. Quando titulações de anticorpos contra auto-β_2GPI de camundongo foram avaliadas após imunizações com β2GPI humana nativa, alquila-β_2GPI e CL-β_2GPI, observou-se claramente que, além do incremento de titulações de anticorpos que se ligam à β_2GPI humana nativa, também titulações auto-

imunes de anticorpos contra β_2GPI murina foram incrementadas quando estrutura similar a amilóide está presente em β_2GPI humana (Figura 8E). Isto proporciona evidência adicional para a compreensão de que propriedades similares a amilóide de proteínas são um disparador para imunogenicidade, levando à eliminação. Estrutura beta cruzada é parte de um mecanismo de defesa dentro da Via Beta Cruzada para eliminação de proteínas obsoletas. Adicionalmente, mostrou-se que a tolerância não é um aspecto decisivo para verificar se uma resposta imune humoral ocorrerá ou não. É a natureza similar a amilóide do antígeno que determina se a porção é considerada perigosa para o indivíduo ou não, e, portanto, se a exposição do indivíduo à porção similar a amilóide deveria ser conquistada adequadamente. Nossos dados mostram que, se a seqüência de aminoácidos subjacente é de auto-origem ou não é de auto-origem, não constitui um parâmetro decisivo primário. Novas abordagens de vacinação tornaram-se possíveis com relação ao desenvolvimento de vacinas contra auto-antígenos que desempenham um papel em doenças que não infecções, por exemplo, para indução de anticorpos a LHRH para imunocastração de javalis, ou para uso na prevenção da doença de enxerto versus hospedeiro (GvH) e/ou rejeições de transplante.

ExemploS 11-14

Materiais e métodos para ensaios de imunização com E2, CL3, H5, H7

Clonagem, expressão e purificação de antígenos

Hemaglutinina-5 da gripe aviária

cDNA de hemaglutinina-5 (H5 ou HA5) da cepa viral A/Vietnam/1203/2004 foi um gentil presente do Dr. L. Cornelissen (ID-Lelystad, Países Baixos). DNA foi amplificado usando-se iniciadores CAI 127 e 129 e foi fornecido em um plasmídio. Na instalação de expressão de ABC (R. Romijn e W. Hemrika, Universidade de Utrecht, Países Baixos), cDNA de H5 foi amplificado ainda mais usando-se iniciadores 5' ggatcc gatcagatttgcattggttacc 3' e 5'gcggccgccagtatttggtaagttcccat 3'. O fragmento de

PCR foi ligado no vetor pCR4-TOPO. Análise de seqüências foi realizada na Baseclear (Leiden, Países Baixos). A seqüência de H5 do clone 709-5 continha duas mutações silentes (ver Seqüência ID 1; negrito/sublinhado, a->g e t->a). O fragmento de DNA de H5 foi digerido BamHI e NotI, purificado e ligado em pABC-CMV-dE-dH-sub-optimal_sp-Flag3C-hisC_(pUC) (ver Seqüência ID 2; seqüência sinal sub-ótima sublinhada/itálico, marcador FLAG — marcador His negrito/sublinhado) e marcadores de expressão pABC-CMV-dE-dH-Cistatina_sp-Flag3C- hisC_(pUC) (ABC -instalação de expressão). Desta maneira, H5 é expressa com um marcador FLAG carbóxi-terminal — marcador His.

Expressão e purificação de H5

Para expressão de proteína H5-FLAG-His, uma cultura de 2 litros de HEK293E (rim embrionário humano) células de suspensão foram transfectadas transientemente com vetor de expressão usando-se polietileno-imina. Células transfectadas foram desenvolvidas durante de 5 a 6 dias. Para purificação de H5 secretada no meio de cultura de células, as células foram pelotizadas e o sobrenadante foi concentrado usando-se um concentrador Quixstand (AJG Technology Corp.), usando-se um filtro com corte de 10 kDa (GE Healthcare).

Realizou-se uma etapa de diálise no mesmo concentrador, e as proteínas foram dialisadas contra PBS/1M de NaCl. O meio concentrado e dialisado foi filtrado (0,45 μm, Millipore) e incubado com pérolas Ni-Sepharose Fast Flow (GE-Healthcare 17-5318-02) na presença de 7,5 mM de imidazol, durante 3 h à temperatura ambiente sob movimento constante. Uma coluna foi enchida com pérolas e as proteínas foram extraídas incrementando-se a concentração de imidazol. A purificação foi realizada em um AKTA Explorer (Pharmacia). Frações com H5 foram combinadas e novamente carregadas nas pérolas de Ni-Sepharose para purificação adicional. Frações com H5 foram combinadas e dialisadas contra PBS e, subseqüentemente,

determinou-se a concentração de H5 usando-se um kit de Reagente de Ensaio de Proteína BCA convencional (Pierce No. 23225). O peso molecular da H5 é de aproximadamente 75 kDa. Solução de H5 combinada (236 μg/ml) foi fracionada e armazenada a -80^{0}C (lote 1 CS210406). Uma segunda batelada de proteína de H5 (lote 2 fração X 250506CS) apresentou uma concentração de 140 μg/ml em PBS.

H7 de gripe aviária

CDNA de H7 da cepa viral A/frango/Netherlands/621557/03 foi um gentil presente do Dr. L. Cornelissen (ID-Lelystad, Países Baixos, 'BgIII-NotI, amplificado usando-se iniciadores RDSH7'5 e RDS7'3), e foi fornecido como um fragmento de PCR. Na instalação de expressão de ABC (R. Romijn e W. Hemrika, Universidade de Utrecht, Países Baixos), o fragmento de PCR de H7 foi amplificado usando-se iniciadores 5' agatctgacaaA(g)atctgccttgggcatcat 3' e 5'gcggccgcaagtatcacatctttgtagcc 3'. O fragmento de PCR foi ligado em vetor pCR4-TOPO. Análise de seqüências foi realizada na Baseclear. A seqüência de H7 do clone 710-15 continha quatro mutações, das quais duas resultam em mutações de aminoácidos (ver Seqüência ID 3 e 4; a->g, g->a, g->a (Arg->Lys), a->g (Met->Val)). O fragmento de DNA de H7 foi isolado mediante digestão com BamHI e NotI, e ligado em pABC-CMV-dE-dH-sub-ótimo_sp-Flag3C-hisC_(pUC) (ver Seqüência ID 4; seqüência sinal sub-ótima sublinhado/itálico, marcador FLAG - marcador His negrito/sublinhado) e pABC-CMV-dE-dH-Cistatina_sp-Flag3C-hisC_(pUC) vetores de expressão (instalação de expressão de ABC). Desta maneira, H7 é expressa com um marcador FLAG carbóxi-terminal - marcador His.

Expressão e purificação de H7

As células de uma suspensão de células de 2 litros foram pelotizadas por meio de centrifugação e o pellet de células foi isolado e ressuspenso em 25 mM de Tris, 0,5 M de NaCl, pH 8,2 a um volume de 50

ml. As células foram congeladas-descongeladas uma vez, e adicionou-se cinco Tabletes de Coquetel de Inibidor de Protease (Roche, nº catálogo 11 836 170 001) à suspensão de células. A suspensão de células foi sonicada sobre gelo e centrifugada a 21.000*g durante 1 h a 4°C. O sobrenadante foi filtrado (0,45 μm) e incubado durante 16 h a 4°C sob movimento constante, com pérolas de Ni-Sepharose Fast Flow na presença de 20 mM de imidazol. Após enchimento de uma coluna, H7 foi eluída aumentando-se a concentração de imidazol. A expressão de H7 foi analisada sobre gel de poliacrilamida usando Coomassie e, em um Western blot usando-se uma proporção de 1:3000 de anti-FLAG-HRP (Sigma A-8592). Frações com H7 foram combinadas e dialisadas contra PBS pH 7,4 a 4°C, fracionadas e armazenadas a -80^{0}C. A concentração da solução de H7 combinada foi determinada por meio de densitometria em um Western blot usando-se E2-Flag purificado com uma concentração conhecida para a curva padrão, e foi de 10,5 μg/ml (peso molecular da H7 é de aproximadamente 75 kDa (lote 2 05- 2006CS).

Expressão por células HEK293E e subseqüente purificação de E2

DNA da glicoproteína E2 do vírus da febre suína clássica (CSFV, *Classical Swine Fever virus*) foi obtido da Geneart (Regensburg, Alemanha, Seqüência ID 5 e 6). A construção foi digerida usando BamHI e NotI, e ligada em vetor pABC674 (Instalação de expressão de ABC), que estenderá o E2 recombinante com um marcador FLAG carbóxi-terminal - marcador His. Células HEK293E foram transfectadas transientemente e desenvolvidas durante de 5 a 6 dias (C. Seinen, University Medical Center Utrecht, Países Baixos). Purificação foi substancialmente similar ao método descrito para H5 e H7. Tamponador de ligação para a coluna de Ni^{2+} foi 25 mM de Tris, 0,5 M de NaCl, pH 8,2. Após diálise das frações combinadas com E2, determinou-se a pureza de gel usando-se o programa ImageQuant (Molecular Dynamics). A pureza de E2 foi de aproximadamente 90 %.

Mediu-se a concentração de proteína com o método BCA, e foi de 655 µg/ml em PBS. A concentração de E2 foi de 561 µg/ml na solução de consumo fracionada, que foi armazenada a -80°C (lote 1 210406CS).

Expressão por células Sf21 e subseqüente purificação de E2

Glicoproteína E2 recombinante do CSFV também foi expressa e purificada para teste de uma nova vacina de E2 adjuvantada com beta cruzada contra CSFV. A produção desta E2 foi realizada por R.D. Strangi (TU Eindhoven, Países Baixos) no Grupo de Ciências Animais (ASG [*Animal Sciences Group*], ID-Lelystad, Países Baixos). Uma fração da linha de células de Spodoptera frugiperda (Sf21) cell line (P.A. van Rijn, ID-Lelystad, [4]) de nitrogênio líquido foi rapidamente descongelada a 37^0C em um banho de água. Em seguida, 1,5 ml de cultura de células foi transferido para um frasco de 150 cm^2 com 27 ml de meio de crescimento pré-aquecido (meio livre de soro SF900-II com L-Glutamina, Gibco) suplementado com 1 % vol/vol de antibiótico-antimicótico (Gibco, 15240-062), e desenvolvido a 28°C. Culturas de Sf21 foram expandidas subseqüentemente em frascos separados de 150 cm^2 até se atingir um volume de trabalho de 30 ml de suspensão de células.

Células Sf21 desenvolvidas em meio SF900-II foram infectadas com baculovírus expressando E2 como descrito por Hulst *et al.* ([5]) a uma múltiplo de infecção (M.O.I., *multiple of infection*) de 0,01 e incubadas para 280 horas a 28°C. Em vários momentos, o nível de expressão de E2 expressão em meio foi determinado por meio de ressonância de plasmon de superfície (SPR, *surface plasmon resonance*), como descrito abaixo. Meio de cultura foi eliminado dos fragmentos de células por meio de centrifugação durante 10 minutos a 600xg, e armazenado a 4°C após adição de NaNe a uma concentração final de 0,02 %.

Ressonância de Plasmon de Superfície com anticorpo anti-E2

Experimentos de ligação com anticorpo anti-E2 e meio de cultura de células compreendendo E2 recombinante foram realizados usando

SPR em um instrumento Biacore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Suécia) usando-se um chip de classe de pesquisa CM5. Usou-se um procedimento de acoplamento de amina padronizado para acoplar covalentemente proteínas à superfície do sensor, implicando primeira ativação da superfície do dextrano do chip sensor CM5 com uma injeção de 7 minutos de uma mistura a 1:1 de 100 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) e 400 mM de N-etil-N'-(dimetil-aminopropil)-carbodiimida (EDC) com uma taxa de fluxo de 5 µl/minuto. Anticorpo α-V3anti-E2 (ID- Lelystad) foi diluído a 1:40 em tamponador de acetato pH 5,5 e acoplado covalentemente ao dextrano ativado por meio de uma injeção de 7 minutos a uma taxa de fluxo de 10 µl/minuto. Grupos ativados remanescentes sobre cada célula de fluxo foram bloqueados por meio de injeção de 35 µl de cloridrato de etanolamina 1 M pH 8,5. Dissociação foi iniciada com a substituição da amostra injetada por tamponador de fluxo. Determinou-se as unidades de resposta residuais (RU's [*response units*]) após 2 minutos de dissociação. Tamponador HBS-EP filtrado e desgaseificado (150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 0,005 % (v/v) de Tween-20, e 10 mM de HEPES, pH 7,4) foi usada como grupo tamponador de fluxo (Biacore). Meio de cultura foi diluído a 1:10 em tamponador de fluxo e determinou-se a ligação de E2 a α-V3 imobilizado (não mostrado).

Coluna de afinidade de anticorpo anti-E2 α-V3

Anticorpo α-V3 anti-E2 monoclonal (9 mg/ml, produzido e purificado na ASG, ID-Lelystad) foi dialisado contra 0,1 M de $NaHCO_3$ com 0,5 M de NaCl, pH 8,3.

Membrana de diálise (Medicell International Ltd, com um corte de peso molecular de 12-14,000 Da) foi aquecida durante 30 minutos em água com 2 % (peso/volume) de bicarbonato de sódio e 1 mM de EDTA pH 8,0. Subseqüentemente, isto foi fervido durante 10 minutos em 1 mM de EDTA pH 8,0. Anticorpo α-V3 foi dialisado contra 4 litros de $NaHCO_3$ 0,1 M com 0,5 M de NaCl pH 8,3 a 4^0C, que foi renovado quatro vezes ao todo.

Anticorpo α-V3 monoclonal dialisado foi acoplado a Sepharose-4B ativada com CNBr (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suécia) de acordo com as instruções do fabricante. Um grama e meio de Sepharose 4B ativada com CNBr foi intumescido em 300 ml de HCl 1 mM durante 15 minutos. Em seguida, as pérolas de Sepharose foram lavadas quatro vezes por meio de rápida centrifugação e substituição do sobrenadante por HCl 1 mM fresco. Anticorpo α-V3 em $NaHCO_3$ 0,1 M com NaCl 0,5 M, pH 8,3 foi adicionado e incubado durante 2 horas à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento. α-V3 não-ligado foi removido por lavagem com 50 ml de $NaHCO_3$ 0,1 M com 0,5 M de NaCl, pH 8,3. Subseqüentemente, quaisquer grupos ativos remanescentes na matriz foram bloqueados com uma incubação de 1 hora com 20 ml de glicina pH 8,0. Em seguida, realizou-se três lavagens com pH alternante ($NaHCO_3$ 0,1 M com 0,5 M de NaCl, pH 8,3 seguido de 0,1 M de acetato de Na com 0,5 M de NaCl pH 4,0). Por fim, realizou-se uma lavagem com 10 ml de glicina 0,1 M pH 2,5, seguido de uma lavar com PBS. Em seguida, a coluna foi armazenada em PBS suplementado com 0,02 % peso/peso de NaN_3, a 4°C.

Purificação de E2

Após 280 horas do início da infecção com vírus das células Sf21 expandidas, o meio de cultura foi recolhido em tubos de 50 ml e eliminado das células e fragmentos de células por meio de centrifugação durante 10 minutos a 600 x g, e armazenado a 4^0C.

Sobrenadante foi separado do pellet de células e adicionou-se 0,02 % peso/peso de azida. E2 foi purificado do sobrenadante de cultura de células em três operações subseqüentes, como descrito abaixo. Operação 1 (lote 1 200406RS): meio de cultura de E2 foi circulado sobre a coluna de afinidade de α-V3 à temperatura ambiente durante 2,5 horas a uma taxa de fluxo de 60 ml/hora, seguido de uma lavagem de um dia para o outro com PBS. E2 foi eluído com 0,1 M de glicina pH 2,5. Eluado foi recolhido em

frações de 3 ml e ajustador diretamente em pH 7-8 por meio de adição de 45 µl de 3 M de Tris-base. Subseqüentemente, as frações contendo proteína E2 purificada foram dialisadas contra PBS, e analisadas por meio de SDS-PAGE. Após quantificação de proteína usando o Ensaio de Proteína BCA (Pierce), frações com E2 >95 % puro foram combinadas, e armazenadas a -80^{0}C. Concentração de E2 na fração combinadas foi de 285 µg/ml para lote 1 200406RS. Uma quantidade adicional de E2 foi extraída do mesmo sobrenadante de cultura de células por meio de recirculação sobre a matriz de afinidade de α-V3 (operação 2, lote 2 030506RS). Operação 3 (lote 3 100506RS): Uma segunda batelada de meio de cultura de células meio de cultura células com E2 expresso foi armazenado primeiro a -80^{0}C e, depois, usado para purificação de E2 como descrito acima.

Primeiramente, meio foi concentrado usando-se 15 ml de concentradores Macrosep 10K (Pall). O meio de E2 concentrado 3,3 vezes foi circulado sobre a coluna de afinidade à temperatura ambiente durante 5 horas, a uma taxa de fluxo de 60 ml/hora, seguido de lavagem de 5 horas com PBS. Após a primeira etapa de purificação, o meio concentrado foi recarregado na coluna para uma purificação subseqüente. E2 foi analisado por meio de SDS-PAGE e imuno-manchamento. Amostras foram aplicadas sobre um gel de poliacrilamida a 4-15 % (SDS-PAGE, NUPAGE, Invitrogen). Antes de SDS-PAGE, as amostras foram aquecidas durante 5 min a 95°C na presença de 20 mM de DTT. Proteínas separadas foram transferidas para proteínas de nitrocelulose separadas e proteína E2 foi visualizada com uma incubação com, primeiro, α-V3 e, depois, RAMPO, seguido de manchamento com quimiluminescência (Western Lightning, Perkin-Elmer).

Expressão e purificação de proteína Catepsina L3 de *Fasciola hepatica*

DNA recombinante de proteína catepsina L3 de *Fasciola hepatica* (proteína CL3) foi obtido da Geneart (ver Seqüência ID 7). A construção foi digerida usando-se BamHI e NotI, e ligada no vetor pABC674

(facilidade de expressão ABC), que estenderá a proteína CL3 recombinante com um marcador FLAG carbóxi-terminal - marcador His. Após expressão durante 5-6 dias, células HEK293E pelotizadas de uma cultura em suspensão de 2 litros foram ressuspensas em 25 mM de Tris, 0,5 M de NaCl, pH 8,2 a um volume de 50 ml. As células foram congeladas-descongeladas uma vez, e adicionou-se cinco Tabletes de Coquetel de Inibidor de Protease (Roche nº de catálogo 11 836 170 001) à suspensão de células. A suspensão de células foi sonificada sobre gelo e centrifugada a 21.000*g durante 1 h a 4°C. O sobrenadante foi filtrado (0,45 μm, Millipore) e adicionou-se imidazol a uma concentração final de 10 mM. A proteína CL3 foi carregada/re-carregada durante 16 h a 4°C em uma coluna HisTrap HP 1 ml (GE Healthcare 17-5247-01) com uma taxa de fluxo de 0,75 ml/minuto, usando um sistema fechado. CL3-FLAG-His ligado foi eluído com aplicação de um gradiente de imidazol na coluna. A proteína purificada foi visualizada por meio de eletroforese de SDS-PAGE (Invitrogen, NuPage 4-12 % BisTris NP0323) com manchamento Coomassie (Fermentas PageBlue R0571). Adicionalmente, CL3 foi submetido a Western blot seguido de um manchamento usando anti-FLAG-HRP (Sigma A- 8592) e substrato à base de luminol para detecção catalisada com HRP (*Western Lightning Chemi-luminescence Reagent Plus* nº de catálogo NEL 104). A pureza de frações combinadas com proteína CL3, dialisadas contra PBS, foi estimada com densitometria sobre gel manchado com Coomassie, e foi de aproximadamente 7,5 %. A concentração de proteína total foi determinada medindo-se a absorbância a 280 nm e calculando presumindo que uma solução com 1 mg/ml de proteína resultará em um valor de absorbância de 1,0. A concentração de proteína total foi de 400 μg/ml. Considerando a pureza, a concentração de proteína CL3 é de aproximadamente 30 μg/ml em PBS. O peso molecular da proteína CL3 é de aproximadamente 38 kDa incluindo um carboidrato ligado a N. Solução de proteína foi repartida e armazenada a -

80^0C (lote 1 010606CS).

Conjugação de peptídio catepsina L3 de *Fasciola hepatica* à hemocianina de limpeto buraco-de-fechadura

Para ensaios de imunização peptídio catepsina L3 de *Fasciola hepatica* (peptídio CL3, Ansynth Service B.V, Roosendaal, Países Baixos, lote BB1; usou-se a seqüência tomada de cisteína proteinase similar a catepsina L UniProtKB/*Swiss-Prot entry* www.expasv.org/uniprot/P80528, e estendida com uma cisteína amino-terminal: CSNDVSWHEWKRMYNKEYNG; Seqüência ID 8). A cisteína amino-terminal foi introduzida para fins de acoplamento com proteína-suporte de hemocianina de limpeto buraco-de-fechadura de maricultura ativada com maleimida Imject (mcKLH, *mariculture Keyhole Limpet Haemocyanin*) (Pierce). A conjugação de peptídio CL3 a mcKLH ativada com maleimida foi realizada de acordo com o manual do fabricante. Peptídio CL3 liofilizado foi dissolvido em tamponador de conjugação fornecido (contendo 83 mM de tamponador de fosfato de sódio, 0,1 M de EDTA, 0,9 M de NaCl, 0,02 % de azida de sódio, pH 7,2) a uma concentração final de 10 mg/ml. mcKLH ativada com maleimida foi reconstituída em água destilada a 10 mg/ml. As duas soluções foram misturadas e incubadas durante 2,5 h. à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento. Após conjugação, os precipitados formados foram separados do sobrenadante por meio de centrifugação durante 10 minutos a 16.000xg. O pellet com precipitados foi armazenado sobre gelo. O conjugado em solução foi purificado do excesso de peptídio CL3 livre por meio de aplicação do sobrenadante em colunas de dessalinização de dextrano D-Salt (corte de peso molecular de 5 kDa, Pierce) com tamponador de fluxo compreendendo 83 mM de fosfato de sódio, 0,9 M de NaCl pH 7,2. Frações de 0,5 ml foram recolhidas e determinou-se a concentração de proteína com o método BCA (Pierce). Presença de conjugado foi avaliada com SDS-PAGE/Coomassie e com um ELISA. As frações com conjugado foram

combinadas e o pellet isolado foi dissolvido subseqüentemente nas frações combinadas. Em seguida, conjugado de CL3-KLH foi dialisado contra 4 litros de PBS. A quantificação de proteína foi realizada usando-se o ensaio de proteína BCA (Pierce) e a suspensão de conjugado foi armazenada a 4°C. A concentração de CL3-KLH foi de 1,35 mg/ml. Para o ELISA, concentrações seriais de peptídio CL3 livre, EXiH livre e conjugado de CL3-KLH, e também tamponador de revestimento apenas foram aplicados revestindo poços de uma placa de 96 poços de alta ligação Microlon (Greiner). Após bloqueio com Reagente de Bloqueio (Roche) poços foram recobertos com soro anti-CL3 de camundongo diluído 500 vezes (ID-Lelystad, fornecido por A. Antonis, código YM30, III C11C7E8') em PBS/0,1 % vol/vol de Tween20. A ligação de anticorpo anti-CL3 foi visualizada usando RAMPO (DAKO Cytoination, P0260, lote 00020228)- 1,2-fenilenodiamina/H_2SO_4-leitura de absorbância a 490 nm. A fração de CL3 no conjugado de CL3-KLH foi estimada comparando-se a ligação de anticorpos com aquela obtida com o padrão de peptídio CL3 livre revestido. A relação de CL3 (:) KLH foi de aproximadamente 1(:)1.

Preparação de vacina: Formação de conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide compreendendo estrutura beta cruzada

Introdução de conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide nos vários antígenos é obtida usando-se diferentes técnicas de dobramento incorreto. A extensão do dobramento incorreto foi avaliada analisando-se a capacidade de uma solução de antígeno em incrementar a fluorescência de ThT e/ou avaliando-se a capacidade de estimular conversão mediada com tPA de plasminogênio a plasmina.

Método do dobramento incorreto I com H5: dobramento incorreto térmico cíclico de H5 misturado com OVA

Estoque de H5 usado para fins de dobramento incorreto 236

μg/ml de H5 em PBS lote 1 CS210406, OVA foi dissolvido em solução de H5 a uma concentração final de 1 mg/ml. Subseqüentemente, as soluções de H5/OVA foram submetidas a dobramento incorreto térmico cíclico de acordo com o procedimento descrito acima para PorA.

Método do dobramento incorreto II com H5 de células HEK293E: dobramento incorreto por meio de ciclização térmica com H5 conjugado com ovalbumina, usando acoplamento de EDC-NHS

O estoque de H5 usado compreendeu: 236 μg/ml de H5 nativa em PBS lote 1 CS210406. Similar a PorA (ver acima), H5 obtida de células HEK293E foi conjugada com OVA. Concentração de H5 e concentrações de OVA foram de 169 μg/ml e 1000 μg/ml, respectivamente. Após acoplamento, soluções foram dialisadas contra PBS. As soluções foram transferidas subseqüentemente para recipientes de PCR e conjugados foram mal-dobrados por meio de desnaturação térmica cíclica.

Método do dobramento incorreto III aplicado a H5: acoplamento de polipeptídio-A a polipeptídio-B por meio de ativação de glutaraldeído/NaBEU

De maneira similar a PorA, para acoplamento de H5 a OVA, ambas as proteínas foram ativadas com glutaraldeído e boroidreto de sódio e misturadas. Para este fim, 250 μg de OVA foram dissolvidos em 1 ml de solução de consumo de H5 e adicionou-se 180 μl de PBS. Glutaraldeído (solução a 25 % (v/v) em H_2O, Merck, Hohenbrunn, Alemanha, 8.20603.1000 (UN2927, tóxico), lote S4503603 549), pré-diluído a uma solução 100x a 4 % em H_2O foi adicionado a uma concentração final de 0,04 %. Após agitação com vórtice e uma incubação de 2 minutos à temperatura ambiente, uma solução 100x 120 mM de $NaBH_4$ (aprox. 98 %, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A., S9125, lote 53H3475) foi adicionada a uma concentração final de 1,2 mM. A solução foi submetida a agitação suficiente para se obter um vórtice e incubada durante 42 h à temperatura ambiente em um dispositivo de

rolamento. Em seguida, a solução foi dialisada extensivamente contra PBS. A solução de conjugado foi aquecida subseqüentemente durante cinco ciclos térmicos como descrito acima.

Método do dobramento incorreto I com H7: dobramento incorreto térmico cíclico de H7 livre ou H7 misturado com OVA

Estoque de H7 usado para fins de dobramento incorreto: 21,4 µg/ml de H7 em PBS lote 1 CS210406, solução de H7 foi, ou submetidos a dobramento incorreto térmico sem qualquer adição, ou H7 foi mal-dobrada termicamente após dissolução de OVA a uma concentração final de 1 mg/ml na solução de consumo de H7. Dobramento incorreto térmico cíclico foi realizado como descrito para PorA, acima.

Método do dobramento incorreto II com H7: dobramento incorreto por meio de ciclização térmica com H7 conjugada com ovalbumina, usando-se acoplamento de EDC-NHS

Estoque de H7 usado para fins de dobramento incorreto: 21,4 µg/ml de H7 em PBS lote 1 CS210406. Similar a PorA (ver acima), H7 expressa por células HEK293E foi conjugada com OVA. A concentração final de H7 foi de 10,7 µg/ml, a concentração de OVA foi de 1 mg/ml. Após acoplamento, a solução de conjugado foi dialisada contra PBS. A solução foi transferida subseqüentemente para recipientes de PCR e o conjugado foi mal-dobrado com desnaturação térmica cíclica, por meio de aplicação de um ciclo de 30°C a 85°C a 5°C/minuto, e rapidamente a 4°C.

Dobramento incorreto térmico cíclico de E2 de células Sf1

E2 purificada expressa por células Sf1 em PBS foi aquecida durante cinco ciclos em recipientes de PCR em um ciclizador térmico PTC-200 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, E.U.A.). Em cada ciclo, proteína foi aquecida de 30 a 85°C a uma taxa de 5°C/min, e rapidamente resfriada de volta a 30°C antes de iniciar um novo ciclo. Finalmente, E2 desnaturado com calor foi mantida a 4°C. A concentração final de E2 foi de 280 µg/ml (lote 2

030506RS).

Método do dobramento incorreto IV: Redução-alquilação de radicais Cys em E2 de células Sf1

E2 alquilada é obtida por meio de redução de ligações dissulfeto, seguido de alquilação dos radicais Cys livres formados. Primeiramente, adicionou-se uréia a uma concentração final de 8 M, a 353 µg/ml de E2 e isto foi misturado com centrifugação cuidadosa. Em seguida, adicionou-se ditiotreitol (DTT) a uma concentração final de 10 mM. Ar no tubo foi substituído por gás de nitrogênio para inibir possível oxidação das cisteínas reduzidas. Em seguida, isto foi incubado durante 2 h. à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento. Subseqüentemente, a solução foi resfriada (sobre gelo) e adicionou-se iodoacetamida (Sigma) a uma concentração final de 20 mM. Por fim, a E2 alquilada foi dialisada contra 1 l de PBS para 4 horas, seguido de 7 h. contra 5 l e 9 h. contra 5 l de PBS. A concentração de alquila-E2 após diálise foi determinada usando-se o ensaio de proteína BCA (Pierce), e foi de 167 µg/ml.

Método do dobramento incorreto I com E2 e OVA: dobramento incorreto por meio de ciclização térmica

Um mg de OVA foi dissolvido em 1 ml de solução de E2 em PBS (concentração de OVA é de 1 mg/ml, concentração de E2 é de 280 µg/ml; lote 2 030506RS). Soluções foram submetidas a dobramento incorreto térmico cíclico por meio de aquecimento de 30°C a 85°C em intervalos de 5°C/minuto, e resfriamento a 30^0C antes do início do ciclo seguinte (5 ciclos). Avaliou-se o incremento da fluorescência de ThT e incremento da atividade de tPA/plasminogênio atividade.

Método do dobramento incorreto II com E2 de células Sf1: dobramento incorreto por meio de ciclização térmica com E2 conjugada com ovalbumina ou KLH, usando-se acoplamento de EDC-NHS

Similar a PorA (ver acima), E2 obtida de células Sf1 foi

conjugada com OVA, ou com KLH. Concentração de E2 e concentrações de OVA foram de 193 μg/ml e 1047 μg/ml, respectivamente. Concentrações de E2 e KLH foram de 145 e 631 μg/ml, respectivamente. Após acoplamento, soluções foram dialisadas contra PBS. As soluções foram transferidas subseqüentemente para recipientes de PCR e conjugados foram mal-dobrados com desnaturação térmica cíclica.

Método do dobramento incorreto II com E2 de células 293E: dobramento incorreto por meio de ciclização térmica com E2 livre

Como descrito para PorA, E2 purificada de sobrenadante de cultura de células HEK293E (lote 1 210406CS, 561 μg/ml em PBS) foi submetido a dobramento incorreto térmico usando-se um aparelho de PCR.

Método do dobramento incorreto II com E2 de células 293E: dobramento incorreto por meio de ciclização térmica com E2 conjugada com ovalbumina ou KLH, usando acoplamento de EDC-NHS

Similar a PorA e a E2 de células Sfl (ver acima), E2 recombinante obtida de células HEK293E foi conjugada com OVA. Concentração de E2 e Concentrações de OVA foram de 561 μg/ml e 1 mg/ml, respectivamente. Após acoplamento, soluções foram dialisadas contra PBS. As soluções foram transferidas subseqüentemente para recipientes de PCR e conjugados foram mal-dobrados com desnaturação térmica cíclica. (lote 1 210406CS, 561 μg/ml em PBS).

Método do dobramento incorreto V: dobramento incorreto de peptídio CL3 livre: dobramento incorreto térmico

O peptídio CL3 livre foi dissolvido a 1 mg/ml em H_2O e usado diretamente para a preparação de vacinas, ou mantido a 65°C ou 37°C durante vários dias antes do uso em vacinas.

Método do dobramento incorreto I com peptídio CL3 e OVA: dobramento incorreto por meio de ciclização térmica

Um mg de OVA e 1 mg de peptídio CL3, ou 1 mg de KLH

liofilizado e 1 mg de peptídio CL3 foram misturados em dois recipientes separados e dissolvidos em 1 ml de PBS (todas as concentrações de proteína / peptídio são de 1 mg/ml). Soluções foram submetidas a dobramento incorreto térmico cíclico por meio de aquecimento de 30^{0}C a 85°C em intervalos de 5°C/minuto, e resfriamento a 30^{0}C antes do início do ciclo seguinte (5 ciclos). Como um controle positivo, 1 mg e 10 mg/ml OVA também foram submetidos a dobramento incorreto térmico cíclico. Avaliou-se o incremento da fluorescência de ThT e incremento da atividade de tPA/plasminogênio.

Método do dobramento incorreto II com peptídio CL3: dobramento incorreto por meio de ciclização térmica com CL3 conjugada com ovalbumina ou ELH, usando-se acoplamento de EDC-NHS

Similar a PorA (ver acima), peptídio CL3 foi conjugada com OVA, ou com KLH. Ambas as concentrações, de peptídio CL3 e de OVA ou KLH foram de 1,28 mg/ml. Após acoplamento, soluções foram dialisadas contra PBS. As soluções foram transferidas subseqüentemente para recipientes de PCR e conjugados foram mal-dobrados com desnaturação térmica cíclica.

Método do dobramento incorreto I com proteína CL3 e OVA: dobramento incorreto por meio de ciclização térmica

Um mg de OVA foi dissolvido em 1 ml de 30 μg/ml de proteína CL3 em PBS. As soluções foram submetidas a dobramento incorreto térmico cíclico por meio de aquecimento de 30^{0}C a 85°C em intervalos de 5°C/minuto, e resfriamento a 30^{0}C antes do início do ciclo seguinte (5 ciclos). Adicionalmente, o estoque de proteína CL3 a30 μg/ml em PBS foi mal-dobrado com ciclização térmica sem adição de proteína. Estoque de proteína CL3 usado foi o lote 1 010606CS (ver acima).

Resultados

Introdução de estrutura similar a amilóide em antígenos

Ovalbumina

OVA liofilizada foi dissolvida cuidadosamente deixando-se a mesma dobrar corretamente em um estado nativo, com o menor número possível de propriedades similares a amilóide. Apesar destes esforços, OVA apresenta características que são uma sinalizador da presença de pelo menos uma fração das moléculas com estrutura beta cruzada, como mostrado pela ativação incrementada com cortante de ThT específico para amilóide e pela ativação incrementada de tPA e plasminogênio (Figura 9A, B). Após dobramento incorreto térmico cíclico, contudo, sinais representativos da estrutura beta cruzada são muito mais pronunciados com OVA desnaturada (DOVA, Figura 9A, B). Os dados mostrados são medidas representativas para DOVA mal-dobrada similar a amilóide preparada rotineiramente e OVA com um dobragem mais nativa. As grandes diferenças no teor de beta cruzada tornam o par OVA/DOVA itens interessantes para fins de vacinação. Adição de DOVA a um antígeno nativo ou a um antígeno mal-dobrado parcialmente similar a amilóide serve como um potente adjuvante de estrutura beta cruzada.

H5 para vacina preparação de coquetel

H5 recombinante com um marcador FLAG carbóxi-terminal - marcador His foi expressa e purificada no próprio laboratório. Determinação das propriedades incrementadoras de fluorescência de ThT e propriedades de ativação de tPA/plasminogênio revelaram que a H5 purificada não-tratada já compreende algumas proteína com dobramento incorreto similar a amilóide (Figura 9C, D, E). No lote 1 210406CS de H5 parte das propriedades ativadoras de tPA são detectadas. Com H5 lote 2 a fração X 250506CS de avaliação das propriedades ativadoras de tPA/plasminogênio foi prejudicada devido à presença de atividade convertedora de substrato de plasmina na solução de H5, quando tPA foi omitido da mistura de reação. Quando da ciclização térmica de H5 misturada com OVA ou H5 conjugada com OVA usando-se EDC/NHS, fluorescência de ThT é fortemente incrementado, mostrando um incremento do teor de estrutura beta cruzada na solução de

antígeno de H5, em comparação com H5 não-tratada (Figura 9E). As preparações de H5 não foram só usadas para a preparação da vacina de coquetel de camundongo com E2, CL3 e H7, mas também foram usadas para imunização de camundongos com H5 monovalente.

H7 usada para vacina preparação de coquetel

H7 recombinante da cepa A/Netherlands/219/03 (*Protein Science*s Corp.) foi usado como uma fonte de antígeno não-tratado para preparação de uma vacina de coquetel juntamente com E2, H5, CL3, OVA. No entanto, nós detectamos alguma propriedade incrementadora da fluorescência de ThT com a H7 não-tratada, e também a ativação de tPA/plasminogênio foi incrementada por meio de introdução da H7 na mistura de reação (Figura 9F, G). Estes resultados mostram a presença de pelo menos uma pequena fração de moléculas de H7 com estrutura beta cruzada. Na Figura 9H e I mostra-se o incremento da fluorescência de ThT com H7 nativa recombinante produzida próprio laboratório, mistura termicamente mal-dobrada de 7 e OVA, e conjugado de H7-OVA mal-dobrado termicamente, obtido por meio de acoplamento de EDC/NHS, e também a influenciada sobre a atividade de tPA. Para o ensaio de ThT, soluções de consumo de H7 foram diluídas dez vezes. No ensaio de atividade de tPA/plasminogênio usou-se H7 a 1 μg/ml. Os ensaios mostram um incremento do teor de estrutura beta cruzada quando da misturação ou conjugação com OVA, seguido de ciclização térmica.

E2 expressa em células HEK293E para uso em uma vacina de coquetel

Proteína E2 recombinante de CSFV foi expressa no próprio laboratório em células HEK293E e purificada de sobrenadantes de cultura de células, e usada em ensaios de imunização de camundongo. E2 purificada foi submetida a dois métodos de dobramento incorreto: ciclização térmica entre 30 e 85°C com a E2 livre, ou ciclização térmica após conjugação de E2 com OVA, usando-se acoplamento de EDC/NHS. Na Figura 9J, observa-se

claramente um incremento da fluorescência de ThT quando se usa os métodos de dobramento incorreto. A influenciada sobre a atividade de tPA não pôde ser avaliada devido à atividade convertedora de substrato na solução de E2 purificada, indicativo da presença de quantidades em traços de protease similar a plasmina. Diferenças observadas entre E2 não-tratada e E2 mal-dobrada, na potência para incrementar a fluorescência de ThT mostram claramente o incremento no teor de estrutura beta cruzada quando se aplica os procedimentos de dobramento incorreto.

Peptídio CL3 usado para incorporação em uma vacina de coquetel

O fragmento de CL3 de 19 radicais de aminoácidos e uma extensão Cys amino-terminal para fins de acoplamento foi submetido a vários métodos de conjugação proteína-proteína e, subseqüentemente, a métodos de dobramento incorreto de proteína. Na Figura 9K e L mostra-se que todas as preparações de peptídio CL3 compreendem conformação de estrutura beta cruzada até certo grau, quando se refere à propriedade de incrementar a fluorescência de ThT e estimular adicionalmente tPA/plasminogênio. Mesmo o peptídio livre compreende estrutura beta cruzada após dissolução em H_2O.

Em um ensaio de ativação de tPA/plasminogênio, peptídio CL3 recentemente dissolvido e peptídio incubado a 65°C são ativadores de tPA os mais potentes, enquanto que incubações à temperatura ambiente ou a 37°C resultam em uma menor ativação do teor de estrutura beta cruzada (Figura 10D). A concentração de peptídio no ensaio foi de 200 μg/ml. Peptídios foram incubados no escuro durante vários dias nas temperaturas indicadas.

Antígeno de H5 beta cruzada para exposições a vírus de H5N1

A solução de consumo de H5 não-tratada para preparação de H5 mal-dobrado e para uso em preparações de vacina foi a solução de consumo de H5 recombinante a 236 μg/ml em PBS (lote 1 210406CS, cepa A/Vietnam/1203/2004) para a primeiro vacinação e a solução de 140 μg/ml de H5 em 25 mM de Tris pH 8,2, 500 mM de NaCl (lote 2 fração X

240506CS) para a segunda vacinação. H5 com conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide foi obtida, em ambos os lotes de H5, por meio de aplicação de métodos de dobramento incorreto I-III (ver acima). Na Figura 10A, o incremento da fluorescência de ThT é mostrado quando se testa 24 μg/ml de H5 de cada uma das quatro soluções de consumo. Está claro que as modificações introduzem um incremento significativo no teor de estrutura beta cruzada em todas as três preparações de H5 mal-dobrada, quando comparado com H5 não-tratada.

Antígeno de E2 de beta cruzada para exposições a CSFV

Para uma primeira vacinação contra CSFV usou-se E2 não-tratada, E2 mal-dobrada por via térmica cíclica (Método I) e alquila-E2 (Método IV) (lote 1 200406RS, 285 μg/ml em PBS). A presença de estrutura beta cruzada em alquila-E2 (Método do dobramento incorreto IV) e E2 mal-dobrada por via térmica cíclica (Método do dobramento incorreto I) é mostrada pela fluorescência fortemente incrementada de ThT e o incremento da ativação de tPA/plasminogênio (Figura 10B, C).

Para a segunda imunização usou-se novamente E2 recombinante expressa por células Sf1, agora do lote 2 030506RS, 280 μg/ml em PBS. E2 foi mal-dobrada usando-se quatro métodos de dobramento incorreto: desnaturação térmica cíclica de E2 livre (Método I), de E2 na presença de OVA (Método I), de conjugado de E2-OVA obtido por meio de acoplamento de EDC/NHS (Método II) e de conjugado de E2-KLH também obtido por meio de acoplamento de EDC/NHS (Método II). Estas preparações mal-dobradas de E2 - beta cruzada foram misturadas a 1:1:1:1 antes da incorporação em formulações de vacina.

Exemplo 11

Imunização de camundongos com um coquetel de vacina compreendendo antígeno E2 da Febre Suína Clássica, proteína e peptídio de catepsina L3 de antígeno de *Fasciola hepatica*, hemaglutinina 5 de antígeno da gripe

aviária e hemaglutinina 7 do antígeno da gripe aviária, juntamente com ovalbumina

Estudo dose-resposta e um teste para a imunogenicidade de antígeno adjuvantado com estrutura beta cruzada

Objetivo

Determinação de se antígeno E2 da Febre Suína Clássica, proteína e peptídio de catepsina L3 de antígeno de *Fasciola hepatica*, hemaglutinina 5 de antígeno da gripe aviária e hemaglutinina 7 do antígeno da gripe aviária, juntamente com antígeno de OVA com conformação de proteína mal-dobrada similar a amilóide, combinados em uma vacina de coquetel, elicitam titulações de anticorpos sem o uso adicional de um adjuvante: Adjuvação por meio de estrutura beta cruzada, i.e. com proteínas compreendendo propriedades amilóides, como definido aqui. Portanto, soros de camundongo foram analisados no dia 28 após a imunização para determinação de titulações de anticorpos contra antígenos individuais.

Soluções de consumo de antígeno

Soluções de proteína usadas para vacinação

I. Ovalbumina (albumina de ovo de galinha, OVA, Sigma; número de catálogo A5503) a 1 mg/ml em PBS foi preparada recentemente (dissolvida por meio de pipetação; 30 minutos em um dispositivo de rolamento à temperatura ambiente; 1 h a 37°C; 1 h de dispositivo de rolamento à temperatura ambiente; 4°C de armazenamento)

II. OVA mal-dobrada similar a amilóide (DOVA) a 1 mg/ml em PBS foi obtida de acordo com o protocolo de desnaturação com calor como descrito acima.

III. Peptídio de catepsina L3 (Ansynth Service B.V., Roosendaal, Países Baixos, lote BB1; seqüência CSNDVSWHEWKRMYNKEYNG (peptídio CL3 com extensão Cys amino-terminal)) foi dissolvido a 1 mg/ml em PBS e mantido a 4°C

IV. Conjugado de KLH-peptídio CL3 mal-dobrado similar a amilóide foi obtido por meio de desnaturação com calor (concentração do conjugado é de 1,35 mg/ml em PBS; aproximadamente 50 % de peptídio CL3) lote 1 05-2006RS (ver acima)

V. Proteína CL3 (30 μg/ml em PBS) lote 1 010606CS (ver acima)

VI. Proteína CL3 desnaturada com calor similar a amilóide (30 μg/ml em PBS) lote 1 010606CS

VII. Conjugado de OVA - proteína CL3 mal-dobrada similar a amilóide, desnaturado com calor (30 μg/ml em PBS) lote 1 010606CS

VIII. E2 (561 μg/ml em PBS) lote 1 210406CS (ver acima)

IX. E2 mal-dobrada similar a amilóide desnaturada com calor (561 μg/ml em PBS) lote 1 210406CS

X. Conjugado de OVA - E2 mal-dobrado similar a amilóide, desnaturado com calor (561 μg/ml em PBS) lote 1 210406CS

XI. H5 (236 μg/ml em PBS) lote 1 210406CS

XII. Mistura de proteína de H5 e OVA mal-dobrada similar a amilóide, desnaturada com calor (140 μg/ml em PBS) lote 2 fração X 250506CS

XIII. Conjugado de OVA-H5 mal-dobrado similar a amilóide, desnaturado com calor (143 μg/ml em PBS) lote 2 fração X 250506CS

XIV. Estoque I de H7 (10,5 μg/ml em PBS) lote 2 05-2006CS (ver acima)

XV. Mistura de proteína de OVA e H7 mal-dobrada similar a amilóide, desnaturada com calor (10,5 μg/ml em PBS) lote 2 05-2006CS

XVI. Conjugado de OVA-H7 mal-dobrado similar a amilóide, desnaturado com calor (10,6 μg/ml em PBS) lote 2 05-2006CS

XVII. Estoque II de H7, 603 μg/ml (A/Netherlands/219/03, *Protein Sciences Corp.*, Meriden, CT, E.U.A.; número de catálogo 3006, lote 112305, tamponador: 10 mM de Na-HPO_4, pH 7,0, 150 mM de NaCl)

Montagem experimental: preparação de vacina e vacinação

Para a preparação de doses de vacinas de coquetel, preparou-se duas soluções; 1. 20 μg/ml de cada um dos antígenos não-adjuvantados, 2. 2 μg/ml de H7 mal-dobrada e 19 μg/ml de cada um dos outros antígenos adjuvantados com beta cruzada. Os estoques de coquetel de 2 μg/ml de antígeno foram preparados por meio de diluição de décupla destes estoques (solução 3. e 4.). As vacinas com 10 μg/ml de antígeno não-adjuvantado / 10 μg/ml de antígeno adjuvantado com beta cruzada e com 1 μg/ml de antígeno não-adjuvantado / 1 μg/ml de antígeno adjuvantado com beta cruzada, foram preparadas por meio de misturação na proporção de 1:1 de soluções 1. e 2., ou 3. e 4., respectivamente (solução 5. e 6.).

Solução 1.

Antígenos I, III, V, VIII, XI e XVII em PBS

Solução 2.

Antígenos II, IV, VI, VII, IX, X, XII, XIII, XV e XVI em PBS

Para imunizações usou-se camundongos GAnNHSd/BalB fêmeas com de 7 a 9 semanas de vida (BalB/C, Harlan; seis grupos de cinco camundongos) (Animal Facility 'Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium' GDL, Utrecht University, Países Baixos). Após aproximadamente uma semana de adaptação ao ambiente extraiu-se sangue para coleta de soro pré-imune no dia -4. No dia 0 cada camundongo recebeu uma vacinação injetada subcutaneamente de 500 μl de acordo com o esquema a seguir:

grupo a	coquetel de antígeno não-adjuvantado a 100 %, 10 μg/antígeno/camundongo (controle)
grupo b	coquetel de antígeno não-adjuvantado a 50 % /adjuvantado com beta cruzada a 50 %, 10 μg/antígeno/camundongo
grupo c	coquetel de antígeno adjuvantado com beta cruzada a 100 %, 10 μg/antígeno/camundongo
grupo d	coquetel de antígeno não-adjuvantado a 100 %, 1 μg/antígeno/camundongo (controle)
grupo e	coquetel de antígeno não adjuvantado a 50 %/antígeno adjuvantado com beta cruzada a 50 %, 1 μg/antígeno/camundongo
grupo f	coquetel de antígeno adjuvantado com beta cruzada a 100 %, 1 μg/antígeno/camundongo

Determinação de titulação de anticorpos anti-antígeno com ELISA

Como soros obtidos no dia 21 após a vacinação, titulações de anticorpos desenvolvidas contra cada um dos componentes do coquetel de vacina foram avaliadas empregando-se técnicas de ELISA convencionais. O protocolo foi como descrito para o conjugado de CL3-KLH. Para cada grupo de camundongos a-f, soros foram combinados e preparou-se diluições seriais em PBS/0,1 % Tween20. Antígenos revestidos são dados abaixo. Diluições seriais de anticorpos de controle reconhecendo peptídio CL3, E2, H5 ou H7 são usadas como controle positivo nos ELISAs. H5 e H7 foram revestidas a 2,5 μg/ml, solução de consumo de E2 de Cedi-Diagnostics foi diluída 100 vezes antes do revestimento, peptídio CL3 foi revestido a 10 μg/ml.

Soluções de proteína usadas como antígeno em ELISAs de titulação de anticorpos

- antígeno E2 liofilizado, reconstituído de acordo com a recomendação do fabricante (Ceditest CSFV, Cedi-Diagnostics B.V., Lelystad, Países Baixos)

- H5, 83 μg/ml de H5 (A/Vietnam/1203/2004(H5N1), *Protein Sciences* Corp., Meriden, CT, E.U.A.), número de catálogo 3006, lote 45-05034RA-2, tamponador: 10 mM de Na-HPO_4, pH 7,0, 150 mM de NaCl

- H7, 603 μg/ml de H7 (A/Netherlands/219/03, *Protein Sciences* Corp., Meriden, CT, E.U.A.), número de catálogo 3006, lote 112305, tamponador: 10 mM Na-HPO_4, pH 7,0, 150 mM de NaCl

- peptídio CL3 (fração a 4°C, lote BB1, Ansynth Service B.V., Roosendaal, Países Baixos) NH_2 - CSNDVSWHEWKRMYNKEYNG - COOH (peptídio CL3 com extensão Cys N-terminal)

- OVA, 10 mg/ml em PBS (estoque 060613NH-4°C; número de catálogo A-5503, lote 14H7035, Sigma)

- DOVA, 10 mg/ml em PBS (estoque 060613NH-4°C), desnaturada com calor

Materiais usadas para ELISAs de titulação

- placas de ELISA Microlon de alta ligação (Greiner, número de catálogo 655092)

- tamponador de revestimento: 50 mM de $NaHCO_3$, pH 9,6

- Reagente de Bloqueio (Roche, número de catálogo 11112589001)

- tamponador de lavagem: 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0,1 % Tween20, pH 7,3

- soros de camundongo de animais individuais, coletados no dia -4 e dia 28 após a vacinação

- soro de camundongo anti-H5N1 ('ID-Lelystad (Dr L. Cornelissen) H5N1, gr5, 40106, 2.02.24150.00, nd2579jet, 180 µl') -> soro anti-H5 de controle

- anticorpo anti-E2, conjugado com HRP (Art. 7610384, lote 06C052, Cedi Diagnostics B. V., Lelystad, Países Baixos)

- soro anti-CL3, camundongo (ID-Lelystad (A. Antonis) YM30 III, cllc7e8) -> soro anti-CL3 de controle

- albumina de ovo (OVA) anti-galinha de fluido de ascites de camundongo, clone OVA- 14, IgG1, (Sigma, A6075, lote 074K4768 -> ascites anti-OVA de controle

- soro anti-H7N7 de camundongo (´muis-anti-H7N7, dpi: 14 groep 6, 040106', ID-Lelystad, Dr L. Cornelissen) -> soro anti-H7 de controle

- tamponador de ligação: 140 mM de cloreto de sódio, 2,7 mM de cloreto de potássio, 10 mM de hidrogênio fosfato de sódio, 1,8 mM de diidrogênio fosfato de potássio, pH 7,3 (PBS) com 0,1 % de Tween20

- imunoglobulinas anti-camundongo de coelho conjugadas com peroxidase (RAMPO, P0260, DAKOCytomation, Glostrup, Dinamarca)

- PBS

- H_2O_2: 35 % vol/vol (Merck, Darmstadt, Alemanha)

- OPD: 1,2-fenilenodiamina (Merck, número de catálogo 1.07243.0050, lote L937543-84)

- citrato/fosfato tamponador pH 5,0

- 10 % vol/vol H_2SO_4 em H_2O

- espectrofotômetro Spectramax para leituras A_{490nm}

Resultados

Titulações anti-antígeno em soros de camundongos no dia 28 após a vacinação

Camundongos Balb/c foram imunizados com uma vacina de coquetel com 1 ou 10 μg de antígenos/animal. O coquetel continha E2, CL3, H5, H7 e OVA, e/ou contrapartes mal-dobradas similares a amilóide. Diferenças no teor de estrutura beta cruzada entre as vacinas para os seis grupos de camundongos são ilustradas na Figura 11. A propriedade de incrementar a atividade de tPA/plasminogênio foi avaliada com coquetéis de antígeno compreendendo 20 ug/ml de cada um dos antígenos, com 0, 50 e 100 % de conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide, respectivamente. Estes teores relativos de proteína com dobramento incorreto são refletidos na capacidade de ativar tPA, que segue a mesma ordem. Que a solução de coquetel de antígeno não-tratada a 100 % também ativa tPA até certo grau é explicada pelo fato de que pelo menos peptídio não-tratado CL3, H5 e OVA apresentam algumas características da presença de um pequeno teor de estrutura beta cruzada mesmo sem tratamento para induzir referidas características. A mesma ordem de sinais, como se vê no ensaio de ativação de tPA, é observada com diluições de 10 vezes dos coquetéis em ensaios de vermelho Congo e fluorescência de ThT (Figura 11B, C).

Com soros de camundongo combinados que foram coletados no dia 28 após a vacinação, determinou-se na montagem de ELISA descrita as titulações contra cada um dos antígenos não-tratados individuais presentes na vacina de coquetel. Adicionalmente, titulações contra DOVA também foram

testadas para verificar se são capazes de analisar a eficácia da OVA adjuvantada com estrutura beta cruzada mal-dobrada similar a amilóide.

Não se encontrou titulações nos soros contra peptídio CL3 livre revestido ou contra H5 não-tratado. Titulações serão analisadas novamente pelo menos 14 dias após os camundongos terem recebido uma segunda dose dos antígenos, o que pode, neste caso, ser necessário para se obter uma titulação detectável.

Titulações similares foram desenvolvidas contra H7 não tratada e a mistura a 1:1 de H7 não-tratada e H7 adjuvantada com beta cruzada, em ambas as doses de 1 e 10 μg/animal (mostrado para a dose de 10 μg/animal na Figura 12A). A presença de uma quantidade razoável de moléculas de H7 com conformação de estrutura beta cruzada similar a amilóide na solução de consumo de H7 não-tratada (ver Figura 9F, G) explica a imunogenicidade observada.

Quando titulações desenvolvidas contra antígeno de E2 revestido são determinadas após uma vacinação de dose única, camundongos que receberam 5 ou 10 μg de E2 adjuvantada com beta cruzada, expresso em células HEK293E, desenvolveram uma titulação (Figura 12B). Aparentemente, após uma dose única, nenhuma titulação é elicitada quando camundongos são vacinados com 1 μg de E2/animal apenas. É interessante observar que, quando camundongos são imunizados com E2 mal-dobrada 100 % similar a amilóide expresso em células HEK293, compreendendo uma extensão marcador FLAG carbóxi - marcador His (grupo c), desenvolve-se ainda uma titulação de anticorpo contra a E2 não-tratada expressa em células Sf1. Estas observações demonstram o uso benéfico da adjuvantação por meio da tecnologia de estrutura beta cruzada. Importante observar que sem o uso de um adjuvante, nenhuma titulação foi elicitada quando se usou E2 não-tratada como o antígeno. Com E2 beta cruzada adjuvantada a 50 ou 100 % desenvolveram-se, contudo, titulações, sem o uso de um adjuvante. Nos seis

coquetéis de antígeno, inclui-se OVA devido a suas características imunogênicas. Grupo a e d contêm 20 e 2 μg de OVA/ml, grupo c e f contêm 20 e 2 μg/ml de DOVA e uma quantidade adicional de DOVA devido ao uso de conjugados OVA-antígeno mal-dobrados. Dos experimentos mostrados na Figura 9A e B já foi possível aprender que OVA compreende uma quantidade relativamente pequena, embora não desprezível, de estrutura beta cruzada, quando comparado com DOVA. Dos ensaios de imunização, aprende-se agora que esta pequena quantidade não pode elicitar uma titulação anti-OVA ou anti-DOVA (Figura 12C, D). Em contraste, DOVA em coquetéis de vacina b, c e e elicita ambas as titulações, anti-DOVA e anti-OVA. Está claro que se obtém uma titulação mais potente contra OVA, quando OVA é parte do coquetel de antígeno (grupo b comparado com grupo c; grupo e comparado com grupo f (nenhuma titulação). Quando se usa 10 ou 20 μg/ml de DOVA, atinge-se titulações mais altas do que com 1 ou 2 μg/ml de DOVA. Estas observações mostram que DOVA compreendendo teor incrementado de estrutura beta cruzada, é um estimulador mais potente de imunogenicidade do que OVA, que só contém um teor menor de estrutura beta cruzada. Adicionalmente, está claro que OVA sozinha não elicita uma titulação contra OVA ou DOVA, enquanto que quando DOVA e OVA são combinadas, obtém-se as titulações mais altas contra ambas as ocorrências do antígeno. Quando se compara as titulações desenvolvidas com coquetel de antígeno a e c, está claro que a formação de conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide compreendendo estrutura beta cruzada em OVA é suficiente para desenvolver titulações anti-antígeno, sem o uso de um adjuvante. Isto proporciona evidência direta para a propriedade adjuvante de estrutura beta cruzada e a tecnologia de 'adjuvantação por meio de estrutura beta cruzada'. Isto consubstancia o potencial imunogênico da conformação de estrutura beta cruzada, que pode ser adotada virtualmente por qualquer polipeptídio, irrespectivamente da seqüência de aminoácidos ou do

comprimento da seqüência. Mais especificamente, este exemplo de OVA/DOVA demonstra que a combinação de antígeno não-tratado com antígeno beta cruzada proporciona um estimulador potente do sistema imunológico.

Exemplo 12

Adjuvantação de estrutura beta cruzada de uma vacina de subunidade de H5 e vacina de subunidade de H7 induz maiores titulações de anticorpos e vacinação de H5 de beta cruzada protege camundongos contra exposição a dose letal de vírus da gripe aviária (AIV) H5N1

Estudo de vacinação de camundongos com uma vacina de subunidade de H5

Objetivo

Determinação de se uma vacina de subunidade compreendendo antígeno de H5 do AIV com conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide (H5 adjuvantada com estrutura beta cruzada) elicita titulações de anticorpos e protege camundongos contra uma exposição ao AIV H5N1.

Introdução

Influenza, em particular influenza causada por influenza de subtipo A (H5N1) impõe uma ameaça pandêmica importante. Por esta razão, manter a saúde pública requer prevenir ou tratar a disseminação e infecção com AIV, em particular H5N1. A chave para se atingir estes objetivos é o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas. Há dois gêneros de vírus de influenza: um incluindo os vírus de influenza A e B, e o outro os vírus de influenza C. Influenza B e C são vírus humanos, enquanto que influenza A replica e circula em uma ampla faixa de hospedeiros aviários e mamíferos. Destes, os vírus de influenza A geralmente causam os problemas mais sérios, tanto economicamente como em termos de saúde humana. Vírus de influenza A apresentam genomas segmentados de RNA de sentido negativo de

filamento simples, que são encapsulados por uma nucleoproteína codificada viralmente. O vírus codifica dois importantes antígenos de superfície viral, glicoproteína de hemaglutinina (HA ou H) e neuraminidase (NA ou N). Os antígenos de superfície viral HA e NA são classificados sorologicamente em subtipos; até hoje identificou-se 15 subtipos HA e 9 NA na natureza. Todos os subtipos circulam ubiqüamente em aves aquáticas selvagens, como patos, e estes hospedeiros aviários proporcionam o reservatório natural par todos os vírus de influenza A. Nestas espécies, infecções localizam-se geralmente no trato intestinal, e altas concentrações de vírus são desprendidas nas fezes sem causar doença. A HA é responsável pela ligação de partículas de vírus a receptores de superfície celular contendo ácido siálico e, após endocitose, pela mediação de fusão das membranas viral e celular. É uma glicoproteína de membrana de tipo I contendo uma seqüência-sinal que é removida após a tradução, um domínio de âncora de membrana próximo da ponta carbóxi, e uma curta cauda citoplasmática. A HA é sintetizada como um precursor de aproximadamente 75 kDa que se associa não-covalentemente como homo-trímeros. Os polipeptídios precursores são clivados, após a tradução, em um radical arginina conservado, em duas subunidades, que são ligadas por uma única ponte dissulfeto. HA é o principal antígeno de vacina.

Portanto, até o presente, todas as vacinas de influenza correntemente licenciadas são geradas em ovos de galinha embrionados. Diversas desvantagens bem reconhecidas do uso de referidos ovos como o substrato para a produção de vacina de influenza incluem a vulnerabilidade potencial do suprimento de ovos, o longo tempo requerido para aumentar a escala da produção de ovos, e a necessidade de adaptar novas variantes para crescimento de alto rendimento em ovos, um processo que pode ser demorado e nem sempre bem sucedido. Adicionalmente, crescimento em ovos pode resultar na seleção de variantes de receptor que podem ser não ser ótimas para a proteção contra cepas circulantes. Além disso, estudos recentes em humanos

indicaram que uma abordagem usando uma vacina de influenza A de subvírion (H5N1) inativada pode resultar em respostas de anticorpo no soro, incluindo a formação de anticorpos neutralizadores, mas mostraram que a resposta foi incompleta e requer quantidades substanciais de antígeno [6,7]. A freqüência de resposta de anticorpo foi a maior entre sujeitos que recebem doses de 45 μg ou 90 μg. Entre aqueles que receberam duas doses de 90 μg, titulações de anticorpos de neutralização atingiram 1:40 ou mais de 54 porcento, e titulações de inibição de hemaglutinação atingiram 1:40 ou mais de 58 porcento. Titulações de neutralização de 1:40 ou maiores foram observadas em 43 porcento, 22 porcento, e 9 porcento dos sujeitos que recebem duas doses de 45, 15, e 7,5 μg, respectivamente. Não se observou respostas em pacientes de placebo. Portanto, vacinas de influenza precisam ser aperfeiçoadas.

Um método alternativo para a produção de vacina de influenza é a expressão do antígeno de vacina principal, HA, por meio de técnicas de DNA recombinante. Em um estudo recente, avaliou-se uma vacina de subunidade contendo uma HA (H1 e H3), derivada de subtipos A/Panama/2007/99 (H3N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), e B/Hong Kong/330/2001, e produzida em células de insetos por meio de um baculovírus recombinante [8]. Esta alternativa evita a dependência de ovos, e a expressão eficiente de proteína, neste caso usando um sistema de expressão de baculovírus. Vacina de HA expressa em baculovírus foi segura e, comparada com vacina de influenza inativada trivalente, induziu melhores respostas de anticorpo no soro ao componente H3 quando administrada em doses de 45 μg ou 135 μg de cada HA. Ainda assim, mesmo quando se administrou 135 μg, o número de responsores não foi completo (entre 16 e 88 %, dependendo do subtipo e da quantidade de vacina administrada). Estes estudos usaram vacinas sem adjuvante, porque não há adjuvante bom para uso com uma vacina de influenza.

O objetivo do presente estudo foi avaliar se adjuvantação de uma vacina de subunidade de HA com estrutura beta cruzada resulta em melhor imunogenicidade, e se referida vacina protege camundongos da exposição ao AIV H5N1.

Materiais e métodos

Imunização

Usou-se oitenta e oito camundongos Balb/C fêmeas. Camundongos foram alojados nas instalações de ID-Lelystad, Países Baixos. Os camundongos tinham aproximadamente seis semanas [de vida] no início do estudo. Camundongos foram alocados randomicamente a um grupo de vacina ou grupo de controle, cada um dos 11 grupos compreendia oito animais. O animais foram deixados com comida (2185 RMH/B) e bebida à vontade.

Para imunizações de camundongos com H5 não-tratada e solução de consumo de H5 de beta cruzada usada para formulação de vacina, a solução de consumo de H5-beta cruzada usada para formulação de vacina foi o estoque de H5 recombinante a 236 μg/ml em PBS (lote 1 210406CS, cepa A/Vietnam/1203/2004) para a primeira vacinação, e a solução de H5 a 140 μg/ml em 25 mM de Tris pH 8,2, 500 mM de NaCl (lote 2 fração X 240506CS) para a segunda vacinação. Para formulações de vacina usou-se três preparações de H5 mal-dobrada similar a amilóide numa relação a 1:1:1 (ver abaixo). Para cinco grupos de camundongos (oito animais em cada grupo), formulou-se as seguintes preparações, para doses de 5 μg H5/animal:

-> grupo 2, H5 não-tratada a 100 %

-> grupo 3, H5 não-tratada a 67% H5 / H5 mal-dobrada a 33 %

-> grupo 4, H5 não-tratada a 33 % / H5 mal-dobrada a 67 %

-> grupo 5, H5 mal-dobrada a 100 %

Para imunizações de camundongos com vacina de H7 de subunidade de gripe aviária, vacinas foram formuladas usando-se H7 lote 2

(160506CS, 10,5 μg/ml em PBS). Para formulações de vacina compreendendo H7 mal-dobrada similar a amilóide, usou-se a H7 de beta cruzada obtida com métodos de dobramento incorreto I e II. H7 livre foi mal-dobrada, e também H7 misturada com OVA e H7 conjugada com OVA usando-se acoplamento de EDC/NHS.

No dia 0 e 21 os camundongos foram imunizados subcutaneamente com 0,5 ml de amostra de teste, na nuca (dia 0) e do lado esquerdo (dia 21). Grupo T01 (controle, #1.1-1.8) recebeu amostra de teste 1 (água, placebo), grupo T02 (#2.1-2.8) recebeu amostra 2 (5 μg de H5 não-tratada), grupo T03 (#3.1-3.8) recebeu amostra 3 (H5 não-tratada combinada com 33 % de H5 de beta cruzada modificada com o método I, II, III), grupo T04 (#4.1-4.8) recebeu amostra 4 (H5 não-tratada combinada com H5 de beta cruzada a 66 % modificada com o método I-III), grupo T05 (#5.1-5.8) recebeu amostra 5 (H5 de beta cruzada a 100 % modificada com o método I-III), grupo T06 (#6.1-6.8) recebeu amostra 6 (0,5 μg de H7 não-tratada), grupo T07 (#7.1-7.8) recebeu amostra 7 (H7 não-tratada combinada com H7 modificada com beta cruzada a 33 % modificada com o método I, II), grupo T08 (#8.1-8.8) recebeu a amostra 8 (H7 não-tratada combinada com H7 de beta cruzada a 33 % modificada com o método I, II), grupo T09 (#9.1-9.8) recebeu amostra 9 (H7 de beta cruzada a 100 % modificada com o método I, II), grupo T10 (#10.1-10.8) recebeu amostra 10 (vacina, Gallimune® FLU H5N9, lote F38785C, compreendendo vírus da gripe aviária inativado (H5N9, cepa A/Turkey/Wisconsin/68) e grupo T11 (#11.1-11.8) recebeu amostra 11 (H7 não-tratada adjuvantada com Specol). No caso de H5, em todos os casos administrou-se 5 μg de H5 ao todo (não-tratada combinada com modificada) em PBS. No caso de H7, em todos os casos administrou-se 0,5 μg de H7 ao todo em PBS.

Exposição

No dia 24, camundongos (grupos TO1, T03 e T10) foram

expostos por meio de inoculação intranasal com 50 µl compreendendo uma dose de 20 LD_{50} ($2*10^5$ TCID50/ml) de AIV H5N1 A/156/97/HK.

Avaliação e exame

Durante o curso de todo o estudo, os animais foram monitorados uma vez por dia (escore clínico de 0-4, mortos, sendo que (O) é definido como saudável, (1) é definido como um pelo áspero, vital, (2) pele áspera, enrolada, menos reativa, passiva durante o manuseio, (3) é definido como pêlo áspero, enrolado, respiração acelerada, menos reativa, passiva durante o manuseio, e (4) é definido como pelo áspero, enrolado, respiração acelerada, menos reativa, passiva durante o manuseio, incapaz de virar-se quando deitado de costas). O escore total foi obtido multiplicando-se o escore pelo número de animais por este escore. O número de animais que sofrem de problemas respiratórios foi calculado contando-se o número de animais em cada grupo com um escore de 3.

Amostras de sangue para coleta de soro foram retiradas da veia caudal no dia 0, 21, 33, 42 (exposição) e 56. Deixou-se o sangue coagular e obteve-se subseqüentemente o soro após centrifugação (5 minutos a 3500 rpm). Soros foram armazenados a -20°C.

Titulações de anticorpos anti-H5 e titulações de anticorpos anti-H7 foram avaliadas com soros de camundongo coletado no dia -1 e dia 33, doze dias após a segunda vacinação com a mesma dose de 5 µg de H5/animal ou 0,5 µg de H7/animal. O antígeno de H5 usado para vacinações foi expresso em células HEK293E e compreendeu uma extensão de marcador FLAG carbóxi-terminal - marcador His. Para determinações de titulações usou-se o antígeno de H5 da mesma cepa H5N1 adquirido da *Protein Sciences Corp.* Para determinações de titulações relativas a anticorpos anti-H7, adquiriu-se H7 recombinante da mesma cepa (A/Netherlands/219/03) da *Protein Sciences Corp.*

Como soros coletados no dia -1 e 33 de camundongos,

realizou-se determinações de titulação com relação a OVA. Para este fim, soros dos oito animais em um grupo foram combinados. Usou-se combinados de soros combinados coletados no dia -1 como o controle negativo.

Resultados

Oitenta e oito camundongos (11 grupos com 8 animais em cada grupo) foram usados para o estudo. Cada camundongo foi vacinado no dia 0 e 21 com placebo (água, grupo T01) ou uma vacina de subunidade contendo glicoproteína H5 ou H7 estrutura produzida recombinantemente (grupos T02-T09, T11) ou uma vacina de vírus H5N9 inativado (grupo T10). Camundongos em três grupos (T01, T03 e T10) foram expostos no dia 42 por meio de inoculação intranasal com 50 µl compreendendo uma dose de 20 LD_{50} ($2*10^5$ TCID50/ml) de AIV H5N1 A/156/97/HK.

Na Figura 13A e B mostra-se determinações de titulações com soros de camundongo combinados coletados no dia 33 e com antígeno de H5 ou H7 nativo revestido de uma fonte diferente.

Soro coletado do grupo T01, que recebeu vacina de placebo (i.e. água), não contém anticorpos anti-H5 ou anti-H7. Nos camundongos que foram vacinados com várias vacinas de H5, grupos que receberam H5 não-tratada sem adjuvante (T02) ou H5 de beta cruzada adjuvantada a 100 % desenvolveram titulações menores, se comparado com titulações obtidas após vacinação com H5 de beta cruzada adjuvantada a 33 % ou 67 %. Estas duas últimas vacinas foram tão potentes quanto vacina de H5N9 inativado com relação à titulação elicitada (Figura 13A). Estes resultados demonstram que, incluindo-se antígeno adjuvantado com beta cruzada antígeno na vacina de H5 obtém-se uma resposta imune comparável com vacina de vírus inativado adjuvantada convencionalmente. Antígeno de H5 adjuvantada com beta cruzada a 100 % é uma porção menos imunogênica em comparação com vacinas compreendendo uma fração de antígeno adjuvantado com beta cruzada juntamente com antígeno não-tratado/não-adjuvantado. Com base nas

titulações, grupos T01, T03 e T10 foram submetidos a um experimento de exposição a vírus H5N1.

Com soros individuais de camundongos de grupos T01 (placebo), T03 (H5 adjuvantada com beta cruzada a 33 %) e T10 (vacina de vírus H5N9 inativado), que foram submetidos a exposição ao vírus H5N1, determinou-se titulações contra H5 nativa adquirida da *Protein Sciences Corp.* (H5 usada para vacinação foi produzida no próprio laboratório em células HEK293E). Na Figura 13E e F titulações são ilustradas para T03 e T10. Não se observou titulações maiores do que as obtidas com soro pré-imune combinado (não mostrado). Para T03, desenvolveram-se titulações em camundongos individuais aproximadamente na ordem camundongo 5 = 6 = 7 > 8 > 1 = 2 = 4 > 3 > combinado pré-imune = nenhuma titulação. Para T10, a ordem é camundongo 6 > 2 = 4 > 3 = 8 > 1 = 5 > 7 > combinado de soro pré-imune = nenhuma titulação. Estas diferenças na intensidade da resposta imune são refletidas no grau de proteção contra exposição a vírus H5N1.

Para o estudo de H7, a ordem de intensidade das titulações de anticorpos anti-H7 elicitadas foi de H7/Specol > H7 de beta cruzada a 33 % > H7 de beta cruzada a 67 % > H7 não-tratada/não-adjuvantada ~ 100 % H7 de beta cruzada ~ placebo. Assim, novamente, está claro que H7 adjuvantada com estrutura beta cruzada é uma vacina efetiva quando se considera titulações de anticorpos. Novamente, de forma similar a H5, antígeno não-tratado/não-adjuvantado e antígeno adjuvantado com beta cruzada a 100 % sem o uso de antígeno nativo são menos imunogênicos em comparação com vacinas compreendendo antígeno adjuvantado com beta cruzada a 33 % ou 67 %.

Na Figura 13C, considera-se titulações contra OVA em soros combinados obtidos no dia 33 após a vacinação com placebo ou H5 adjuvantada com beta cruzada ou H5 não-tratada/não-adjuvantada. Para OVA, a ordem de titulações anti-OVA desenvolvidas é H5 adjuvantada com beta

cruzada a 100 % > H5 adjuvantada com beta cruzada a 67 % > H5 adjuvantada com beta cruzada a 33 % ≥ H5 não-tratada/não-adjuvantada ~ soro pré-imune. As vacinas formuladas com H5 adjuvantada com beta cruzada a 33, 67 e 100 % compreendem uma quantidade crescente de OVA mal-dobrada similar a amilóide (DOVA). Quando se considera OVA, antígeno dobrado inativamente não precisar ser parte da formulação de vacina. Aparentemente, em DOVA uma densidade razoável de epítopos similares a nativos é exposta, a que titulações de reação cruzada são elicitadas. Os resultados provam, portanto, que antígenos com estrutura beta cruzada são vantajosos para uso em vacinas para elicitar uma resposta imune desejada contra um antígeno nativo.

Em conjunto, estes estudos mostram que boas titulações de anticorpos são obtidas com o uso de estrutura beta cruzada como adjuvante, sem a necessidade de incluir um adjuvante convencional na formulação de vacina. (Embora não necessário, evidentemente também é possível usar uma combinação de um adjuvante de estrutura beta e um adjuvante convencional, opcionalmente numa dose menor do que doses convencionais, em alguns casos) em camundongos não-vacinados os primeiros sinais clínicos foram observados 3 dias após a infecção. Os sinais foram observados até o término do estudo. Do dia 7 todos os animais no grupo não vacinado sofreram de sintomas respiratórios. Seis de 8 animais morreram ou precisaram ser eutanizados antes do término do estudo. Um animal morreu no dia 1 após a infecção, sem sinais de doença. Todos os animais vacinados sobreviveram à exposição (Figura 13D). Quando da vacinação com Gallimune® FLU H5N9, grupo T10, nem todos os sinais de infecção puderam ser prevenidos, mas nenhum dos animais sofreu de sintomas respiratórios. De maneira similar, vacinação com H5 adjuvantada com beta cruzada H5 resultou em uma diminuição dos sintomas respiratórios. Com ambos os regimes de vacina, todos os camundongos recuperaram-se completamente. Observou-se efeitos

adversos em todos os camundongos quando da vacinação e exposição a vacina comercialmente obtenível (Tabela 25).

Tabela 26 mostra os escores clínicos após exposição. Tabela 27 mostra o escore de sintomas respiratórios. Tabela 28 mostra mortalidade quando da exposição a H5N1. Titulações de anticorpo de hemaglutinina são mostradas na Tabela 29.

Combinados, estes estudos mostram que a adição de H5 ou H7 adjuvantada com beta cruzada a uma vacina incrementa as titulações de anticorpos e que vacinação de camundongos com H5 adjuvantada com beta cruzada reduz sintomas clínicos e protege camundongos da morte como uma conseqüência de infecção com H5N1. Assim, a adição de estrutura beta cruzada permite imunogenicidade protetora.

Exemplo 13

Vacina de subunidade de E2 adjuvantada com estrutura beta cruzada protege porcos de morte após exposição a dose letal de Vírus da Febre Suína Clássica

Estudo de vacinação de porcos com uma vacina de subunidade de E2

Objetivo

Determinação se uma vacina de subunidade compreendendo antígeno de E2 com conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide elicita titulações de anticorpos e protege porcos de uma dose letal de vírus da febre suína clássica vírus da febre suína clássica.

Introdução

Febre Suína Clássica (CSF, sinônimo de cólera dos porcos) é uma doença suína contagiosa e freqüentemente fatal, caracterizado por febre, hemorragias, ataxia, e imunossupressão. O agente causativo é vírus da febre suína clássica (CSFV), um membro do gênero Pestivírus da família Flaviviridae. Em muitos países europeus, o vírus não endêmico, porém

periodicamente ocorrem surtos de CSF, e podem causar grandes perdas econômicas. Após infecção com CSFV, anticorpos são desenvolvidos contra as glicoproteínas estruturais E2 e Erns, e a proteína não-estrutural NS3, E2 é a proteína de envelope do CSFV mais imunogênica e induz uma resposta de anticorpo neutralizador em porcos. Vacinas baseadas no CSFV inativado induzem uma resposta imune rápida e protetora. No entanto, uma desvantagem destas vacinas é que soros de animais vacinados não podem ser distinguidos de animais infectados. Uma vacina de subunidade contra CSFV foi desenvolvida com base nesta glicoproteína de envelope E2[9]. Esta vacina de subunidade é, portanto, uma vacina marcadora potencial, porque discriminação entre porcos vacinados e infectados pode basear-se na detecção de anticorpos contra Erns e/ou NS3. A vacina de subunidade contém E2 produzida em células de insetos foi testada quanto à segurança e eficácia [5,10]. Esta Vacina de subunidade baseada em E2 produz uma resposta imune protetora, embora menos rápida. Assim, deseja-se algum melhoramento para obter uma resposta imune mais rápida.

Materiais e métodos

Preparação de vacinas

Seis grupos de seis porcos foram imunizados com 32 μg de E2 recombinante/animal ou com placebo (H_2O, Grupo de teste T01). Para uma primeira vacinação, usou-se E2 não-tratada, E2 mal-dobrada por via térmica cíclica (Método do dobramento incorreto I) e alquila-E2 (Método do dobramento incorreto IV) (lote 1 200406RS, 285 μg/ml em PBS) nas seguintes relações:

Grupo 1	placebo (H_2O)
Grupo 2	E2 não-tratada a 100 %
Grupo 3	E2 mal-dobrada a 50 % (Método I)/E2 não-tratada a 50 %
Grupo 4	alquila-E2 mal-dobrada a 50 % (Método IV)/E2 não-tratada a 50 %
Grupo 5	E2 mal-dobrada a 25 % (Método I)/alquila-E2 mal-dobrada a 25 % (Método IV)/E2 não-tratada a 50 %
Grupo 6	E2 adjuvantada com emulsão água-óleo

Para a segunda imunização no dia 21 usou-se novamente E2

recombinante expressa por células Sf1, agora do lote 2 030506RS, 280 μg/ml em PBS. E2 foi mal-dobrada usando-se quatro métodos de dobramento incorreto (ver acima). Para formulações de vacina, usou-se uma solução com uma relação a 1:1:1:1 das quatro preparações de E2 mal-dobrada, com uma concentração final de E2 de 225 μg/ml em PBS. Grupos de Teste de Porco 1, 2 e 6 (T01, T02, T06) receberam a mesma vacina que durante a primeira vacinação. Agora, para a segunda vacinação, vacinas para Grupos de Teste de Porco 3, 4 e 5 (T03, T04, T05) compreenderam 25 %, 50 % e 75 % da E2 adjuvantada com beta cruzada. A dose foi novamente de 32 μg de E2/porco.

Imunização

Usou-se trinta e seis porcos machos. Porcos foram alojados nas instalações da ID-Lelystad, Países Baixos. Os porcos tinham aproximadamente 6 semanas de vida na vacinação, e eram livres de anticorpos contra CSFV, e outros pestivírus. Porcos foram alocados randomicamente a um grupo de vacina ou grupo de controle, cada um destes 6 grupos (n=6) foi alojado em uma unidade isolada sob condições de alta contenção. Os animais foram alimentados, e podiam beber água à vontade. No dia 0 e 21 os porcos foram imunizados por via intramuscular com 2,0 ml de amostra de teste, uma vez na coxa esquerda e uma vez na coxa direita, aproximadamente 2 cm atrás da orelha. Para a primeira imunização, grupo T01 (controle, animais #114-119) receberam amostra de teste 1 (água), grupo T02 (#120-125) receberam amostra 2 (32 μg de E2 não-tratada), grupo T03 (#126-131) receberam amostra 3 (16 μg de E2 não-tratada combinada com 16 μg de E2 adjuvantada com método de beta cruzada I), grupo T04 (#132-137) recebeu amostra 4 (16 μg de E2 não-tratada combinado com 16 μg de E2 adjuvantada com método de beta cruzada IV), grupo T05 (#138-143) recebeu amostra 5 (16 μg de E2 não-tratada combinada com 8 μg de E2 adjuvantada com método de beta cruzada I e 8 μg de E2 adjuvantada com método de beta cruzada IV), grupo T06 (#144-149) recebeu amostra 6 (32 μg de E2 não-

tratada adjuvantada com duplo óleo em água [DOE] como descrito [10]. Para o grupo de segunda imunização, T01 (controle) recebeu amostra de teste 1 (água), grupo T02 recebeu amostra 2 (32 μg de E2 não-tratada), grupo T03 recebeu amostra 3 (24 μg de E2 não-tratada combinada com 8 μg de E2 adjuvantada com método de beta cruzada I/II), grupo T04 recebeu amostra 4 (16 μg de E2 não-tratada combinado com 16 μg de E2 adjuvantada com método de beta cruzada I/II), grupo T05 recebeu amostra 5 (8 μg de E2 não-tratada combinada com 24 μg de E2 adjuvantada com método de beta cruzada I/II), grupo T06 recebeu amostra 6 (32 μg de E2 não-tratada adjuvantada com duplo óleo em água [DOE][10]. Um animal no grupo 6 recebeu 1,5 ml em lugar de 2 ml.

Exposição a cepa de CSFV Brescia 456610

No dia 42, dezenove porcos (todos os animais dos grupos 1, 3 e 6 e 1 animal do grupo 5, #143) foram inoculados intranasalmente com uma dose de 200 LD50 da cepa de CSFV altamente virulenta Brescia 456610.

Avaliação e exame

Durante o curso de todo o estudo, os animais foram monitorados uma vez por dia (escore clínico de 0 a 7). Sinais clínicos foram definidos como (1) mal-estar, que incluiu os sintomas de crescimento retardado, emagrecimento (deterioração), apetite diminuído, ausência de apetite, vômitos, responsividade lenta/cansada/reduzida, porco é incapaz de permanecer de pé sem assistência, doença geral, calafrios, (2) prejuízo do sistema respiratório, que incluiu tosse, espirros, respiração acelerada, roncos ou respiração superficial, descarga ocular (ou corrimento nos olhos), conjuntivite ou descarga nasal (corrimento do nariz) e (3) sangramento, que incluiu os sintomas, manchas vermelhas nas orelhas, sangue do reto, ou palidez. Cada sintoma foi contado como 1. A temperatura anal foi medida iniciando 2 dias antes da exposição até o fim do experimento (dia 56). Febre foi definida como uma temperatura acima de 40^0C.

Amostras de sangue para coleta de soro foram colhidas no dia 0, 2, 5, 9, 12, 16, 19, 26, 33, 42 (exposição) e 56. Deixou-se o sangue coagular e, subseqüentemente, obteve-se soros após centrifugação (5 minutos a 3500 rpm). Soros foram armazenados a -20^{0}C.

Soros foram testados quanto à presença de anticorpos neutralizadores com um ensaio de neutralização ligado a peroxidase (NPLA) usando-se células PK15 e um vírus não-citopatogênico usando-se dois anticorpos monoclonais (batelada V3: 030502, batelada V4: 110702) reagindo-se com epítopos diferentes em E2[11]. Diluições seriais de soro (em duplicata) foram misturadas com um volume igual de Eagle BSS contendo 30±300 TCID50 CSFV (cepa Brescia). Após incubação durante 1 h a 37^{0}C em um incubador de CO_2, adicionou-se aproximadamente 25000 células PK-15 por poço. Após quatro dias realizou-se um IPMA, como descrito previamente [10,12].

Titulações de anticorpos foram expressas como a recíproca da maior diluição que inibiu infecção (100 %) da monocamada em 50 % das culturas de células. Titulações <10 são interpretadas como negativas.

Soros também foram testados quanto à presença de anticorpos usando-se um ELISA (Ceditest® CSFV e Ceditest® CSFV2.0, Cedi-Diagnostics, Lelystad, Países Baixos), de acordo com instruções do fabricante.

O número de leucócitos e trombócitos em amostras de sangue em EDTA foi determinado em um contador Medonic7 CA570 *coulter counter*. Leucopenia é definida como < $8x10^9$ células/ 1 l de sangue, e trombocitopenia como < $200x10^9$ células/ 1 l de sangue.

Resultados

Trinta e seis porcos (6 grupos com 6 animais em cada grupo) foram usados para o estudo. Cada porco foi vacinado no dia 0 e 21 com uma vacina de controle (água, grupo T01) ou uma vacina de subunidade contendo

glicoproteína E2 estrutural produzida recombinantemente (grupos T02-T06), e subseqüentemente expostos a CSFV (cepa Brescia 456610) como descrito na seção de Materiais e Métodos.

Determinou-se as titulações de anticorpos neutralizadores (Tabela 29). Titulações em animais vacinados com E2 adjuvantada com estrutura beta cruzada (T03 e porco #143 de T05) foram significativamente mais altas no dia 26, 33 e 42 em comparação com o grupo de controle (T01). Porco #127 em T03 quase não desenvolveu uma titulação de NPLA.

Animais no Grupo T01 (placebo), grupo T03 (método I de E2 de beta cruzada a 50 % / método I e II de E2 de beta cruzada a 25 %), Grupo T05, porco nº 143 (método I de E2 de beta cruzada a 50 %/IV / método I e II de E2 de beta cruzada a 75 %) foram envolvidos no experimento de exposição. Todos os animais que foram imunizados com placebo/água (grupo de controle T01) morreram (Figura 14). Todos os animais, com uma exceção (T03, porco nº 127, quase não apresentou titulação de NPLA), que recebeu uma vacina de E2, seja adjuvantada com estrutura beta cruzada ou DOE, sobreviveram (Figura 14). Os animais imunizados com E2 adjuvantada com DOE não apresentaram sinais clínicos de infecção. Os animais que receberam E2 adjuvantada com estrutura beta cruzada efetivamente apresentaram sinais de infecção, porém os sinais foram menos graves se comparados com animais em T01 (Tabela 30). Observou-se menos problemas de respiração e menos sangramento em animais vacinados com E2 adjuvantada com estrutura beta cruzada, quando comparado com T01 (placebo). Com porcos em T01, observou-se sangramentos em seis de seis porcos. Dos sete porcos vacinados com E2 - beta cruzada, quatro de sete porcos apresentaram sangramentos após exposição ao CSFV. A duração média dos sangramento foi de 1,8 dias nos porcos vacinados com E2 - beta cruzada *versus* 3,2 dias nos porcos tratados com placebo em T01. Em T03 (vacina E2 - beta cruzada), entre outros porcos, porco nº 127, que quase não desenvolveu titulação de NPLA, sofreu

sangramentos.

Os escores clínicos e a análise de amostras de sangue são ilustrados abaixo. Tabela 31 mostra escores clínicos na fase posterior à exposição. A Tabela 32 mostra as medições da temperatura durante a exposição.

No grupo de controle (T01) e no grupo imunizado com E2 adjuvantada com estrutura beta cruzada observou-se significativa leucopenia (100 %, 87 %) e trombocitopenia (ambas 100 %) (Tabela 34), em comparação com o grupo que recebeu E2 adjuvantada com DOE (0 % de leucopenia, 17 % de trombocitopenia). Porco nº 127 no grupo T03 apresentou trombocitopenia e leucopenia muito forte, relacionadas mui provavelmente com a ausência de uma titulação de NPLA. Estes estudos mostram que proteção parcial, i.e. sobrevida com redução de sintomas clínicos, contra uma dose letal de CSFV, testados em um experimento de exposição grave, é obtida com vacinação com E2 adjuvantada com estrutura beta cruzada.

Exemplo 14

Imunização de frangos com ovalbumina compreendendo estrutura beta cruzada induz quebra da tolerância e resulta na formação de titulações de auto-anticorpos

Materiais e métodos

Dobramento incorreto de OVA

Amostras usadas para imunização de frangos foram idênticas àquelas usadas para imunização de camundongos como descrito acima (exemplo 12).

Imunização

Usou-se oitenta e oito frangos machos LSL Lohman com aproximadamente 3 semanas de vida. No dia 0 e 21 os frangos foram imunizados por via intramuscular com 0,5 ml de amostra de teste, na coxa esquerdo (dia 0) e na coxa direita (dia 21). Grupo T01 (controle, #4601-4608)

recebeu amostra de teste 1 (água, placebo), grupo T02 (#4609-4616) recebeu amostra 2 (5 μg de H5 não tratada), grupo T03 (#4617-4624) recebeu amostra 3 (H5 não-tratada combinada com H5 de beta cruzada a 33 % modificada com o método I, II, III), grupo T04 (#4625-4632) recebeu amostra 4 (H5 não-tratada combinada com H5 de beta cruzada a 66 % modificada com método I-III), grupo T05 (#4633-4640) recebeu amostra 5 (H5 de beta cruzada a 100 % modificada com o método I-III), e grupo T10 (#4673-4680) recebeu amostra 10 (vacina, Gallimune® FLU H5N9, lote F38785C, compreendendo vírus de influenza aviária inativado (H5N9, cepa A/Turkey/Wisconsin/68). Em todos os casos administrou-se 5 μg de H5 ao todo (não-tratada combinada com modificada) em PBS.

Amostras de sangue foram colhidas para coleta de soro da veia da asa nos dia -1, 21, 33. Deixou-se o sangue coagular e, subseqüentemente, obteve-se soros após centrifugação (5 minutos a 3500 rpm). Soros foram armazenados a -20°C. Titulações de anticorpos anti-OVA foram avaliadas com soros coletados no dia 0 e dia 33 usando-se um ELISA convencional. Com soros coletados de frangos no dia -1 e 33 realizou-se determinações de titulações com relação a DOVA. Para este fim, soros dos oito animais em um grupo foram combinados. Usou-se combinados de soros coletados no dia -1 como o controle negativo.

Resultados

Na Figura 15 mostra-se determinações de titulações com soros de frangos combinados. Soro coletado do grupo T01, que recebeu vacina de placebo (i.e. água), contêm quantidades detectáveis de anticorpos anti-OVA. Os frangos que foram vacinados com diversas vacinas contendo OVA desenvolveram titulações anti-OVA mais elevadas. É digno de nota que imunização com vacinas contendo amostra adjuvantada com beta cruzada a 33 % resultou em titulações anti-OVA incrementadas. De maneira similar, a adição de adjuvante induziu anticorpos anti-OVA. Estes resultados

demonstram que a inclusão de antígeno de OVA adjuvantado com beta cruzada na vacina resulta em uma resposta auto-imune humoral. Devido a esta potência de estrutura beta cruzada para quebrar tolerância, desenvolve-se vacinas contra auto-antígenos. Referidas vacinas são usadas contra doenças ou para fins que não só infecções, por exemplo, para a indução de anticorpos a LHRH para imunocastração de javalis, ou para uso na prevenção da [doença] enxerto versus hospedeiro (GvH) e/ou rejeições de transplante.

Descrição das Tabelas

Os compostos listados na Tabela 1 e as proteínas listadas na Tabela 2 ligam-se, todos, a polipeptídios com uma dobra não-nativa similar a amilóide. Na literatura, esta dobra não-nativa foi designada como agregados de proteína, agregados amorfos, depósito amorfo, emaranhados, placas (senis), amilóide, proteína similar a amilóide, proteína desnaturada, oligômeros amilóides, depósitos amiloidogênicos, estrutura β cruzada, lâmina β, espinha β cruzada, placa, proteína desnaturada, lâmina β cruzada, agregados ricos em estrutura β, forma agregadora infectiva de uma proteína, proteína não-dobrada, dobra/conformação similar a amilóide e, talvez, alternativamente. O tema mais comum entre todos os polipeptídios com uma dobra similar a amilóide não-nativa, que são ligantes para um ou mais dos compostos listados na Tabela 1 e 2, é a presença de uma conformação de estrutura β cruzada.

Os compostos listados na Tabela 1 e 2 são considerados como um subconjunto de todos os compostos conhecidos até aqui que se ligam a conformações de proteína não-nativa. As listas são, portanto, não-limitantes. Conhece-se hodiernamente mais compostos que se ligam à conformação de proteína similar a amilóide. Por exemplo, na patente AU2003214375 descreve-se que agregados de proteína príon, amilóide, e tau ligam-se seletivamente a agentes ligantes poliônicos, como sulfato de dextrano ou pentosano (aniônico), ou a compostos de poliamina, como poli(cloreto de

dialildimetilamônio) (catiônico). Compostos com especificidade para dobras não-nativas de proteínas listados nesta patente e alhures são, em princípio, igualmente apropriados para métodos e dispositivos revelados neste pedido de patente. Além disso, qualquer composto ou proteína relacionada com aqueles listados na Tabela 1 e 2 são abrangidos pelas reivindicações. Por exemplo, mutantes pontuais, fragmentos, combinações produzidas recombinantemente de domínios de ligação de estrutura β cruzada e mutantes de deleção e inserção são parte dos conjuntos de compostos desde que sejam capazes de ligar-se a uma estrutura β cruzada (i.e. desde que sejam equivalentes funcionais). Também é possível usar qualquer proteína ou molécula pequena recentemente descoberta que apresenta afinidade pela dobra de estrutura β cruzada, em princípio, em qualquer um dos métodos e aplicações aqui divulgados.

Os compostos listados na Tabela 3 também são considerados como sendo parte da 'via de estrutura beta cruzada', e esta consideração baseia-se em dados da literatura, indicando interações das moléculas listadas com compostos que também compreendem a dobra de estrutura β cruzada mas que não foram revelados como tais. As tabelas de 4 a 34 ilustram resultados dos exemplos.

Legendas das figuras

Figura 1. Ativação de fator XII por caulim adjuvante e por agregados de peptídios com conformação de estrutura β cruzada.

A. Como o caulim, agregados de peptídios similares a amilóide de FP13 e AB estimulam a ativação de fator XII, como detectado pela conversão de Cromozima-PK, quando da formação de calicreína a partir de precalicreína por meio de fator XII ativado. Controle de tamponador e controles não-amilóides[:] fragmento de fibrina FP10 e polipeptídio amilóide de ilhotas murinas não-amilóides mIAPP [*murine islet amyloid polypeptide*] não ativam fator XII. B. Como FP13 e AB, também peptídios ricos em

conformação de estrutura β cruzada[:] laminina (LAM12) e transtiretina (TTR11) estimulam ativação de fator XII, em grau similar ao caulim. C. Autoativação de fator XII é estabelecida por meio de incubação de fator XII purificado com DXS500k ou com vários agregados de proteína similares a amilóide com conformação de estrutura β cruzada, na presença de substrato cromogênico S-2222.

Figura 2: Adjuvantes induzem propriedades similares a amilóide em várias proteínas.

A. Adjuvantes DXS500k e caulim induzem fluorescência de ThT, e adjuvante DXS500k induz propriedades de ligação de tPA em várias proteínas após incubação de um dia para o outro, conforme medido em um ELISA com proteínas imobilizadas com ou sem DXS500k. Fluorescência de ThT ou ligação de tPA com proteínas incubadas com DXS500k ou caulim é dada como um múltiplo da fluorescência ou ligação de tPA observada quando DXS500k e caulim foram omitidos durante incubações de proteína ('fator de incremento'). B. Em um ensaio de auto-ativação de fator XII cromogênico, peptídio FP13 Klδ7G derivado de fibrina amilóide estimula autoativação de fator XII, que é inibido por corante de ThT específico par amilóide. C. Adjuvante DXS500k é apenas um fator estimulador para ativação de fator XII quando plasma diluído a 80x está presente. Ativação de fator XII por DXS500k e proteína de plasma são inibidos por ThT. Ativação de fator XII foi medido em um ensaio cromogênico. D. Na presença de plasma a 60 % vol/vol, precipitado de adjuvante $Ca_3(PO_4)_2$ ativa fator XII, como detectado medindo-se a conversão de substrato cromogênico S2222, E-F. Fator XII soh então é ativado efetivamente quando ambos os adjuvantes, caulim ou DXS500k, e ou 1 mg ml^{-1} de endostatina (E), ou albumina (F) são incluídas no mix de ensaio. Ativação de fator XII na presença de precalicreína e quininogênio com alto peso molecular foi determinada medindo-se a conversão de substrato de calicreína cromogênico Cromozima-PK. G-H.

Adjuvantes DXS500k, CpG, adjuvante de Freund completo (G), alume e DDA (H) induzem ativação de tPA e Plg, como determinado medindo-se a conversão do substrato de plasmina cromogênico S 2251. Controle positivo foi de 100 μg ml^{-1} de γ-globulinas amilóides, controle negativo foi tamponador. I. Incubação de plasma diluído 80x com adjuvantes indicados resulta em fluorescência de ThT para adjuvante de Freund completo (CFA), Specol, DXS500k e CpG, enquanto que DEAE-dextrano, adjuvante de Freund incompleto, alume e DDA não têm efeito. Amostras foram diluídas 40x para as medições de ThT. J. Em um experimento similar, plasma diluído 20x foi incubado com as séries indicadas de adjuvantes. Após diluição de 160x, DXS500k, CpG_5 CFA, IFA e Specol induzem fluorescência de ThT. K-L. Exposição de 1 mg ml^{-1} de lisozima (K) ou endostatina (L) nas concentrações seriais indicadas de LPS ou CpG induz um maior sinal de fluorescência de ThT. M. Exposição de 1 mg ml^{-1} de albumina, endostatina, β_2GPI do plasma ou β2GPI rec. a 21,4 μg ml^{-1} de CpG resulta em maior fluorescência de ThT com aproximadamente um fator de 2 a 10. Com estas condições de ensaio não se observou efeito com lisozima e γ-globulinas. N-R. Imagens TEM de CpG (N.), lisozima (O.), lisozima exposta a CpG (P.), DXS500k (Q.) e lisozima exposta a DXS500k (R.). A escala bar representa 200 nm.

Figura 3: Ligação de fator XII e tPA a β2-glicoproteína I e ligação de auto-anticorpos anti-β2GPI a β2GPI recombinante.

A. Ensaio de plasmina cromogênico apresentando a atividade estimuladora de β2GPI recombinante na conversão mediada com tPA de Plg a plasmina. O controle positivo foi peptídio de fibrina amilóide FP13. B. Em um ELISA, β_2GPI recombinante liga-se a tPA imobilizado, sendo que β_2GPI purificado de plasma não se liga. A k_D é de 2,3 μg ml^{-1} (51 nM). C. Em um ELISA, fator XII liga-se a β_2GPI humana recombinante purificada, e não a β_2GPI que é purificado de plasma humano, quando fator XII purificado é imobilizado sobre poços de placa ELISA. β_2GPI recombinante liga-se com

uma k_D de 0,9 μg ml^{-1} (20 nM) a fator XII imobilizado. D. Western blot incubado com anticorpo anti-fator XII humano. A β_2GPI foi purificada, ou de plasma humano fresco ou de plasma que foi congelado a -20°C e subseqüentemente descongelado antes de purificação em uma coluna de afinidade de β_2GPI. Frações eluídas são analisadas em Western blot após eletroforese SDS-PA. Quando se compara faixas 2-3 com 4-5, verifica-se que congelamento-descongelamento de plasma resulta em co-purificação de fator XII juntamente com a β_2GPI. A massa molecular de fator XII é de 80 kDa. E. Em um ELISA, β_2GPI recombinante inibe eficientemente a ligação de auto-anticorpos anti-β2GPI a β2GPI imobilizado, enquanto que β2GPI do plasma exerce um efeito menor sobre a ligação de anticorpos. Auto-anticorpos anti-β2GPI foram purificados de plasma de pacientes com a doença autoimune 'síndrome de antifosfolipídeo'. F. Exposição de 25 μg ml^{-1} de β_2GPI_5 produzida recombinantemente ($r\beta_2$GPI) ou purificada de plasma ($n\beta_2$GPI), a 100 μM de vesículas de cardiolipina ou a 250 μg ml^{-1} de sulfato de dextrano 500.000 Da (DXS) induz uma maior fluorescência de ThT, sugestivo de um incremento de uma quantidade de conformação de estrutura β cruzada em solução. Sinais são corrigidos para fluorescência de fundo de cardiolipina, DXS, ThT e tamponador. G. Ligação de tPA e K2P-tPA a β_2GPI imobilizada nos poços de uma placa ELISA, ou a β_2GPI ligado a cardiolipina imobilizada é avaliada. β_2GPI contactada com cardiolipina liga tPA em maior grau do que β_2GPI contactada diretamente com a placa de ELISA. K2P-tPA não se liga a β_2GPI. TPA não se liga a cardiolipina imobilizada. H. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de 400 μg ml^{-1} de β_2GPI purificada do plasma apenas (1) ou contactada com 100 μM de cardiolipina (2, 3) e de 400 μg ml^{-1} de β2GPI recombinante purificada (4).

Figura 4: Síntese de RNA de TNFα em monócitos após estimulação com LPS e compostos ricos em conformação de estrutura β cruzada, que atua como um desnaturador.

A. Monócitos U937 cultivados foram incubados durante 1 h com tamponador, LPS, endostatina amilóide, Hb-AGE amilóide ou Hb de controle. Regulação-para-cima de RNA de TNFα foi avaliada por meio de realização de RT-PCR com RNA isolado dos monócitos e iniciadores de TNFα. Quantidades de cDNA de TNFα após RT-PCR foram normalizadas para as quantidades de cDNA ribossômico 18S, obtido com as mesmas amostras de RNA. Em monócitos incubados com tamponador não se detectou RNA de TNFα. Endostatina e Hb-AGE induzem aproximadamente 30 % da expressão de RNA de TNFα induzida por Hb de controle é aproximadamente três vezes menor. B. Exposição de 1 mg ml^{-1} de lisozima a 0-1200 μg ml^{-1} de LPS resulta em um aumento de 1,1 até a 13,1 vezes da fluorescência de ThT com respeito à lisozima incubada com tamponador apenas, indicativo da capacidade de desnaturação de LPS, resultando em estruturas similares a amilóide em lisozima. Desvios padrão foram tipicamente menores do que 10 % (não mostrado). C. Exposição de 1 mg ml^{-1} de lisozima, albumina, endostatina, γ-globulinas, β_2GPI do plasma ou β2GPI rec. a 600 μg ml^{-1} de LPS resulta em maior fluorescência de ThT com aproximadamente um fator de 2 a 10.

Figura 5. Conformação de estrutura β cruzada similar a amilóide em albumina alquilada de soro murino e em ovalbumina desnaturada com calor, albumina de soro murino, glucagônio humano e Etanercept.

A. Ativação de Plg com leitura de atividade de plasmina usando-se substrato cromogênico S-2251. Propriedades de ativação de albumina de soro murino alquilada ou reduzida (alquila-MSA) e OVA desnaturada com calor (dOVA) são comparadas com γ-globulinas amilóides (controle positivo), tamponador (controle negativo), e albumina nativa e OVA (nMSA, nOVA). B. Ensaio de fluorescência de tioflavina T com OVA e MSA nativa ou desnaturada. C. Ensaio de ativação de Plg para comparação de MSA reduzida e alquilada e MSA desnaturada com calor. D. Ensaio de

fluorescência de tioflavina T com MSA reduzida/alquilada e MSA desnaturada com calor. E. Ensaio de ativação de Plg com concentrações seriais de glucagônio desnaturado com calor/ácido. F. Ensaio de fluorescência de tioflavina T com glucagônio desnaturado com calor/ácido e nativo. G. Comparação das propriedades de ativação de tPA de Etanercept desnaturado com calor, Etanercept nativo e Etanercept reduzido/alquilado. H. Fluorescência de tioflavina T de Etanercept nativo e desnaturado com calor. I. Imagem TEM de OVA desnaturada com calor. A escala bar representa 200 nm. J. Imagem TEM de glucagônio desnaturado com calor/ácido. A escala bar representa 1 μM. K. Ensaio de fluorescência de tioflavina T mostrando que filtração através de um filtro de 0,2 μm de OVA desnaturada não influencia as propriedades incrementadoras de fluorescência. L. Determinação de titulações de anticorpos anti-nOVA em soros combinados de camundongos imunizados com nOVA ou dOVA. Titulação é definida como a diluição sérica que ainda dá um sinal acima do valor de fundo obtido com soro pré-imuno diluído 10 vezes. A titulação para os camundongos imunizados com nOVA foi de 610*, para os camundongos imunizados com dOVA 3999*. Após uma semana nenhuma titulação foi detectada em ambos os grupos. A titulação incrementada 6,6 vezes observada nos camundongos imunizados com dOVA aponta para uma maior atividade imunogênica de OVA desnaturada com conformação de estrutura β cruzada.

Figura 6. Detecção de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide em preparações de PorA.

A. Soluções de consumo de PorA e PorA submetidas a um dos três métodos de dobramento incorreto de proteína de I a III são aplicadas diluídas 400 vezes em um ensaio de fluorescência de ThT. B. As mesmas amostras de PorA são testadas quanto a seu potencial para ativar tPA/plasminogênio em um ensaio de plasmina cromogênica. Amostras foram diluídas 400 vezes. C. Ensaio de fluorescência de ThT com preparações de

vacina de PorA diluídas 10 vezes (1 μg/ml de PorA no ensaio). D. Ensaio de ativação de plasminogênio/tPA com preparações de vacina de PorA diluídas 20 vezes (0,5 μg/ml de PorA no ensaio).

Figura 7. Determinações de titulações de anticorpos anti-PorA e determinações de titulações de anticorpos bactericidas no soro.

A. No dia 21 após a vacinação, soros combinados de cada grupo de camundongos foram analisados quanto a suas titulações de anticorpos anti-PorA trivalente, usando-se o antígeno de PorA trivalente usado para vacinação no dia 0, B. Titulações de anticorpos anti-PorA, determinadas com soros individuais coletados no dia 42 após a vacinação no dia 0 e dia 14 após a vacinação no dia 21. Antígenos usados foram os três subtipos de PorA que constituem a vacina trivalente. C. Titulações de anticorpos bactericidas no soro (SBA, *Serum Bactericidal Antibody*), determinado com soros como em B.

Figura 8. Imunização de camundongos com glicoproteína β2 I de beta cruzada humana resulta em titulações de anticorpos contra auto- e não-auto-antígeno.

A. Exposição de β_2GPI humana a cardiolipina torna a mistura com propriedades de ativação de plasminogênio/tPA, indicativo quanto à presença de estrutura beta cruzada, como determinado em um ensaio cromogênico de ativação de plasminogênio/tPA com um substrato de plasmina. B. Alquilação de radicais cisteína em β_2GPI humana introduz estrutura beta cruzada como determinado em um ensaio de incremento da fluorescência de ThT. C. Camundongos imunizados com uma mistura de cardiolipina e β_2GPI humana desenvolvem uma titulação de anticorpos contra antígeno de β_2GPI humana não-tratada. D. De forma similar à cardiolipina-β_2GPI com estrutura beta cruzada, também alquila-β_2GPI humana com estrutura beta cruzada elicita uma titulação de anticorpos contra o antígeno humano não-tratado. E. Camundongos imunizados com β_2GPI de beta

cruzada humana desenvolvem titulações contra β_2GPI não-tratada de camundongo, demonstrando quebra de tolerância nos camundongos quando imunizados com um antígeno que compreende estrutura beta cruzada.

Figura 9. Detecção de conformação de proteína com dobramento incorreto similar a amilóide compreendendo estrutura beta cruzada em antígenos.

Estrutura beta cruzada é detectada por meio de avaliação do incremento da fluorescência de ThT quando do contato do corante específico para amilóide com um antígeno em solução, e medindo-se a atividade de plasmina quando da ativação de tPA, uma serina protease que se liga a estrutura beta cruzada, e que é ativada por estrutura beta cruzada, em um ensaio cromogênico de conversão de substrato de plasmina. A. ativação de tPA/plasminogênio por 100 μg/ml de OVA ou DOVA (Método do dobramento incorreto I), comparado com controle de tamponador. B. Ensaio de fluorescência de ThT com 100 μg/ml de OVA ou DOVA. C. Fluorescência de ThT com estoque de H5 não-tratada diluída dez vezes (lote 1 210406CS, 236 μg/ml em PBS). D. ativação de tPA com solução de consumo de H5 (lote 1 210406CS, 236 μg/ml em PBS), mostrando a presença de uma fração de moléculas de H5 com conformação de estrutura beta cruzada. E. Fluorescência de ThT com H5 não-tratada, mal-dobrada termicamente (H5 + OVA) (Método I) e H5-OVA mal-dobrada termicamente (conjugado com glutaraldeído/NaBH4; Método III), todos a 14 μg/ml (lote 2 fração X 250506CS, 140 μg/ml em PBS). F. Propriedades de ativação de tPA de 12 μg/ml de H7 recombinante adquirida da *Protein Sciences Corp.*, indicativo da presença de estrutura beta cruzada. Controle positivo: γ-globulinas amilóides. G. H7 recombinante adquirida da *Protein Sciences Corp.* a 60 μg/ml aumenta a fluorescência de ThT até certo grau, indicativo da presença de moléculas de proteína com estrutura beta cruzada. H. Ensaio de fluorescência de ThT com H7 nativa recombinante produzida no laboratório, H7, mistura mal-dobrada

termicamente de H7 e OVA, e conjugado de OVA-E7 mal-dobrado termicamente, obtido por meio de acoplamento de EDC/NHS. Soluções de consumo de H7 foram diluídas dez vezes. I. Incremento da atividade de tPA/plasminogênio quando da introdução de 1 μg/ml de H7 mal-dobrada (lote 2 05-2006CS). '(H7 + OVA)' refere-se a H7 mal-dobrada termicamente com adição de OVA, 'H7-OVA' refere-se a H7 mal-dobrada termicamente após acoplamento de H7 a OVA usando EDC/NHS. J. Fluorescência de ThT quando do contato de preparações de E2 diluídas 10 vezes com uma concentração de DOVA de 100 μg/ml. E2 livre de células HEK293E foi, ou mal-dobrada diretamente usando-se ciclização térmica, ou primeiramente conjugada a OVA usando EDC/NHS, antes do dobramento incorreto. K. O incremento da atividade de tPA é determinada com várias preparações de peptídio CL3 a 100 μg/ml. L. No ensaio de incremento da fluorescência de ThT, concentrações de amostra 1, 2, 5 e 6 foi de 136 μg/ml, enquanto que amostras 3 e 4 foram testadas a 100 μg/ml.

Figura 10. Antígenos usados para experimentos de exposição a H5N1 da gripe aviária, e experimentos de exposição ao CSFV.

A. Fluorescência de ThT de preparações de H5 a 24 μg/ml. Para amostra 2, H5 foi misturada com OVA antes de aplicação de dobramento incorreto com ciclização térmica. H5-OVA-1, H5 conjugada a OVA usando acoplamento de EDC/NHS; H5-OVA-2, H5 conjugada a OVA usando acoplamento de glutaraldeído/$NaBH_4$. B. ensaio de atividade de tPA/plasminogênio com E2 nativa e duas preparações de E2 mal-dobrada. Preparações de E2 usadas para uma primeira vacinação de porcos com E2 não-tratada ou várias formas mal-dobradas similares a amilóide. E2 lote 1 200406RS a 285 μg/ml em PBS, expressa em células Sf1, foi usada para a imunização. No ensaio, a concentração de E2 foi de 20 μg/ml. C. Fluorescência de ThT de preparações de E2 usadas para formulação de vacina. A E2 mal-dobrada foi obtida por meio de ciclização térmica de 30 a

85°C e de volta. D. Em um ensaio de ativação de plasminogênio/tPA, peptídio CL3 recentemente dissolvido e peptídio incubado a 65°C são os ativadores de tPA mais potentes, enquanto que incubações à temperatura ambiente ou a 37°C resultam em um menor teor de ativação de estrutura beta cruzada. A concentração de peptídio no ensaio foi de 200 μg/ml.

Figura 11. Determinação do teor de estrutura beta cruzada em uma vacina de coquetel compreendendo E2, CL3, H5, H7 e ovalbumina.

A. Ativação de tPA/plasminogênio é determinada com soluções de coquetel de vacina diluídas 20 vezes a-f, resultando em aproximadamente 5 e 0,5 μg/ml de concentração total de antígeno para grupos a-c e d-f, respectivamente. B. Ensaio de fluorescência com vermelho Congo com soluções de antígeno diluídas 10 vezes a-f. Controle positivo foi amilóide-β.

C. Ensaio de fluorescência de ThT com soluções de antígeno diluídas 10 vezes a-f. Controle positivo: AB.

Figura 12. Titulações de anticorpos anti-antígeno em soros de camundongo no dia 28 após a vacinação com coquetel de antígenos adjuvantado com beta cruzada.

A. Quando camundongos no grupo a são vacinados uma vez com 10 μg de H7 recombinante não-tratada (*Protein Sciences Corp.*) por animal desenvolveram-se titulações de anticorpos anti-H7. B. Titulações contra E2 antígeno do kit de CSFV da Cedi-Diagnostics. Após um vacinação, camundongos que receberam 5 ou 10 μg de E2 adjuvantada com beta cruzada, expressa em células HEK293E, desenvolveram uma titulação. C. Determinação de titulação com antígeno de DOVA revestido. D. Determinação da titulação com OVA não-tratada revestida.

Figura 13: Sobrevivência de camundongos após vacinação com placebo (água, T01), vacinação com vacina de subunidade H5 adjuvantada com estrutura beta cruzada (grupo T03) ou vacinada com vírus de influenza

inativado (H5N9) (grupo T10) e exposição a 20 LD_{50} como descrito em materiais e métodos.

A. Titulações de anti-H5 em soros de camundongo combinados no dia 33 após a vacinação com placebo, H5 não-tratada, vacina de H5N9 comercial ou H5 adjuvantada com beta cruzada foram avaliadas empregando H5 recombinante de uma fonte diferente do antígeno usado para vacinação que o antígeno no ELISA. B. Titulações anti-H7 em soros de camundongo combinados no dia 33 após a vacinação com placebo, H7 não-tratada, H7 adjuvantada com Specol ou H7 adjuvantada com beta cruzada foram avaliadas em um ELISA. C. Com soros de camundongo pré- imune e soros obtidos no dia 33 após a vacinação com placebo, H5 não-tratada ou H5 adjuvantada com beta cruzada, titulações contra DOVA foram avaliadas. DOVA foi parte das formulações de vacina para grupos 3, 4 e 5, D. Sobrevivência de camundongos vacinados com placebo (T01), antígeno de H5 de beta cruzada (T03) ou vacina de vírus H5N9 inativado (T10), após exposição a vírus H5N1. E. Titulações determinadas com soros de camundongos individuais de T03 obtidas no dia 33 após a vacinação com H5 adjuvantada com beta cruzada, F. Titulações determinadas com soros de camundongo individuais de T10 obtidos no dia 33 após a vacinação com vírus H5N9 inativado.

Figura 14: Sobrevivência, no dia 14, de porcos que são vacinados com E2 adjuvantada com estrutura beta cruzada ou E2 adjuvantada com DOE e expostos com 200 LD50 da cepa Brescia 456610 do vírus da febre suína clássica.

Sobrevivência de porcos após exposição com CSFV. Grupo T03 foi vacinado com E2 - beta cruzada, e também porco nº 143 do Grupo T05, Grupo T06 foi vacinado com emulsão de E2 adjuvantada com água-óleo (DOE).

Figura 15: Anticorpos de OVA auto-imunes formados quando da

vacinação com vacinas compreendendo estrutura beta cruzada.

Anticorpos em soros coletados de frangos imunizados com vacinas descritas no texto foram determinados por meio de ELISA. Usou-se OVA com propriedades similares a amilóide como o antígeno no ELISA.

Lista de Referência (exceto Exemplos de 7 a 14)

1. Kranenburg, O. *et al.* Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross-beta structure receptor. Curr. Biol. 12, 1833-1839 (2002).

2. Landman, W.J. Amyloid arthropathy in chickens. Vet. Q. 21, 78-82 (1999).

3. Bouma,B. *et al.* Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin. J. Biol. Chem. 278, 41810-41819 (2003).

4. Hoppener, J.W., Ahren, B. & Lips, C.J. Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 343, 411-419 (2000).

5. Hoppener, J.W. *et al.* Extensive islet amyloid formation is induced by development of Type II diabetes mellitus and contributes to its progression: pathogenesis of diabetes in a mouse model. Diabetologia 42, 427-434 (1999).

6. de Laat, B., Derksen, R.H., Urbanus, R.T. & de Groot, P.G. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of (beta}2-glycoprotein I cause LAG and their presence correlates strongly with thrombosis. Blood, (2004).

7. Horbach, D.A., van Oort, E., Donders, R.C., Derksen, R.H. & de Groot, P.G. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison between different assays for the detection of antiphospholipid antibodies. Thromb. Haemost. 76, 916-924 (1996).

8. Horbach, D.A., van Oort, E., Tempelman, M.J., Derksen, R.H. & de Groot, P.G. The prevalence of a non-phospholipid-binding form of beta2- glycoprotein I in human plasma-consequences for the development of

anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Thromb. Haemost. 80, 791-797 (1998).

9. de Laat, H.B., Derksen, R.H., Urbanus, R.T., Roest, M. & de Groot, P.G. beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. Blood 104, 3598- 3602 (2004).

10. Brandenburg, K, Koch, M.H. & Seydel, U. Biophysical characterisation of lysozyme binding to LPS Re and lipid A. Eur. J. Biochem. 258, 686-695 (1998).

11. Takada, K., Ohno, N. & Yadomae, T. Detoxification of lipopolysaccharide (LPS) by egg white lysozyme. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 9, 255- 263 (1994).

12. Morrison, D.C. & Cochrane, C.G. Direct evidence for Hageman factor (factor XII) activation by bacterial lipopolysaccharides (endotoxins). J. Exp. Med. 140, 797-811 (1974).

13. Gebbink, M.F., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L. & Wosten, H.A. Amyloids--a functional coat for microorganisms. Nat. Rev. Microbiol. 3, 333-341 (2005).

14. Matsmira, E., Igarashi, Y., Yasuda, T., Triplett, D.A. & Koike, T. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. J. Exp. Med. 179, 457-462 (1994).

15. Subang, R. *et al.* Phospholipid-bound beta 2-glycoprotein I induces the production of anti-phospholipid antibodies. J. Autoimmun. 15, 21-32 (2000).

16. Levine, J.S., Suban & R., Koh, J.S. & Rauch, J. Induction of anti- phospholipid autoantibodies by beta2-glycoprotein I bound to apoptotic thymocytes. J. Autoimmun. 11, 413-424 (1998).

17. Matzinger, P. An innate sense of danger. Ann. N. Y. Acad. Sci. 961:341- 2., 341-342 (2002).

18. Bouma,B. *et al.* Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. EMBO J. 18, 5166-5174 (1999).

19. Jurgens, G. *et al.* Investigation into the interaction of recombinant human serum albumin with Re-lipopolysaccharide and lipid A. J. Endotoxin. Res. 8, 115-126 (2002).

20. Butovsky, O., Talpalar, A. E., Ben Yaakov. K. & Schwartz, M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. Mol. Cell Neurosci., (2005).

21. Fassbender, K. *et al.* The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease . FASEB J. 18, 203-205 (2004).

22. Liu, Y. *et al.* LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. Brain ., (2005).

23. Lutters, B.C, Meijers, J.C, Derksen, R.H., Arnout, J. & de Groot, P.G. Dimers of beta 2-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta 2- glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I antibody complexes J. Biol. Chem. 276, 3060-3067 (2001).

24. O'Nuallain, B. & Wetzel, R. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 1485-1490 (2002).

25. Kayed, R. *et al.* Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science 300, 486-489 (2003).

Lista de referências para os Exemplos de 7 a 14

(1) Luijkx TA, van Dijken H, Hamstra HJ *et al.* Relative immunogenicity of PorA subtypes in a multivalent Neisseria meningitidis vaccine is not dependent on presentation form. Infect Immun. 2003;71:6367-

6371.

(2) Subang R, Levine JS, Janoff AS *et al.* Phospholipid -bound beta 2- glycoprotein I induces the production of anti-phospholipid antibodies. J Autoimmun. 2000;15:21-32.

(3) Wensvoort G, Terpstra C, Boonstra J, Bloemraad M, Van Zaane D. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. Vet Microbiol. 1986;12:101-108.

(4) Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae). In Vitro. 1977;13:213-217.

(5) Hulst MM, Westra DF, Wensvoort G, Moormann RJ. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. J Virol. 1993;67:5435-5442.

(6) Treanor JJ, Campbell JD, Zangwill KM, Rowe T, Wolff M. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. N Engl J Med. 2006;354:1343-1351.

(7) Poland GA. Vaccines against avian influenza - a race against time. N Engl J Med. 2006;354:1411-1413.

(8) Treanor JJ, Schiff GM, Couch RB *et al.* Dose-related safety and immunogenicity of a trivalent baculovirus-expressed influenza-virus hemagglutinin vaccine in elderly adults. J Infect Dis. 2006; 193: 1223-1228.

(9) van Rijn PA, Bossers A, Wensvoort G, Moormann RJ. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. J Gen Virol. 1996;77:2737-2745.

(10) Bouma A, de Smit AJ, de Kluijver EP, Terpstra C, Moormann RJ. Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever vírus. Vet Microbiol. 1999;66:101-

114.

(11) Wensvoort G, Terpstra C, de Kluijver EP, Kragten C, Warnaar JC. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera vírus. Vet Microbiol. 1989;21:9-20.

(12) Terpstra C, Bloemraad M, Gielkens AL. The neutralizing peroxidase- linked assay for detection of antibody against swine fever vírus. Vet Microbiol. 1984;9:113-120.

Tabela 1: compostos de ligação com estrutura β cruzada		
vermelho Congo	Crisamina G	Tioflavina T
2-(4'-(metilamino)fenil)-6-metilbenzotiaziol	Qualquer outro químico/corante de ligação amilóide	Glicosaminoglicanos
Tioflavina S	Styrila dyes	BTA-1
Poli(ácido tiofeno acético)	polieletrólito conjugado PTAA-Li	

Tabela 2: proteínas que são capazes de ligar-se especificamente a e/ou de interagir com proteínas mal-dobradas e/ou com proteínas compreendendo estrutura β cruzada		
Ativador de plasminogênio de tipo tissular	Domínio(s) de dedo de tPA, fator XII, fibronectina, HGFA	Apolipoproteína E
Fator XII	Plasmina (-ogênio)	Metaloprotease de matriz-1
Fibronectina	receptor de neurotrofina de 75kD (p75NTR)	Metaloprotease de matriz-2
Ativador de fator de crescimento de hepatócitos	a2-macroglobulina	Metaloprotease de matriz-3
Componente de amilóide P do soro	High peso molecular kininogen	Monoclonal anticorpo 2C11(F8A6)*
C1q	catepsina K	Monoclonal anticorpo 4A6(A7)*
CD36	Metaloprotease de matriz 9	Monoclonal anticorpo 2E2(B3)
Receptor para produtos finais de glicosamento avançado	Haem oxigenase-1	Anticorpo monoclonal 7H1 (C6)*
Receptor de aglutinador-A	proteína relacionada com receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP, CD91)	Anticorpo monoclonal 7H2(H2)*
Receptor de aglutinador-B	DnaK	Anticorpo monoclonal 7H9(B9)*
ER chaperona Erp57	GroEL	Anticorpo monoclonal 8F2(G7)*
Calreticulina	VEGF165	Anticorpo monoclonal 4F4*
Anticorpo conformacional monoclonal WO1	Anticorpo conformacional monoclonal WO2 (ref.(O'Nuallain e	Anticorpo específico para

(ref.(O'Nuallain e Wetzel, 2002)	Wetzel, 2002))	oligômero amilóide (ref. (Kayed *et al.*, 2003))
Anticorpo anti-albumina-AGE de coelho, AB-purificado[a)]	CD40	apo A-I pertencente a lipoproteínas pequenas de alta densidade
apoJ/cluterina	excesso 10 vezes molar PPACK, 10 mM εACA, (100 pM-500 nM) tPA[2)]	CD40-ligante
receptor de aglutinador de macrófagos CD163	anticorpos de imunoglobulina G (IgG) humana de amplo espectro (IgIV, IVIg)	BiP/grp78
Erdj3	haptoglobina	
*Anticorpos monoclonais desenvolvidos em colaboração com a Instalação de Hibridoma de ABC, Utrecht University, Utrecht, Países Baixos. a) Albumina de antígeno-AGE e ligante Aβ foram enviados para Davids Biotechnologie (Regensburg, Alemanha); um coelho foi imunizado com albumina-AGE, anticorpos contra um epitopo estrutural foram purificados por afinidade usando-se uma coluna com Aβ imobilizado. 2) PPACK é Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (SEQ-ID 8), εACA é ácido ε-amino capróico, tCA é ativador de plasminogênio de tipo tissular		

Tabela 3: Proteínas envolvidas na "Via de estrutura beta cruzada"		
Anticorpo monoclonal 4B5	Proteína de choque com calor 27	Proteína de choque com calor 40
Anticorpo monoclonal 3H7*	Nod2 (=CARD15)	Proteína de choque com calor 70
FEEL-1	Pentraxina-3	HDT1
LOX-1	Proteínas de amilóide A do soro	GroES
MD2	Stabilina-1	Proteína de choque com calor 90
FEEL-2	Stabilina-2	CD36 e análogo a LIMPII - I (CLA-1)
Lipoproteína de baixa densidade	Lipoproteína de ligação de LPS	CD14
Proteína reativa com C	CD45	Orosomucóide
Integrinas	alfa-1 antitripsina	complexo de transtiretrina - apo A-IV
Albumina	glicoproteína de ácido alfa-1	β2-glicoproteína I
Lisozima	Lactoferrina	Megalina
proteína de Tamm-Horsfall	Apolipoproteína E3	Apolipoproteína E4
receptores similares a toll	receptor de complemento CD11b/CD18 (Mac-1, CR3)	CD11d/CD18(subunidade aD)
CD11b2	CD11a/CD18(LFA-1, subunidade aL)	CD11c/CD18(CR4, subunidade aX)
fator de Von Willebrand	Miosina	Agrina
Perlecano	Chaperona60	subunidade de integrina b2
proteínas que atuam na resposta de proteína não-dobrada (UPR, unfolded protein response) via do retículo endoplasmático (ER, endoplasmic reticulum) de células procarióticas e eucarióticas	proteínas que atuam na resposta do estresse do reticulo endoplasmático (ESR, endoplasmic reticulum stress response) via de células procarióticas e eucarióticas	Receptor de macrófago com estrutura colagenosa (Marco)
20S	membros da família de chaperona	HSC73

	16	
HSC70	proteína de canal de translocação Sec61p	26S proteasoma
terminação 19S do proteasoma (PA700)	UDP-glucose:glicoproteína glucosil transferase (UGGT)	ponta carbóxi de proteína que interage com CHAPERONA70 (CHIP)
Receptores de Reconhecimento de Padrão	Derlina-1	Calnexina
atanogene associado com Bcl-2 (Bag-1)	GRP94	retículo endoplasmático p72
anticorpos de imunoglobulina M (IgM) (humana) (amplo espectro)	proteínas que atuam no sistema de degradação associado com retículo endoplasmático (ERAD, endoplasmic reticulum associated degradation system)	A família de receptor de lipoproteína de (muito) baixa densidade
receptor de Fc		
*Anticorpos monoclonais desenvolvidos em colaboração com a Instalação do Hibridoma de ABC, Utrecht University, Utrecht, Países Baixos		

Tabela 4
ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume

subtipo de Neisseria	P1.5-2,10			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	1788	22612
2	50	485	2545	11256
3	50	50	368	1733
4	50	50	1150	14785
5	50	50	288	16255
média	50	137	1228	13328
Desvio padrão	0	195	959	7675

Tabela 5
ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume

Subtipo de Neisseria	P1.12-1,13			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	50	491
2	50	50	50	2228
3	50	50	360	558
4	50	50	50	426
5	50	271	50	1086
média	50	94	112	958
Desvio padrão	0	99	139	757

Tabela 6 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.7-2,4			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	50	1561
2	50	50	3363	29572
3	50	50	393	59201
4	50	50	260	40023
5	50	50	221	7418
média	50	50	857	27555
Desvio padrão	0	0	1406	23676

Tabela 7 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.5-2,10			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	168	9457
2	50	569	2129	30371
3	50	177	50	27580
4	50	50	200	177000
5	50	50	363	10430
média	50	179	582	50968
Desvio padrão	0	225	872	71102

Tabela 8 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.12-1,13			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	322	50
2	50	50	50	50
3	50	50	50	50
4	50	50	50	50
5	50	50	50	50
média	50	50	104	50
Desvio padrão	0	0	122	0

Tabela 9 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.7-2,4			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	50	3140
2	50	50	1454	9334
3	50	50	1086	604
4	50	50	50	256
5	50	50	433	51728
média	50	50	615	13012
Desvio padrão	0	0	632	21946

Tabela 10 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.5-2,10			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	50	50
2	50	50	50	50
3	50	50	50	50
4	50	50	50	50
5	50	50	50	50
média	50	50	50	50
Desvio padrão	0	0	0	0

Tabela 11 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.12-1,13			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	50	50
2	50	50	50	50
3	50	50	50	50
4	50	50	50	50
5	50	50	50	50
média	50	50	50	50
Desvio padrão	0	0	0	0

Tabela 12 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.7-2,4			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50		50
2	50	50	50	50
3	50	50	50	50
4	50	50	50	50
5	50	50	50	50
média	50	50	50	50
Desvio padrão	0	0	0	0

Tabela 13 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.5-2,10			
	Titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	379	1331	34857
2	50	50	809	8932
3	50	176	111	1397
4	50	50	422	243
5	50	50	553	22067
média	50	141	645	13499
Desvio padrão	0	144	458	14770

Tabela 14 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.12-1,13			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	50	690
2	50	50	50	7713
3	50	50	488	50
4	50	50	50	50
5	50	50	50	1104
média	50	50	138	1921
Desvio padrão	0	0	196	3268

Tabela 15 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.7-2,4			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	50	1285
2	50	123	780	12423
3	50	211	601	46043
4	50	227	50	26469
5	50	50	50	975
média	50	132	306	17439
Desvio padrão	0	85	356	19085

Tabela 16 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.5-2,10			
	titulação			
camundongo nº	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	319	13565
2	50	160	1285	22402
3	50	1691	1530	4532
4	50	50	50	288
5	50	266	389	4150
média	50	443	715	8987
Desvio padrão	0	703	651	8942

Tabela 17 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.12-1,13			
	titulação			
camundongo n°	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	116	50
2	50	50	50	50
3	50	50	50	50
4	50	50	50	50
5	50	50	50	756
média	50	50	63	191
Desvio padrão	0	0	30	316

Tabela 18 ELISA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume				
Subtipo de Neisseria	P1.7-2,4			
	titulação			
camundongo n°	Dia 0	Dia 14	Dia 28	Dia 42
1	50	50	50	499
2	50	50	1361	24390
3	50	112	244	4113
4	50	50	50	50
5	50	50	417	1473
média	50	62	424	6105
Desvio padrão	0	28	545	10342

Tabela 19 SBA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume						
Subtipo de Neisseria	P1.5-2,10		P1.12-1,13		P1.7-2,4	
	titulação		titulação		titulação	
camundongo n°	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42
1	160	320	5	5	5	5
2	5	160	5	5	5	1280
3	5	5	5	5	5	1280
4	160	1280	5	5	5	5
5	5	1280	5	5	5	5
média	67	609	5	5	5	515
Desvio padrão	76	557	0	0	0	625

Tabela 20 SBA com camundongos de grupo B, PorA adjuvantada com alume						
Subtipo de Neisseria	P1.5-2,10		P1.12-1,13		P1.7-2,4	
	titulação		titulação		titulação	
camundongo n°	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42
1	5	1280	5	5	5	10
2	1280	1280	5	5	10	20
3	5	1280	5	5	5	5
4	5	320	5	5	5	5
5	5	640	5	5	5	1280
média	260	960	5	132	6	264
Desvio padrão	510	405	0	254	2	508

Tabela 21 SBA com camundongos de grupo C, PorA adjuvantada com alume						
Subtipo de Neisseria	P1.5-2,10		P1.12-1,13		P1.7-2,4	
	titulação		titulação		titulação	
camundongo n°	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42
1	5		5	5	5	5
2	5		5	5	5	5
3	5		5	5	5	5
4	5		5	5	5	5
5	5		5	5	5	5
média	5		5	5	5	5
Desvio padrão	0		0	0	0	0

Tabela 22 SBA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume						
Subtipo de Neisseria	P1.5-2,10		P1.12-1,13		P1.7-2,4	
	titulação		titulação		titulação	
camundongo n°	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42
1	40	1280	5	5	5	5
2	5	5	5	5	5	5
3	5	640	5	5	5	160
4	5	5	5	5	5	5
5	20	1280	5	5	5	5
média	15	642	5	5	5	36
Desvio padrão	14	570	0	0	0	62

Tabela 23
SBA com camundongos de grupo A, PorA adjuvantada com alume

Subtipo de Neisseria	P1.5-2,10		P1.12-1,13		P1.7-2,4	
	titulação		titulação		titulação	
camundongo nº	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42	Dia 28	Dia 42
1	5	5	5	5	5	5
2	20	1280	5	5	5	320
3	80	320	5	5	5	160
4	5	10	5	5	5	5
5	10	80	5	40	5	5
média	24	339	5	12	5	99
Desvio padrão	29	484	0	14	0	126

Tabela 24
Comparação de titulações de anticorpos anti-PorA e titulações de anticorpos bactericidas

	Titulações contra subtipos PorA				Ensaio‡
grupo†	camundongo nº	P1.5-2,10	P1.12-1,13	P1.7-2,4	
A	1	+	-	-	ELISA
A	1	+	-	-	
A	2	+	-	+	
A	2	+/-	-	+++	
A	3	-	-	[illegible]	
A	3	-	-	[illegible]	
A	4	+	-	+	
A	4	+++	-	-	
A	5	+	-	+/-	
A	5	+++	-	-	
B	1	+	[illegible]	+/-	
B	1	+++	[illegible]	-	
B	2	++	-	+	
B	2	+++	-	-	
B	3	++	-	-	
B	3	+++	-	-	
B	4	++++	-	[illegible]	
B	4	++	-	[illegible]	
B	5	+	-	++	
B	5	++	-	+++	
D	1	++	-	-	
D	1	+++	-	-	
D	2	+	-	+	
D	2	-	-	-	
D	3	[illegible]	-	+/-	
D	3	[illegible]	-	+/-	
D	4	-	-	-	
D	4	-	-	-	
D	5	+	-	-	
D	5	+++	-	-	
E	1	+	-	-	

E	1	-	-	-	
E	2	+	+/-	+/-	
E	2	+++	-	+	
E	3	+/-	-	+	
E	3	+	-	+/-	
E	4	-	-	+	
E	4	-	-	-	
E	5	+/-	-	-	
E	5	+/-	+/-	-	

† grupo A, PorA adjuvantada com alume; PorA não-adjuvantado; D, PorA adjuvantada com beta cruzada 25 %; PorA adjuvantada com beta cruzada a 75 %.
∫ titulações absolutas são dadas: sinais de - para nenhuma titulação, sinais de + para titulações.
Mais sinais de + referem-se a titulações relativamente altas.
‡ ELISA, ELISA de anticorpo anti-PorA; SBA, ensaio bactericida com soro. Ambos os ensaios com subtipos de PorA individuais. Ambos os ensaios com subtipos de PorA individuais.

Tabela 25: Sumário de sintomas em animais tratados com Gallimune® FLU H5N9

grupo	Dia	Número de camundongos com sintomas	Sintoma(s)
T10	22-25	8	Pelos eriçados
T10	22-25	8	Sentando com corcova
T10	26	2	Pelos eriçados
T10	26	1	Sentando com corcova
T10	30-41	2	Inchaço no sítio de inoculação

Tabela 26: escores clínicos após inoculação com H5N1

Grupo/Tratamento		Escore total por grupo														#
		Dias após infecção														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
T01	água	0	0	3	7	7	7	21	21	12	9	9	9	6	3	2
T03	Beta cruzada -I-III (33 %)	0	0	7	8	8	8	18	14	12	11	10	5	1	0	8
T10	vírus da gripe aviária (H5N9) inativado	0	0	3	8	8	8	6	5	3	3	1	1	0	0	8

Tabela 27: Sintomas respiratórios após exposição a H5N1

Grupo/Tratamento		Número de camundongos com sintomas														#
		Dias após infecção														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
T01	água	0	0	0	0	0	0	7/7	7/7	4/4	3/3	3/3	3/3	2/3	2/2	2
T03	beta cruzada -I-III (33 %)	0	0	0	0	0	0	5/8	4/8	3/8	3/8	3/8	1/8	0	0	0
T10	vírus da gripe aviária (H5N9) inativado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 28: Letalidade após inoculação com H5N1																
Grupo/Tratamento		Número de camundongos por grupo por dia														#
		Dias após infecção														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
T01	água	8	7	7	7	7	7	7	7	7	4	3	3	3	3	2	6
T03	beta cruzada -I-III (33 %)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0
T10	vírus da gripe aviária (H5N9) inativado	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	0

Tabela 29: titulações de neutralização de NPLa											
3#	Grupo	Dia 0	Dia 2	Dia 5	Dia 9	Dia 12	Dia 16	Dia 19	Dia 26	Dia 33	Dia 42
114	T01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	T01	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-
116	T01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	T01	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
118	T01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	T01	-	-	-	10	-	-	-	15	-	-
120	T02	-	-	-		10	-	-	10	-	#
121	T02	-	-	-	-	15	-	-	20	-	#
122	T02	-	-	-	-	10	-	-	10	-	#
123	T02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#
124	T02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#
125	T02	-	-	-	-	-	-	-	20	20	#
126	T03	-	10	-	-	-	-	-	15	20	15
127	T03	-	10	-	-	-	-	-	10	-	-
128	T03	-	-	-	-	-	-	-	10	10	-
129	T03	-	-	-	-	-	-	-	30	20	30
130	T03	-	-	-	-	-	-	-	20	0	15
131	T03	-	-	-	-	15	-	-	20	10	15
132	T04	-	-	-	-	-	-	-	10	-	#
133	T04	-	-	-	10	-	-	-	-	-	#
134	T04	-	-	-		-	-	-	20	20	#
135	T04	-	-	-	-	-	-	-	10	-	#
136	T04	-	-	-	-	15	-	-	20	-	#
137	T04	-	-	-	-	10	-	-	20	20	#
138	T05	-	-	-	-	-	-	-	10	10	#
139	T05	-	10	-	-	-	-	-	15	10	#
140	T05	-	-	15	-	-	-	-	15	-	#
141	T05	-	-	-	-	-	-	-	10	10	#
142	T05	-	-	-	-	-	-	-	20	-	#
143	T05	-	-	-	-	-	-	-	240	60	160
144	T06	-	-	-	10	160	640	3840	≥10240	40960	81920
145	T06	-	-	-	15	120	960	2560	≥10240	20480	122880
146	T06	-	-	-	15	80	80	320	≥10240	2560	10240
147	T06	-	-	-	15	60	240	1280	≥10240	20480	61440
148	T06	-	-	-	10	30	480	5120	≥10240	≥40960	61440
149	T06	-	-	-	15	160	160	640	≥10240	10240	20480

Tabela 30: Sumário de sintomas clínicos					
grupo	Mal-estar	Problemas de digestão	Problemas respiratórios	Sangramentos	
T01	Controle	(60 %)76 % (100 %)	(8 %)23 % (38 %)	(8 %)22 % (33 %)	(20 %)26 % (38 %)
T03	E2 adjuvantada com beta cruzada	(58 %)65 %(71 %)	(13 %)37 % (60 %)	-	(7 %)8 %(20 %)
Teste t de Student (valor P)		0,092	0,078	0,006	0,002

Tabela 31: Escores clínicos após exposição																
		Dias após infecção														
#	Thx	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
114	T01	-	-	-	-	1	3	3	3	3	5	5	4	‡		
115	T01	1	1	1	1	1	4	4	5	5	6	6	4	6,‡		
116	T01	-	-	-	-	2	2	3	3	3	3	4	4	6,‡		
117	T01	-	-	-	-	2	2	3	3	5	7,‡					
118	T01	-	-	-	-	2	2	4	3	3	3	5	5	‡		
119	T01	-	-	-	-	2	2	4	4	4	5	5	5	6,‡		
126	T03	-	-	-	-	-	2	5	4	3	3	4	2	4	3	2
127	T03	-	-	-	-	-	1	3	3	3	4	4	4	†		
128	T03	-	-	-	-	-	2	3	3	4	5	5	2	3	4	5
129	T03	-	-	-	-	-	1	3	2	2	2	3	2	2	1	1
130	T03	-	-	-	-	-	1	3	3	2	2	4	2	3	3	3
131	T03	-	-	-	-	-	2	4	4	4	3	3	4	4	4	4
143	T05	-	-	-	-	-	2	4	4	4	4	3	3	4	4	4
444	T06	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
145	T06	-	-	-	-	-	-	-								
146	T06	-	-	-	-	-	-	-								
147	T06	-	-	-	-	-	-	-								
148	T06	-	-	-	-	-	-	-								
149	T06	-	-	-	-	-	-	-								

† morreram; ‡ eutanizados. Números indicam número de sinais clínicos.

Tabela 32 Temperatura

#	Grupo	Dias após Infecção														D
		1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	*13*	*14*	
114	TOI	39,4	39,8	40,2	41,3	41,1	41,5	41,5	41,6	40,8	40,2	40,2	38,3			9
115	TOI	39,2	39,4	39,9	41,3	41,1	43,0	42,0	41,6	41,0	41,4	40,4	40,4	39,4		9
116	TOI	39,7	39,7	40,3	40,8	41,0	41,4	40,9	41,3	41,3	40,4	40,4	39,6	38,6		9
117	TOI	39,2	39,5	40,2	41,8	41,4	42,0	43,0	41,6	41,1						7
118	TOI	39,6	39,8	40,3	41,8	41,2	41,5	41,7	41,7	41,1	41,3	40,5	39,7			9
119	T01	39,4	39,7	39,9	40,9	41,0	41,3	41,2	4112	40,7	41,2	39,8	39,3	38,7		7
126	T03	39,4	39,8	40,6	41,7	41,5	41,2	40,1	40,8	40,3	39,9	39,9	40,8	39,1	38,5	8
127	T03	39,6	39,7	40,0	41,3	41,3	41,8	41,6	40,0	40,9	41,2	41,1				9
128	T03	39,3	39,2	40,0	41,6	41,9	40,6	43,0	41,8	41,3	411,9	41,0	40,6	40,0	40,3	12
129	T03	39,6	39,6	39,9	40,4	40,6	41,3	41,3	40,2	40,1	40,5	39,5	39,7	39,7	39,7	7
130	T03	39,6	39,2	39,5	40,9	41,3	41,3	40,2	41,2	41,3	41,3	41,3	41,1	41,3	41,2	11
131	T03	39,6	39,5	40,3	41,5	41,5	41,0	41,4	40,7	40,0	40,0	39,9	39,1	39,0	39,6	8
143	T05	38,8	38,8	39,4	40,1	41,4	41,4	41,8	41,5	40,7	40,0	40,1	40,3	39,2	39,4	9
144	TOC	39,6	39,1	39,0	39,2	39,8	39,0	39,2	39,4	39,6	39,1	39,2	39,2	38,7	39,0	0
145	T06	39,1	39,5	39,3	39,2	39,3	39,1	39,3	39,2	39,4	39,1	39,3	39,2	38,9	39,2	0
146	TO6	39,2	39,3	38,9	39,1	39,5	39,3	39,4	39,3	39,7	39,0	39,6	39,5	38,9	39,3	0
147	TO6	39,3	39,0	38,9	39,0	39,5	38,9	39,1	38,9	39,5	38,7	39,0	39,0	39,1	39,0	0
148	T06	39,3	39,3	39,2	39,5	39,7	39,2	39,4	39,2	39,5	39,2	39,5	39,3	39,2	39,3	0
149	TO6	38,9	38,9	38,7	38,7	39,0	38,6	39,1	38,9	39,5	39,2	39,2	39,0	38,9	39,4	0

Na última coluna indica-se o número de dias com febre (>40,0°C).

Tabela 33: Escores de sintomas clínicos														
#	grupo	Sobrevivência	Mal Estar Geral		Problemas de Digestão			Sintomas respiratórios			Sangramentos			
			Início	Fim	Comprimento	Início	Fi m	Comprimento	Início	Fim	Comprimento	Início	Fim	Length
114	T01	12	4	12	8	10	10	1	9	12	4	9	12	3
115	T01	13	O	12	13	5	12	5	10	13	4	10	13	3
116	TOI	13	4	13	10	10	11	2	13	13	1	11	13	3
117	TOI	10	4	9	6	-	-	-	-	-	-	8	9	2
118	TOI	12	4	12	9	6	12	2	10	11	2	10	12	3
119	TOI	13	4	13	10	6	12	5	11	13	3	8	13	5
126	T03	>15	5	14	10	6	12	4	-	-	-	11	11	1
127	T03	12	5	11	7	7	11	5	-	-		11	11	1
128	T03	>15	5	14	10	8	14	6	-	-	-	12	14	3
129	TO3	>15	5	13	9	9	10	2	-	-	-	-	-	-
130	T03	>15	5	14	10	7	14	6	-	-	-	-	-	-
131	TO3	>15	5	14	10	6	14	9	-	-	-	11	14	2
143	T05	>15	5	13	9	6	14	8		-	-	-	-	-

início: o primeiro dia em que se observou um sinal clínico de doença. fim: o último dia em que se observou um sinal clínico.

duração: o número de dias com um sinal clínico. Note: não corrigido para sobrevida.

Tabela 34: Sumário de leucopenia observada na trombocitopenia após exposição infecção								
grupo			Leucopenia			Trombocitopenia		
T01	Placebo	N=6*	(2)	4	(5)	(5)	7	(9)
T03	E2 - beta cruzada	N=6	(2)	7	(10)	(2)	7	(10)
T06	E2+DOE	N=6	-	-	-	(1)	1	(1)
T03 versus T01 (teste T)			0,240			0,814		
T03 versus T06 (teste T)			0,005			0,048		

* todos os porcos morreram ou foram eutanizados

IDENTIDADES DE SEQÜÊNCIA

SEQÜÊNCIA ID 1

seqüência de DNA da hemaglutinina 5 (H5) da gripe aviária

ggatccgatcagatttgcattggttaccatgcaaacaactcgacagagcaggttgacacaataatggaaaaga
atgttactgttacacatgcccaagacatactggaaaggacacacaacgggaagctctgcgatctaaatggagtg
aagcctctcattttgagggattgtagtgtagctggatggctcctcggaaaccctatgtgtgacgaattcatcaatg
tgcccggaatggtcttacatagtggagaaggccagtccagccaatgacctctgttatccagggaatttcaacgact
atgaagaactgaaacacctattgagcagaataaaccattttgagaaaattcagatcatcccaaaagttcttgg
tccaatcatgatgcctcatcaggggtgagctcagcatgtccataccttgggaggtcctcttttcagaaatgtggt
atggcttatcaaaaagaacagtgcatacccaacaataaagaggagctacaataataccaaccaagaagatctt
ttggtactgtgggggattcaccatcctaaagatgcggcagagcagacaaagctctatcaaaatccaaccaccta
catttccgttggaacatcaacactgaaccagagattggttccagaaatagctactagacccaaagtaaacgggc
aaagtggaagaatggagttcttctggacaattttaaagccgaatgatgccatcaatttcgagagtaatggaaat
ttcattgctccagaatatgcatacaaaattgtcaagaaaggggactcaacaattatgaagagtgaattggaat
atggtaactgcaacaccaagtgtcaaactccaatgggggcgataaactctagtatgccattccacaacatacacc
ccctcaccatcgggggaatgccccaaatatgtgaaatcaaacagattagtccttgcgactggactcagaaataccc
ctcaaagagagagaagaagaaaaaagagaggactatttggagctatagcaggttttatagagggaggatgg
cagggaatggtagatggttggtatgggtaccaccatagcaatgagcaggggagtggatacgctgcagacaaa
gaatccactcaaaaggcaatagatggagtcaccaataaggtcaactcgatcattaacaaaatgaacactcagt
ttgaggccgttggaagggaatttaataacttggaaaggaggatagagaatttaaacaagaagatggaagacg
gattcctagatgtctggacttacaatgctgaacttctggttctcatggaaaatgagagaactctcgacttttcatga
ctcaaatgtcaagaacctttacgacaaggtccgactacagcttagggataatgcaaaggagctgggtaatggtt
gtttcgaattctatcacaaatgtgataatgaatgtatggaaagtgtaaaaaacggaacgtatgactacccgcag
tattcagaagaagcaagactaaacagagaggaaataagtggagtaaaattggaatcaatgggaacatacca
aatactggcggccgc

SEQÜÊNCIA ID 2

Seqüência de aminoácidos da hemaglutinina 5 (H5) da gripe aviária

mrpwtvvllllllicapsvagsdqicigyhannsteqvdtimeknvtvthaqdilerthngklcdlngvkpli
lrdcsvagwllgnpmcdefinvpewsyivekaspandlcypgnfndyeelkhllsrinhfekiqiipkssws
nhdassgvssacpylgrssffrnvvwlikknsayptikrsynntnqedllvlwgihhpkdaaeqtklyqnpt
tyisvgtstlnqrlvpeiatrpkvngqsgrmeffwtilkpndainfesngnfiapeyaykivkkgdstimkse
leygncntkcqtpmgainssmpfhnihpltigecpkyvksnrlvlatglrntpqrerrrkkrglfgaiagfieg
gwqgmvdgwygyhhsneqgsgyaadkestqkaidgvtnkvnsiinkmntqfeavgrefnnlerrienln
kkmedgfldvwtynaellvlmenertldfhdsnvknlydkvrlqlrdnakelgngcfefyhkcdnecmes
vkngtydypqyseearlnreeisgvklesmgtyqilaaa***dykdhdgdykdhdidykdhdgaahhh***
hhh

SEQÜÊNCIA ID 3

seqüência de DNA da hemaglutinina 7 (H7) da gripe aviária

Agatctgacaaaatctgccttgggcatcatgccgtgtcaaacgggactaaagtaaacacattaactgagagag
gagtggaagtcgttaatgcaactgaaacggtggaacgaacaaacgttccaggatctgctcaaaagggaaaa
ggacagttgacctcggtcaatgtggacttctgggacaatcactgggccacccaatgtgaccaattcctagaat
tttcggccgacttaattattgagaggcgagaaggaagtgatgtctgttatcctgggaaattcgtgaatgaagaa
gctctgaggcaaattctcagagagtcaggcggaattgacaaggagacaatgggattcacctacagcggaataa
gaactaatggagcaaccagtgcatgtaggagatcaggatcttcattctatgcagagatgaaatggctcctgtca
aacacagacaatgctgctttcccgcaaatgactaagtcatacaagaacacaaggaaagacccagctctgataa
tatgggggatccaccattccggatcaactacagaacagaccaagctatatgggagtggaaacaaactgataac
agttgggagttctaattaccaacagtcctttgtaccgagtccaggagcgagaccacaagtgaatggccaatctgg
aagaattgactttcattggctgatactaaaccctaatgacacggtcactttcagtttcaatgggggccttcatagctc
cagaccgtgcaagctttctgagagggaagtccatgggaattcagagtgaagtacaggttgatgccaattgtgaa
ggagattgctatcatagtggagggacaataataagtaatttgccctttcagaacataaatagcaaggcagtag
gaaaatgtccgagatatgttaagcaagagagtctgctgttggcaacaggagtgaagaatgtcccgaaatccc
aaagaggaggaggaggcctatttggtgctatagcgggtttcattgaaaatggatgggaaggtttgattgat
gggtggtatggcttcaggcatcaaaatgcacaagggaggaactgctgcagattacaaaagcacccaatcag
caattgatcaaataacagggaaattaaatcggcttatagaaaaaactaaccaacagtttgagttaatagacaa
tgaattcactgaggttgaaaagcaaattggcaatgtgataaactggaccagagattccatgacagaagtgtgg
tcctataacgctgaactcttagtagcaatggagaatcagcacacaattgatctggccgactcagaaatgaacaa
actgtacgaacgagtgaagagacaactgagagagaatgccgaagaagatggcactggttgcttcgaaatattt
cacaagtgtgatgacgactgcatggccagtattagaaacaacacctatgatcacagcaagtacagggaagaag
caatacaaaatagaatacagattgacccagtcaaactaagcagcggctacaaagatgtgatacttgcggccgc

SEQÜÊNCIA ID 4

Seqüência de aminoácidos da hemaglutinina 7 (H7) da gripe aviária

mrpwtwvlllllicapsyagsdkiclghhavsngtkvntltergvevvnatetvertnvpricskgkrtv
dlgqcgllgtitgppqcdqflefsadliierregsdvcypgkfvneealrqilresggidketmgftysgirtngat
sacrrsgssfyaemkwllsntdnaafpqmtksykntrkdpaliiwgihhsgstteqtklygsgnklitvgss
nyqqsfvpspgarpqvngqsgridfhwlilnpndtvtfsfngafiapdrasflrgksmgiqsevqvdanceg
dcyhsggtiisnlpfqnins*h*avgkcpryvkqeslllatg*v*knvpeipkrrrrglfgaiagfiengweglidgw
ygfrhqnaqgegtaadykstqsaidqitgklnrliektnqqfelidneftevekqignvinwtrdsmtevws
ynaellvamenqhtidladsemnklyervkrqlrenaeedgtgcfeifhkcdddcmasirnntydhskyre
eaiqnriqidpvklssgykdvilaaa**dykdhdgdykdhdidykdhdgaahhhhhh**

SEQÜÊNCIA ID 5

DNA da proteína E2 do Vírus da Febre Suína Clássica

GGTACC*GGATCC*ATCAAGGTGCTGCGGGGCCAGGTGGTGCAGGGGGTGAT
CTGGCTGCTGCTGGTGACAGGCGCCCAGGGCCGGCTGGCCTGCAAAGAGGACCACAGATA
CGCCATCAGCACCACCAACGAGATCGGCCTGCTGGGCGCCGAGGGCCTGACCACCACCTG
GAAAGAGTACAACCACAACCTGCAGCTGGACGACGGCACCGTGAAGGCCATCTGCATGGC
CGGCAGCTTCAAGGTGACCGCCCTGAACGTGGTGTCCCGGCGCTACCTGGCCAGCCTGCA
CAAGGATGCCCTGCCCACCTCCGTGACCTTCGAGCTGCTGTTCGACGGCACCAGCCCCCT
GACCGAGGAAATGGGCGACGACTTCGGCTTCGGCCTGTGCCCCTACGACACCAGCCCCGT
GGTGAAGGGCAAGTACAACACCACCCTGCTGAACGGCAGCGCCTTCTACCTGGTGTGCCC
CATCGGCTGGACCGGCGTGATCGAGTGCACCGCCGTGAGCCCCACCACCCTGAGGACCGA
GGTGGTGAAAACCTTCCGGCGCGAGAAGCCCTTCCCCTACCGGCGGGACTGCGTGACCAC

CACAGTGGAGAACGAGGACCTGTTCTACTGCAAGTGGGGCGGCAACTGGACCTGCGTGAA
GGGCGAGCCCGTGACCTACACCGGCGGACCCGTGAAGCAGTGCCGGTGGTGCGGCTTCGA
CTTCAACGAGCCCGACGGCCTGCCCCACTACCCCATCGGCAAGTGCATCCTGGCCAACGA
GACCGGCTACCGGATCGTGGACAGCACCGACTGCAACCGGGACGGCGTGGTGATCAGCAC
CGAGGGCAGCCACGAGTGCCTGATCGGCAACACCACAGTGAAGGTGCACGCCCTGGACGA
GCGGCTGGGCCCCATGCCCTGCCGGCCCAAAGAAATCGTGAGCAGCGCCGGACCCGTGCG
CAAGACCAGCTGCACCTTCAACTACGCCAAGACCCTGCGGAACCGGTACTACGAGCCCCG
GGACAGCTACTTCCAGCAGTACATGCTGAAGGGCGAATACCAGTATTGGTTCGACCTGGA
CGTGACCGACCGGCACAGCGACTACTTCGCCGAGTTT*GCGGCCGC*GAGCTC

SEQÜÊNCIA ID 6

Aminoácido da proteína E2 do vírus da febre suína clássica

GTGSIKVLRGQVVQGVIWLLLVTGAQGRLACKEDHRYAISTTNEIGLLGAEGLTTTWKEY
NHNLQLDDGTVKAICMAGSFKVTALNVVSRRYLASLHKDALPTSVTFELLFDGTSPLTEE
MGDDFGFGLCPYDTSPVVKGKYNTTLLNGSAFYLVCPIGWTGVIECTAVSPTTLRTEVVK
TFRREKPFPYRRDCVTTTVENEDLFYCKWGGNWTCVKGEPVTYTGGPVKQCRWCGFDFN
E
PDGLPHYPIGKCILANETGYRIVDSTDCNRDGVVISTEGSHECLIGNTTVKVHALDERLG
PMPCRPKEIVSSAGPVRKTSCTFNYAKTLRNRYYEPRDSYFQQYMLKGEYQYWFDLDVTD
RHSDYFAEFAAAS

SEQÜÊNCIA ID 7

DNA e seqüência de aminoácidos da catepsina L3 de *Fasciola hepatica* catepsina (proteína CL3)

ggtaccggatccagcaacgacgtgagctggcacgagtggaagcggatgtacaacaaagag
G T G S S N D V S W H E W K R M Y N K E
tacaacggcgccgacgaggaacaccggcggaacatctggggcaagaacgtgaagcacatc
Y N G A D E E H R R N I W G K N V K H I
gaggaacacaacctgcggcacgaccggggcctggtgacctacaagctgggcctgaaccag
E E H N L R H D R G L V T Y K L G L N Q
ttcaccgaccccacctttcgaggaattccaggccaagtacctgatggaaatgagccccgtg
F T D P T F E E F Q A K Y L M E M S P V
agcgagagcctgagcgacggcgtgagctacgaggccgagggcaacgatgtgcccgccagc
S E S L S D G V S Y E A E G N D V P A S
atcgactggcgggagtacggctacgtgaccgaggtgaaggaccagggccagtgcggcagc
I D W R E Y G Y V T E V K D Q G Q C G S
tgctgggccttcagcgccgtgggcgccatcgagggccagtacgtgaagaagttccagaac
C W A F S A V G A I E G Q Y V K K F Q N
cagaccctgttcagcgagcagcagctggtcgactgcacccggcggttcggcaaccacggc
Q T L F S E Q Q L V D C T R R F G N H G
tgtggcggcggatggatggaaaacgcctacaagtatctgaagaacagcggcctggaaacc
C G G G W M E N A Y K Y L K N S G L E T
gccagctactacccctaccaggccgtggagtaccagtgccagtaccggaaagaactgggc
A S Y Y P Y Q A V E Y Q C Q Y R K E L G
gtggccaaggtgaccggcgcctacaccgtgcacagcggcgacgagatgaagctgatgccc
V A K V T G A Y T V H S G D E M K L M P
atggtgggccgggaaggccctgccgccgtggccgtggacgcccagagcgacttctacatg
M V G R E G P A A V A V D A Q S D F Y M
tacgagagcggcatctttcagagccagacctgcaccagcagaagcgtgacccacgccgtc
Y E S G I F Q S Q T C T S R S V T H A V
ctggccgtgggctacggcaccgagtccggcaccgactactggattctgaagaactcctgg
L A V G Y G T E S G T D Y W I L K N S W
ggcaagtggtggggcgaggacggctacatgcggttcgcccggaaccggggcaacatgtgc
G K W W G E D G Y M R F A R N R G N M C

gccatcgccagcgtggcctccgtgcctatggtggagcggttccccgcggccgccgagctc
A I A S V A S V P M V E R F P A A A S

SEQÜÊNCIA ID 8

Seqüência de aminoácidos do peptídio de catepsina L3 de *Fasciola hepatica* com uma extensão Cys amino-terminal (peptídio CL3)

CSNDVSWHEWKRMYNKEYNG

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma composição imunogênica, compreendendo pelo menos um peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína, caracterizado pelo fato de compreender prover referida composição com pelo menos uma estrutura β-cruzada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida estrutura β-cruzada é induzida em pelo menos parte de referido pelo menos um peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína.

3. Uso de estruturas β-cruzadas, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma vacina para a profilaxia de uma doença infecciosa.

4. Uso de estruturas β-cruzadas induzidas em um componente de proteína de um agente infeccioso, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma vacina induzindo uma resposta imune contra referido agente infeccioso.

5. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que referido componente de proteína é uma proteína viral e em que referido agente infeccioso é um vírus.

6. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que referido componente de proteína é uma proteína bacteriana e em que referido agente infeccioso é uma bactéria.

7. Vacina de subunidade, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos uma proteína viral, em que pelo menos 4-50%, preferivelmente 10-30% de referida proteína viral está em uma conformação compreendendo estruturas β-cruzadas.

8. Vacina de subunidade, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos uma proteína bacteriana, em que pelo menos 4-50%, preferivelmente 10-30% de referida proteína bacteriana está em uma conformação compreendendo estruturas β-cruzadas.

9. Vacina de subunidade, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos duas proteínas virais, em que pelo menos 4-50%, preferivelmente 10-30% de pelo menos uma das referidas proteínas virais está em uma conformação compreendendo estruturas β-cruzadas.

10. Vacina de subunidade, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos duas proteínas bacterianas, em que pelo menos 4-50%, preferivelmente 10-30% de pelo menos uma das referidas proteínas bacterianas está em uma conformação compreendendo estruturas β-cruzadas.

11. Método para melhorar a imunogenicidade de uma composição compreendendo pelo menos um peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína, e/ou lipoproteína, caracterizado pelo fato de compreender contatar pelo menos um de referido peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína com um agente indutor β-cruzado, assim provendo referida composição com estruturas β-cruzadas adicionais.

12. Método para intensificar a imunogenicidade de uma composição de vacina compreendendo pelo menos um peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína, e/ou lipoproteína, caracterizado pelo fato de compreender contatar pelo menos um dentre referido peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína com um agente indutor β-cruzado, assim provendo referida composição de vacina com estruturas β-cruzadas adicionais.

13. Método para determinar a quantidade de estruturas β-cruzadas em uma composição de vacina, caracterizado pelo fato de compreender contatar referida composição de vacina com pelo menos um composto de ligação de estrutura β-cruzada e relacionar a quantidade de estruturas β-cruzadas ligadas à quantidade de estruturas β-cruzadas presentes na composição de vacina.

14. Uso de estruturas β-cruzadas, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição imunogênica para a profilaxia e/ou

tratamento de câncer.

15. Uso de estruturas β-cruzadas, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição imunogênica para:

- imuno-castração e/ou

- a profilaxia e/ou tratamento de aterosclerose, amiloidoses, doenças autoimunes, rejeições de enxerto-versus-hospedeiro e/ou rejeições a transplantes.

16. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de compreender um antígeno bacteriano ou parasítico ou viral, referido antígeno compreendendo pelo menos entre 4-50%, preferivelmente 10-30% de referido antígeno está em uma conformação de estrutura β-cruzada.

17. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que referido antígeno compreende proteína HPV E6, proteína HPV E7, hemaglutinina H5 de influenza, hemaglutinina de influenza H7, proteína de pestivírus E2, proteína de Fasciola hepatica CL3 e/ou proteína de Neisseria PorA.

18. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizada pelo fato de que é uma vacina.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 ou 11-13, caracterizado pelo fato de que referido pelo menos um peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína, compreende HPV E6, HPV E7, Fasciola hepática CL3, Influenza H5, Influenza H7, proteína de pestivírus E2 e/ou proteína de Neisseria PorA.

20. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de compreender uma β2glicoproteína I ou um peptídeo antigênico da mesma, referida composição imunogênica compreendendo pelo menos entre 4-67%, preferivelmente 10-33% de referida proteína ou peptídeo em uma conformação de estrutura β-cruzada.

21. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de

compreender uma β2glicoproteína I ou um peptídeo antigênico da mesma, em que referida β2glicoproteína I, ou um peptídeo antigênico da mesma, é copulada a ou misturada com outra proteína ou peptídeo da mesma, compreendendo pelo menos entre 4-67%, preferivelmente 10-33% de referida outra proteína ou peptídeo em uma conformação de estrutura β-cruzada.

22. Uso de uma composição imunogênica como definida na reivindicação 20 ou 21, caracterizado pelo fato de ser para a profilaxia ou tratamento de uma doença autoimune.

23. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de compreender uma proteína bacteriana ou parasítica ou viral ou um peptídeo antigênico da mesma, referida proteína compreendendo pelo menos entre 4-67%, preferivelmente 10-33% de referida proteína ou peptídeo em uma conformação de estrutura β-cruzada.

24. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de compreender uma proteína bacteriana ou parasítica ou viral ou um peptídeo antigênico da mesma, em que referida proteína ou peptídeo antigênico é copulado a ou misturado com outra proteína ou peptídeo compreendendo pelo menos entre 4-67%, preferivelmente 10-33% de referida outra proteína ou peptídeo em uma conformação de estrutura β-cruzada.

25. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 21 ou 24, caracterizada pelo fato de que a referida outra proteína compreende OVA ou KLH ou uma combinação de ambos.

26. Composição imunogênica ou vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 7-10, 16-18, 20-21, ou 23-25, caracterizada pelo fato de ainda compreender um adjuvante.

FIGURA 1

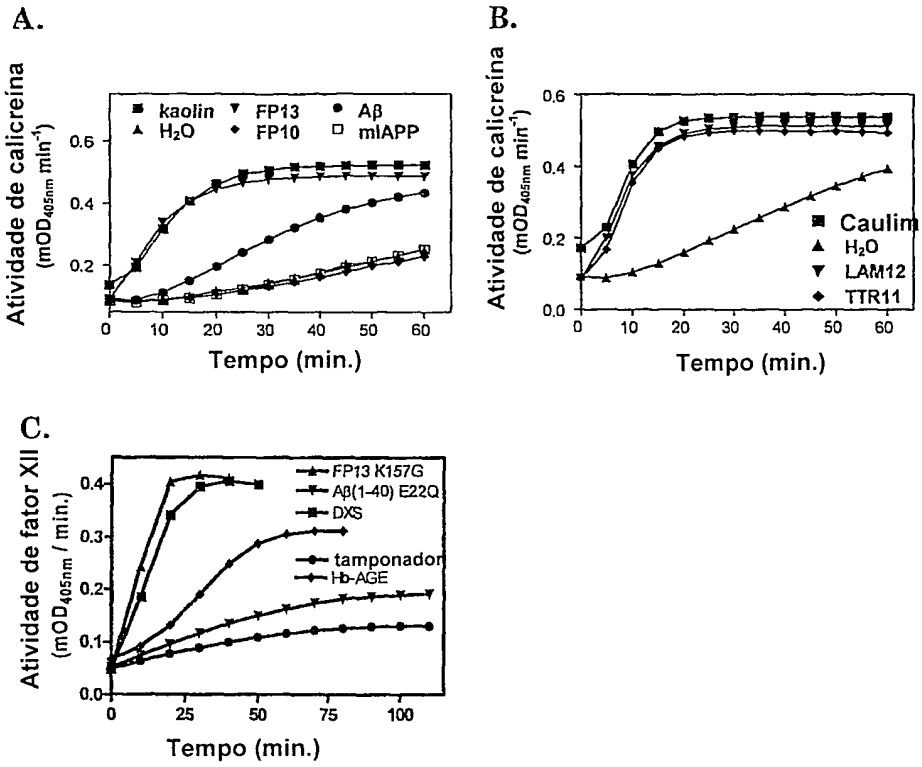

A.
Atividade de calicreína
(mOD405nm min-1)
kaolin
H2O
FP13
FP10
Aβ
mIAPP
Tempo (min.)
B.
Atividade de calicreína
(mOD405nm min-1)
Caulim
H2O
LAM12
TTR11
Tempo (min.)
C.
Atividade de fator XII
(mOD405nm / min.)
FP13 K157G
Aβ(1-40) E22Q
DXS
tamponador
Hb-AGE
Tempo (min.)

FIGURA 2

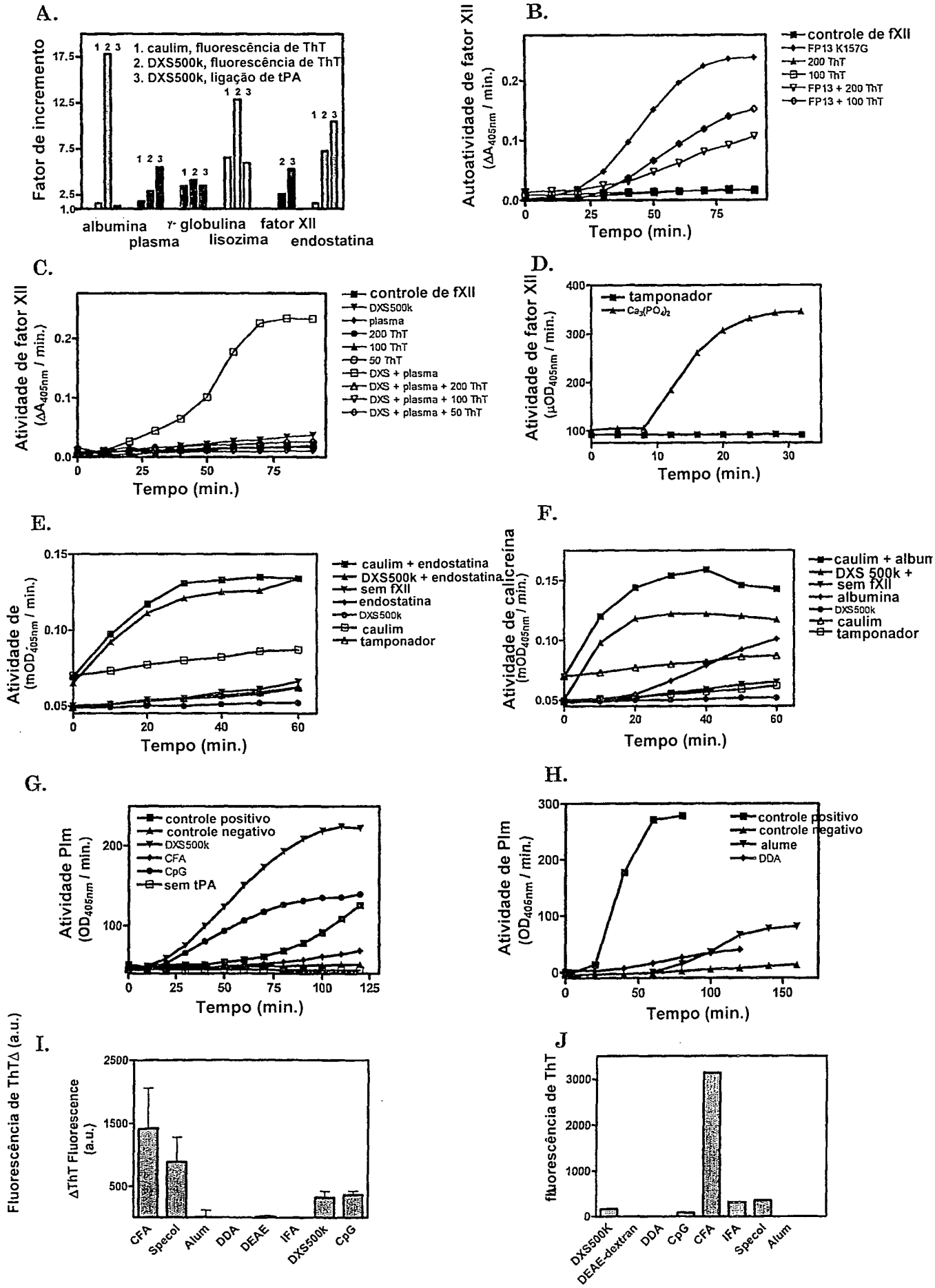

A.
Fator de incremento
1. caulim, fluorescência de ThT
2. DXS500k, fluorescência de ThT
3. DXS500k, ligação de tPA
albumina
plasma
γ- globulina
lisozima
fator XII
endostatina
B.
Autoatividade de fator XII
Tempo (min.)
controle de fXII
FP13 K157G
200 ThT
100 ThT
FP13 + 200 ThT
FP13 + 100 ThT
C.
Atividade de fator XII
Tempo (min.)
controle de fXII
DXS500k
plasma
200 ThT
100 ThT
50 ThT
DXS + plasma
DXS + plasma + 200 ThT
DXS + plasma + 100 ThT
DXS + plasma + 50 ThT
D.
Atividade de fator XII
Tempo (min.)
tamponador
E.
Atividade de
Tempo (min.)
caulim + endostatina
DXS500k + endostatina
sem fXII
endostatina
DXS500k
caulim
tamponador
F.
Atividade de calicreína
Tempo (min.)
caulim + albun
DXS 500k +
sem fXII
albumina
DXS500k
caulim
tamponador
G.
Atividade PIm
Tempo (min.)
controle positivo
controle negativo
DXS500k
CFA
CpG
sem tPA
H.
Atividade de PIm
Tempo (min.)
controle positivo
controle negativo
alume
DDA
I.
Fluorescência de ThTΔ (a.u.)
ΔThT Fluorescence (a.u.)
CFA
Specol
Alum
DDA
DEAE
IFA
DXS500k
CpG
J
fluorescência de ThT
DXS500K
DEAE-dextran
DDA
CpG
CFA
IFA
Specol
Alum

FIGURA 2 CONT.

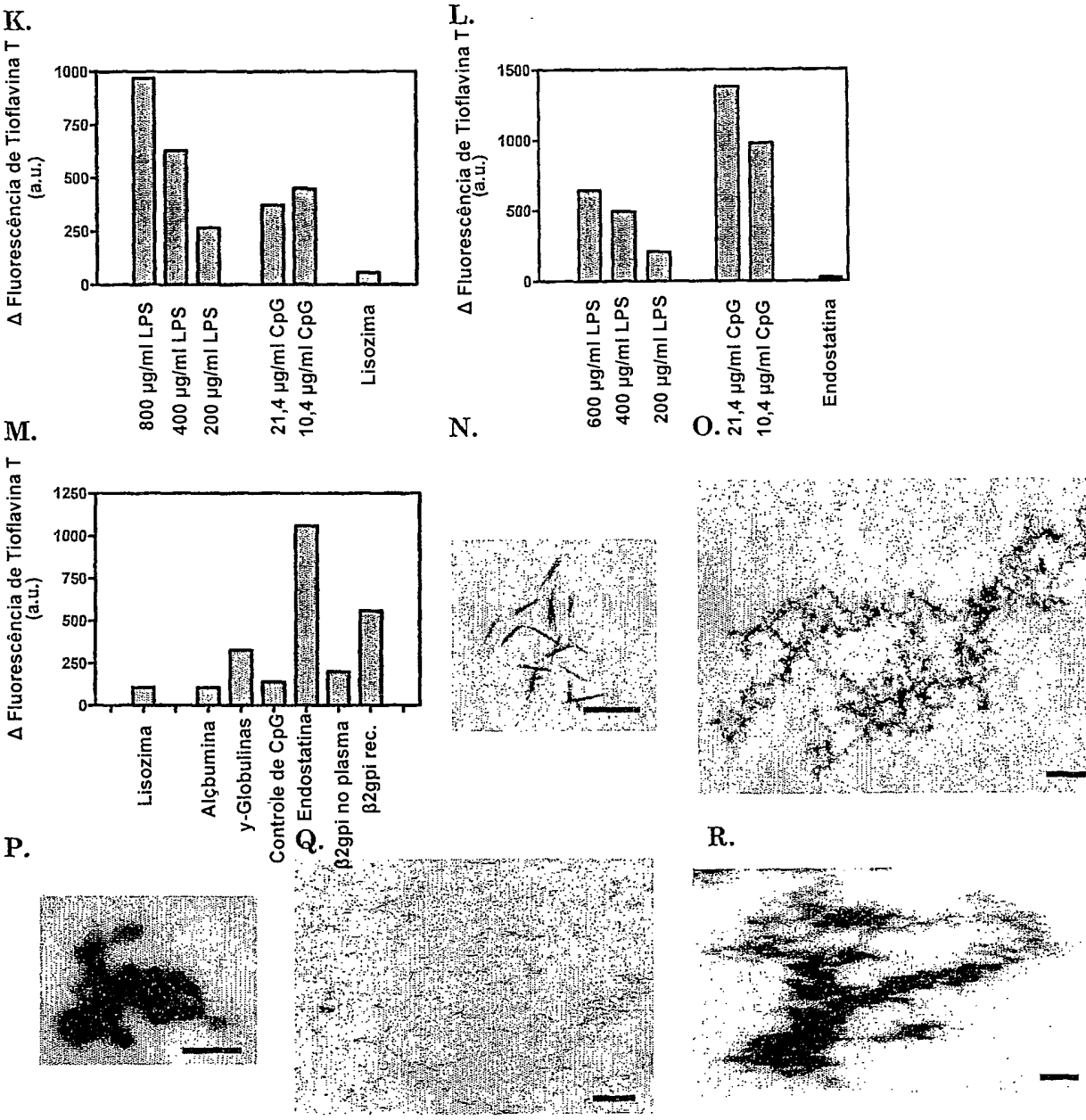


FIGURA 3

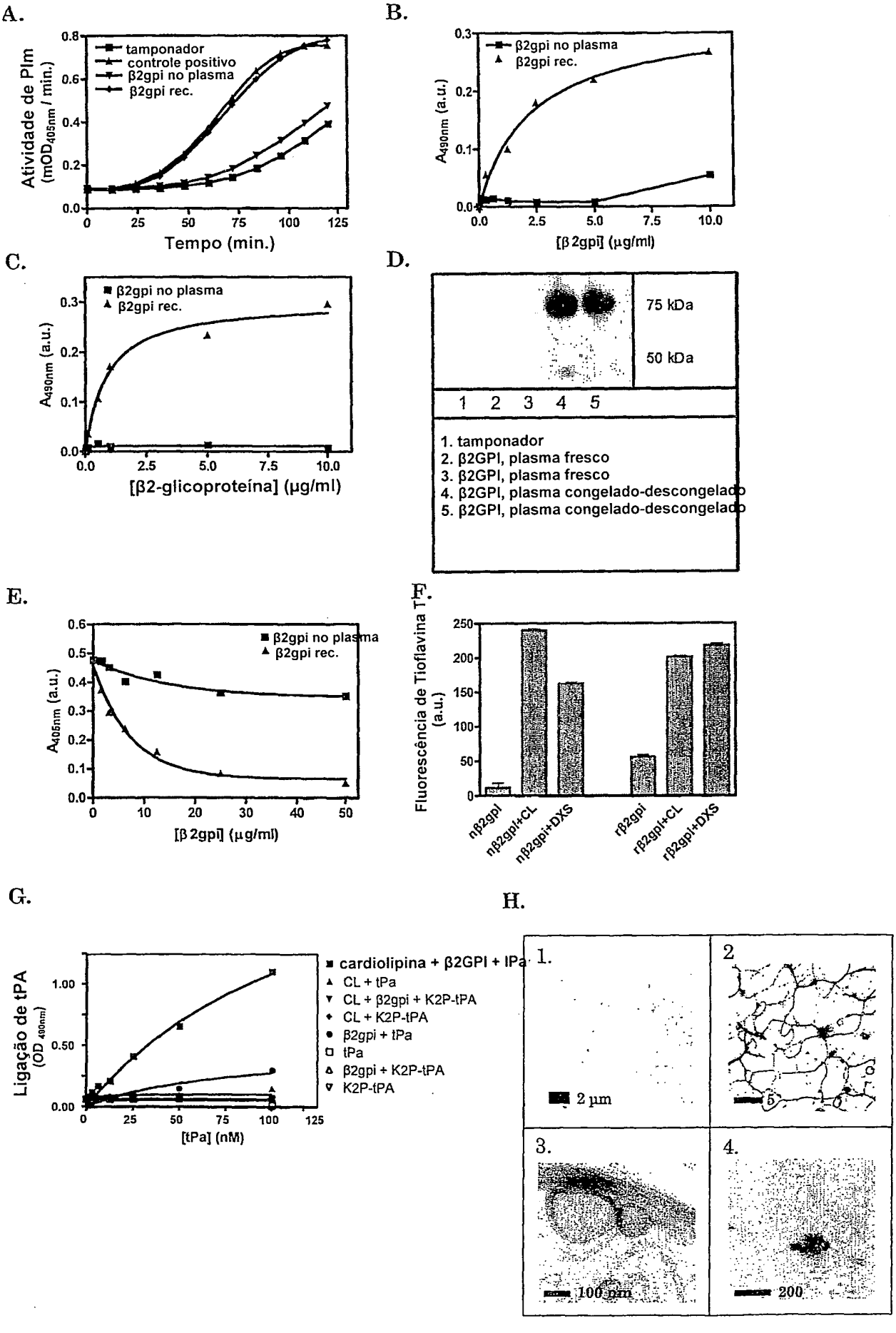
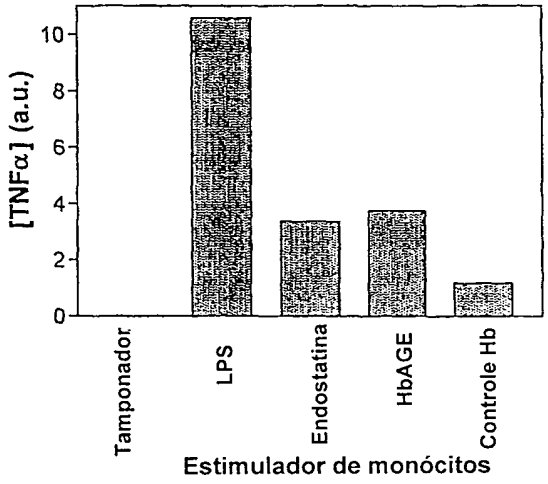
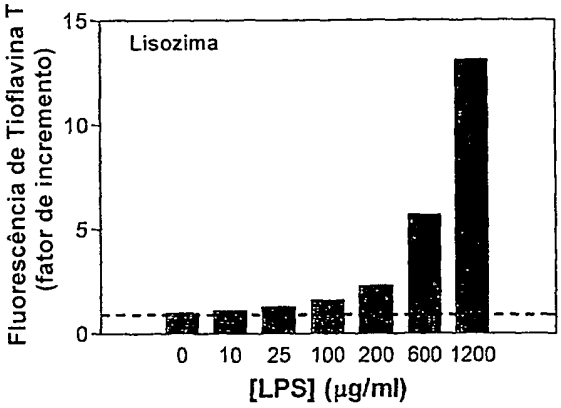

A.
Atividade de Plm (mOD405nm / min.)
tamponador
controle positivo
β2gpi no plasma
β2gpi rec.
Tempo (min.)
B.
β2gpi no plasma
β2gpi rec.
A490nm (a.u.)
[β 2gpi] (µg/ml)
C.
β2gpi no plasma
β2gpi rec.
A490nm (a.u.)
[β2-glicoproteína] (µg/ml)
D.
75 kDa
50 kDa
1 2 3 4 5
1. tamponador
2. β2GPI, plasma fresco
3. β2GPI, plasma fresco
4. β2GPI, plasma congelado-descongelado
5. β2GPI, plasma congelado-descongelado
E.
β2gpi no plasma
β2gpi rec.
A405nm (a.u.)
[β 2gpi] (µg/ml)
F.
Fluorescência de Tioflavina T (a.u.)
nβ2gpi
nβ2gpi+CL
nβ2gpi+DXS
rβ2gpi
rβ2gpi+CL
rβ2gpi+DXS
G.
Ligação de tPA (OD 490nm)
cardiolipina + β2GPI + tPa
CL + tPa
CL + β2gpi + K2P-tPA
CL + K2P-tPA
β2gpi + tPa
tPa
β2gpi + K2P-tPA
K2P-tPA
[tPa] (nM)
H.
1.
2 µm
2
3.
100 nm
4.
200

FIGURA 4

A.


[TNFα] (a.u.)
0
2
4
6
8
10
Tamponador
LPS
Endostatina
HbAGE
Controle Hb
Estimulador de monócitos

B.


Fluorescência de Tioflavina T
(fator de incremento)
Lisozima
0
5
10
15
0 10 25 100 200 600 1200
[LPS] (µg/ml)

C.

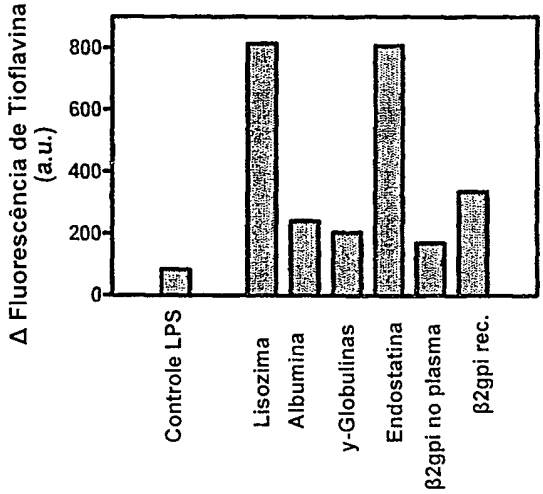

Δ Fluorescência de Tioflavina T
(a.u.)
0
200
400
600
800
Controle LPS
Lisozima
Albumina
γ-Globulinas
Endostatina
β2gpi no plasma
β2gpi rec.

FIGURA5

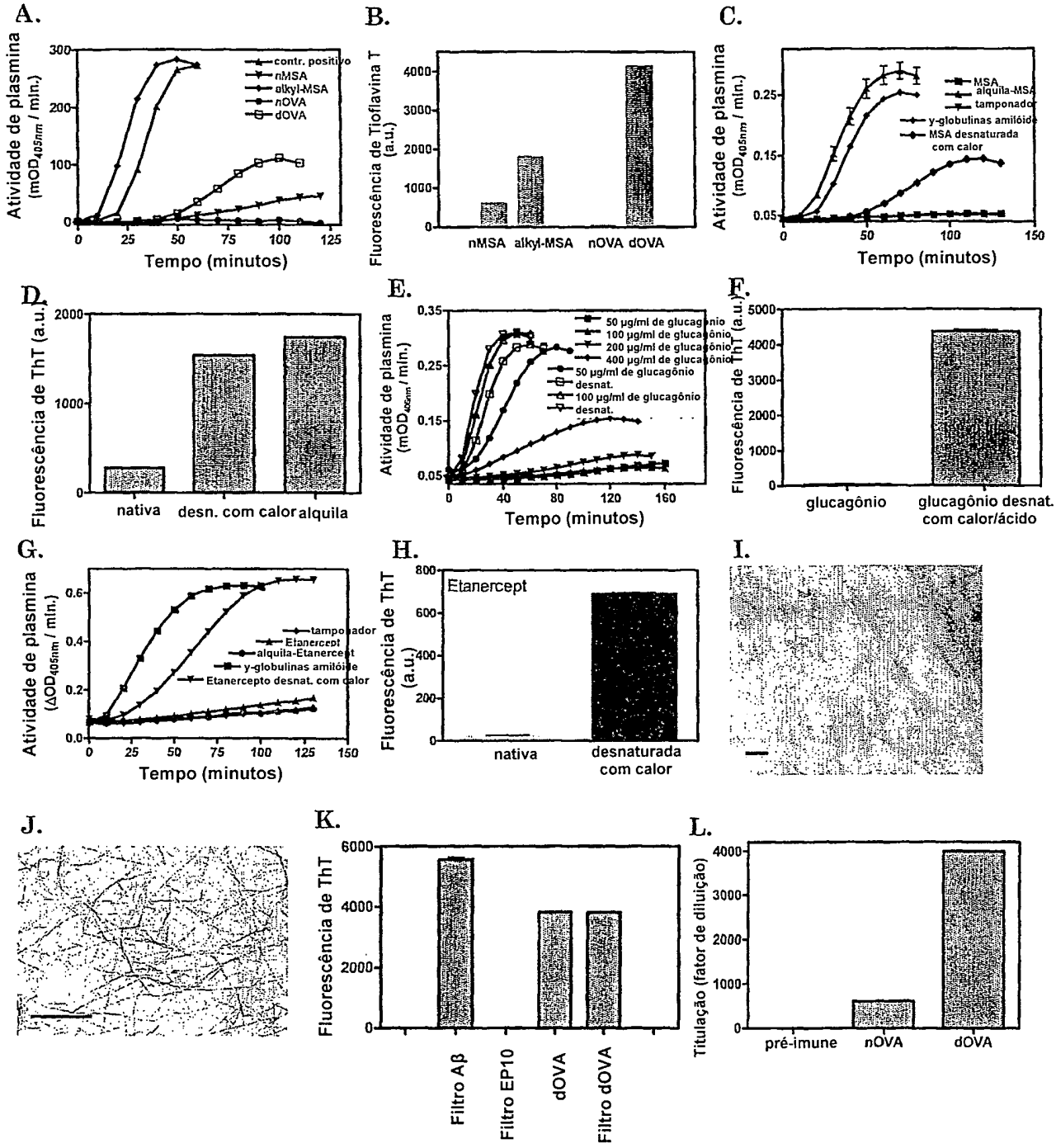

A.
Atividade de plasmina (mOD405nm / min.)
contr. positivo
nMSA
alkyl-MSA
nOVA
dOVA
Tempo (minutos)
B.
Fluorescência de Tioflavina T (a.u.)
nMSA alkyl-MSA nOVA dOVA
C.
Atividade de plasmina (mOD405nm / min.)
MSA
alquila-MSA
tamponado
γ-globulinas amilóide
MSA desnaturada com calor
Tempo (minutos)
D.
Fluorescência de ThT (a.u.)
nativa
desn. com calor
alquila
E.
Atividade de plasmina (mOD405nm / min.)
50 µg/ml de glucagônio
100 µg/ml de glucagônio
200 µg/ml de glucagônio
400 µg/ml de glucagônio
50 µg/ml de glucagônio desnat.
100 µg/ml de glucagônio desnat.
Tempo (minutos)
F.
Fluorescência de ThT (a.u.)
glucagônio
glucagônio desnat. com calor/ácido
G.
Atividade de plasmina (ΔOD405nm / min.)
tamponador
Etanercept
alquila-Etanercept
γ-globulinas amilóide
Etanercepto desnat. com calor
Tempo (minutos)
H.
Fluorescência de ThT (a.u.)
Etanercept
nativa
desnaturada com calor
I.
J.
K.
Fluorescência de ThT
Filtro Aβ
Filtro EP10
dOVA
Filtro dOVA
L.
Titulação (fator de diluição)
pré-imune
nOVA
dOVA

FIGURA 6

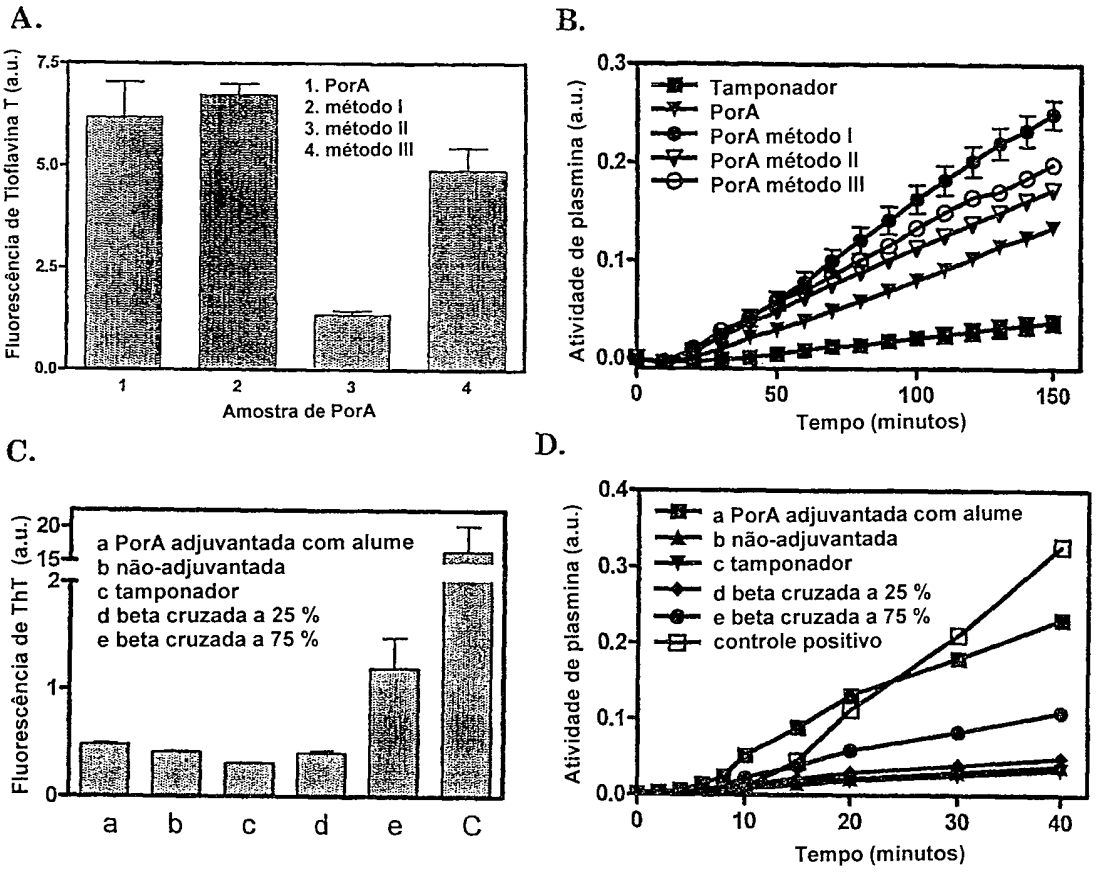

A.
Fluorescência de Tioflavina T (a.u.)
7.5
5.0
2.5
0.0
1. PorA
2. método I
3. método II
4. método III
1
2
3
4
Amostra de PorA
B.
Atividade de plasmina (a.u.)
0.3
0.2
0.1
0.0
Tamponador
PorA
PorA método I
PorA método II
PorA método III
0
50
100
150
Tempo (minutos)
C.
Fluorescência de ThT (a.u.)
20
15
2
1
0
a PorA adjuvantada com alume
b não-adjuvantada
c tamponador
d beta cruzada a 25 %
e beta cruzada a 75 %
a
b
c
d
e
C
D.
Atividade de plasmina (a.u.)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
a PorA adjuvantada com alume
b não-adjuvantada
c tamponador
d beta cruzada a 25 %
e beta cruzada a 75 %
controle positivo
0
10
20
30
40
Tempo (minutos)

FIGURA 7

A.

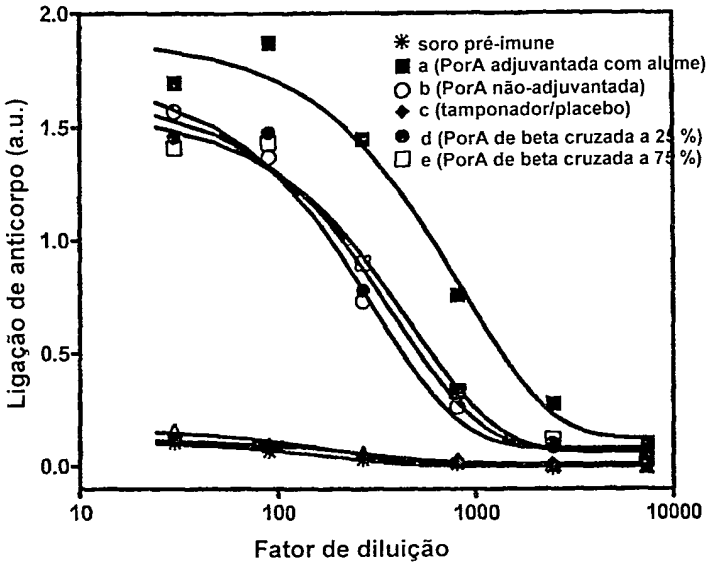
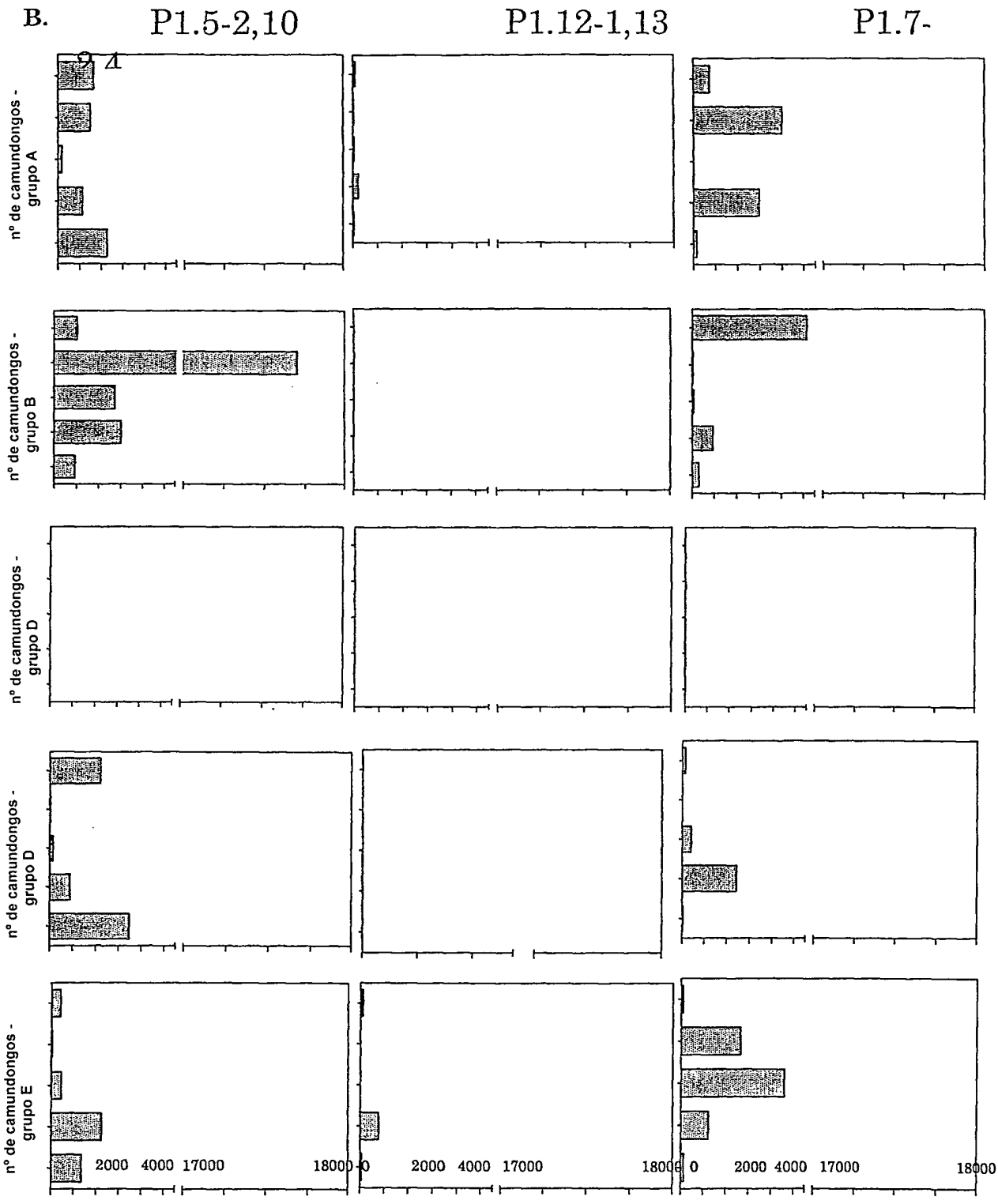

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Ligação de anticorpo (a.u.)
10
100
1000
10000
Fator de diluição
soro pré-imune
a (PorA adjuvantada com alume)
b (PorA não-adjuvantada)
c (tamponador/placebo)
d (PorA de beta cruzada a 25 %)
e (PorA de beta cruzada a 75 %)

FIGURA 7 CONT.



Titulação de anticorpos anti-PorA no dia 42 (camundongos individuais, titulação contra subtipos de PorA

FIGURA 7 CONT.

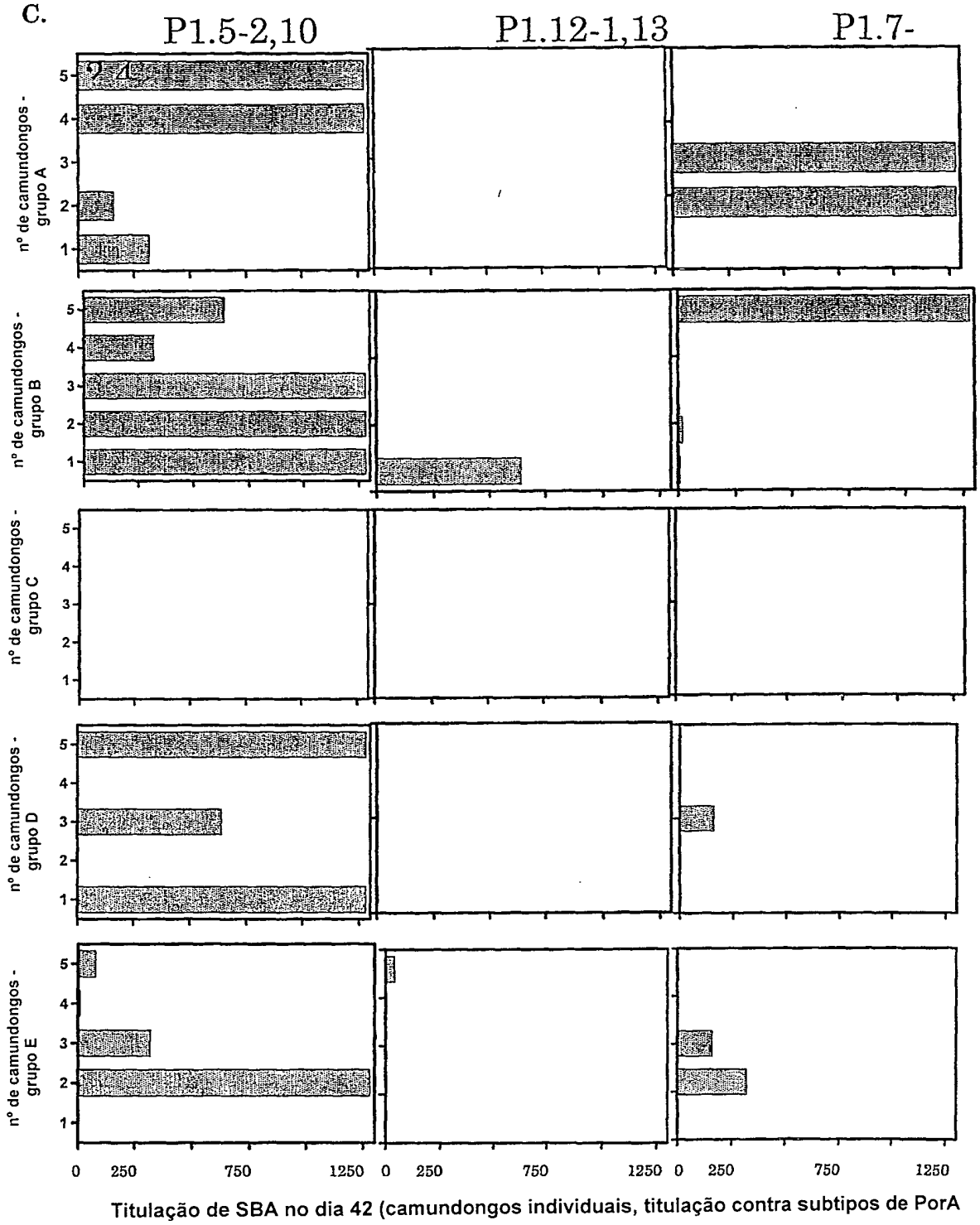


FIGURA 8

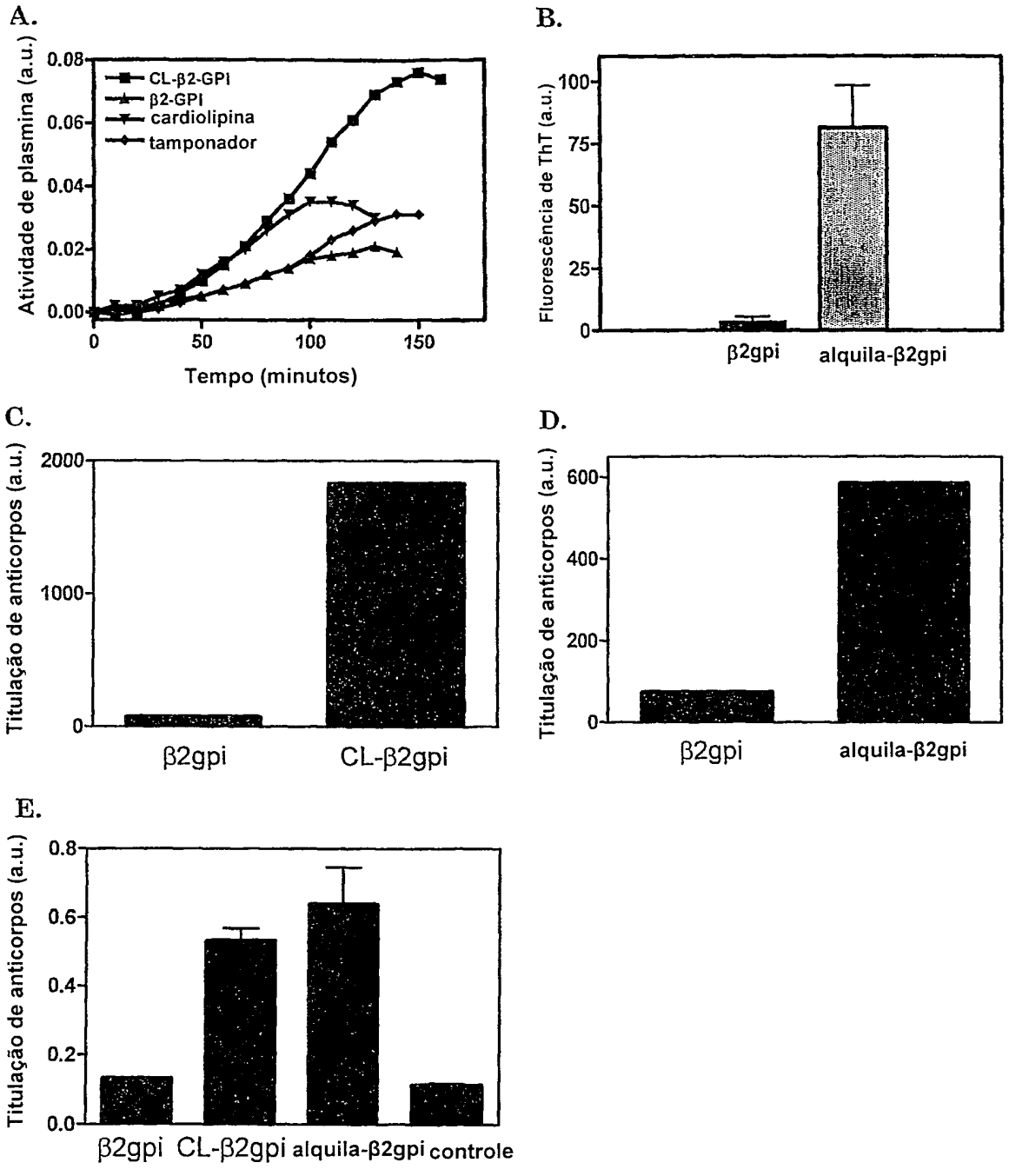

A.
Atividade de plasmina (a.u.)
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
CL-β2-GPI
β2-GPI
cardiolipina
tamponador
0
50
100
150
Tempo (minutos)
B.
Fluorescência de ThT (a.u.)
100
75
50
25
0
β2gpi
alquila-β2gpi
C.
Titulação de anticorpos (a.u.)
2000
1000
0
β2gpi
CL-β2gpi
D.
Titulação de anticorpos (a.u.)
600
400
200
0
β2gpi
alquila-β2gpi
E.
Titulação de anticorpos (a.u.)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
β2gpi
CL-β2gpi
alquila-β2gpi
controle

FIGURA 9

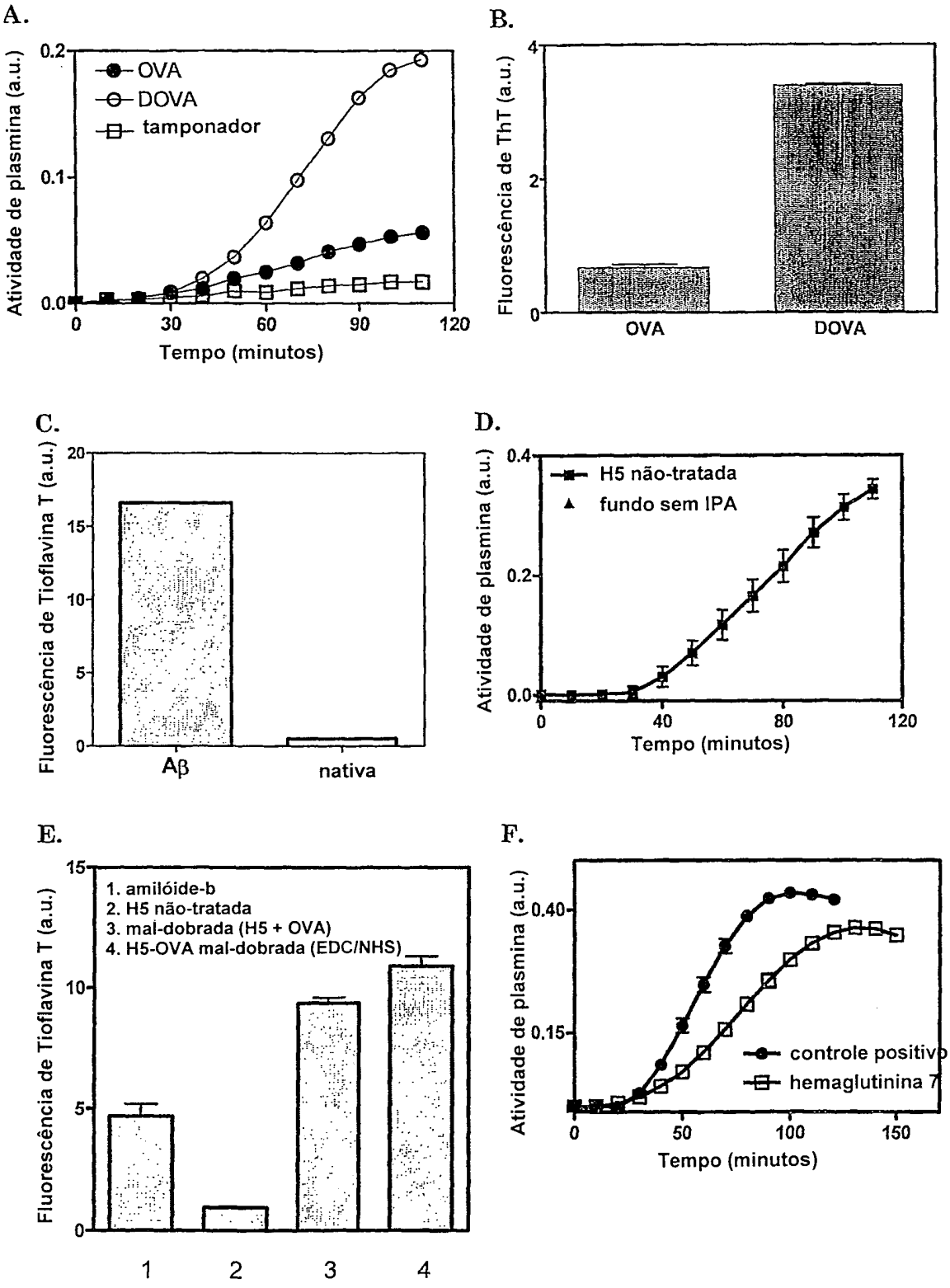
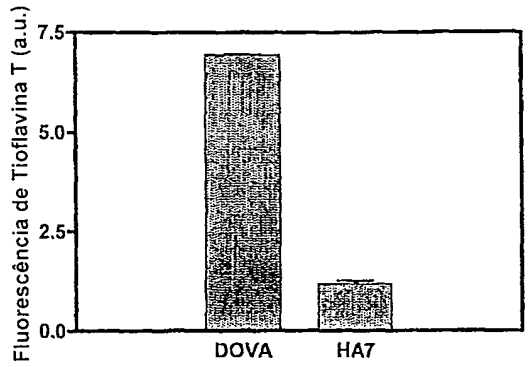
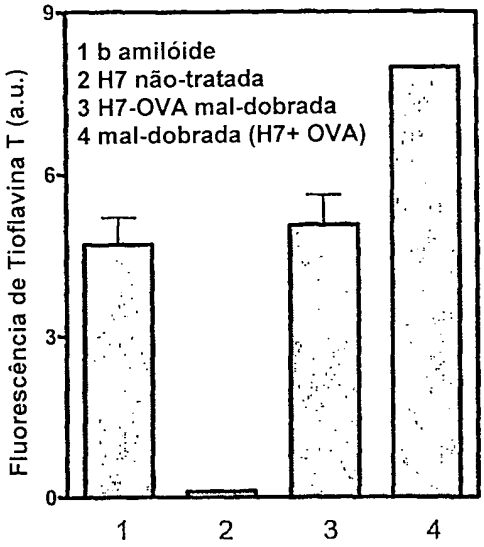

A.
Atividade de plasmina (a.u.)
0.2
0.1
0.0
OVA
DOVA
tamponador
0
30
60
90
120
Tempo (minutos)
B.
Fluorescência de ThT (a.u.)
4
2
0
OVA
DOVA
C.
Fluorescência de Tioflavina T (a.u.)
20
15
10
5
0
Aβ
nativa
D.
Atividade de plasmina (a.u.)
0.4
0.2
0.0
H5 não-tratada
fundo sem IPA
0
40
80
120
Tempo (minutos)
E.
Fluorescência de Tioflavina T (a.u.)
15
10
5
0
1. amilóide-b
2. H5 não-tratada
3. mal-dobrada (H5 + OVA)
4. H5-OVA mal-dobrada (EDC/NHS)
1
2
3
4
F.
Atividade de plasmina (a.u.)
0.40
0.15
controle positivo
hemaglutinina 7
0
50
100
150
Tempo (minutos)

FIGURA 9 CONT.

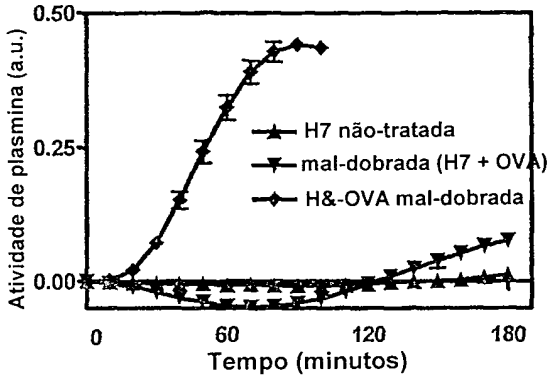
G.



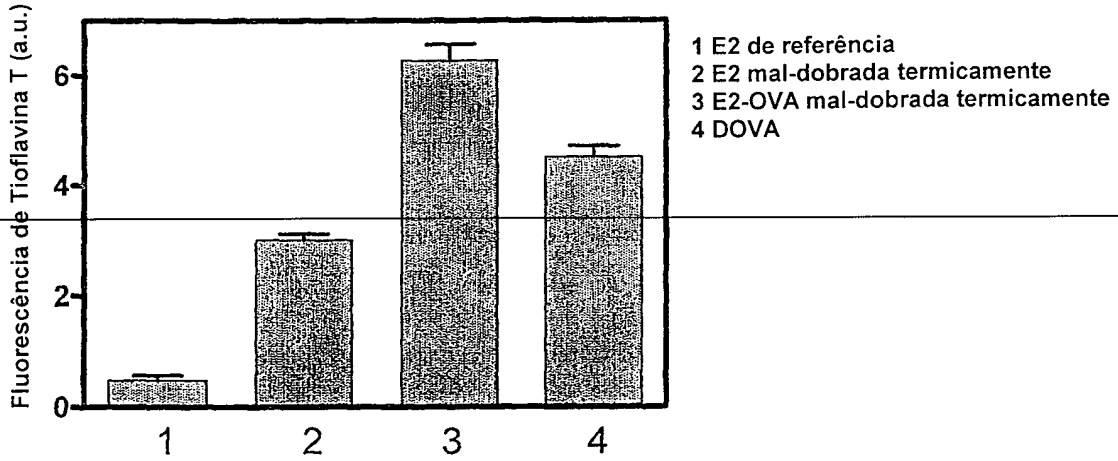
H.



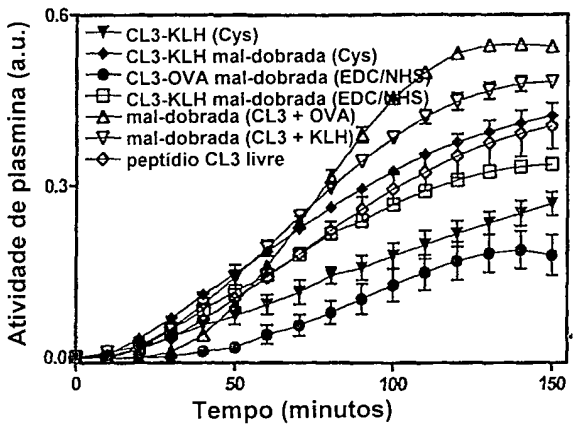
I.



J.



K.



L.

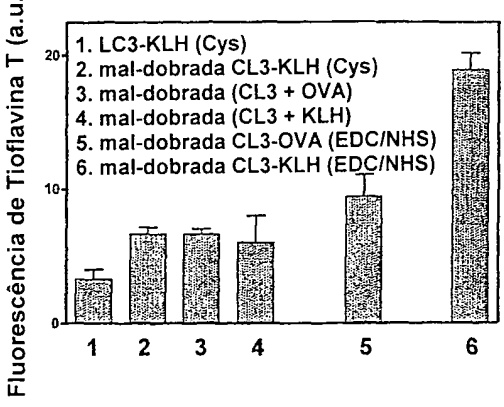


FIGURA 10

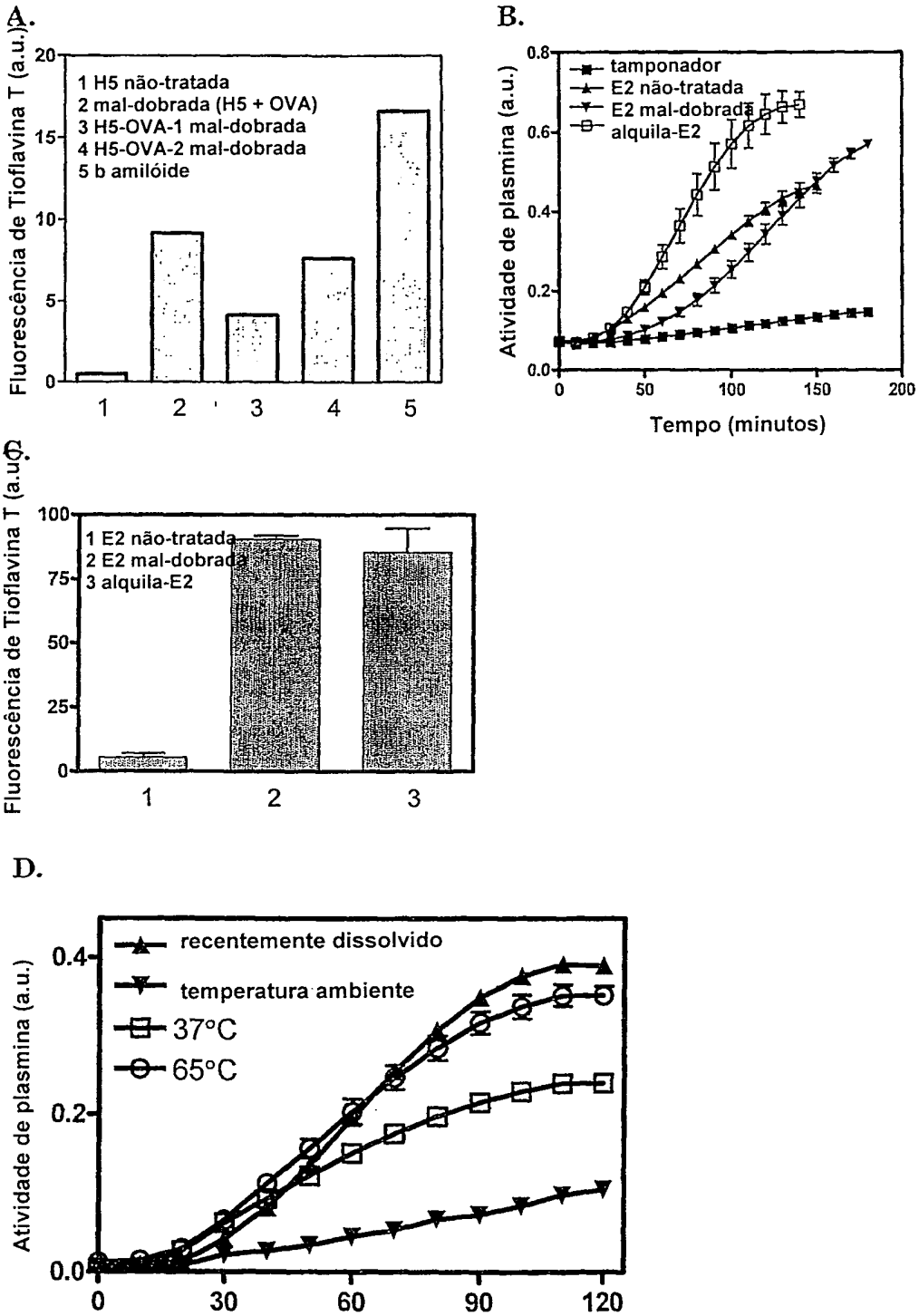
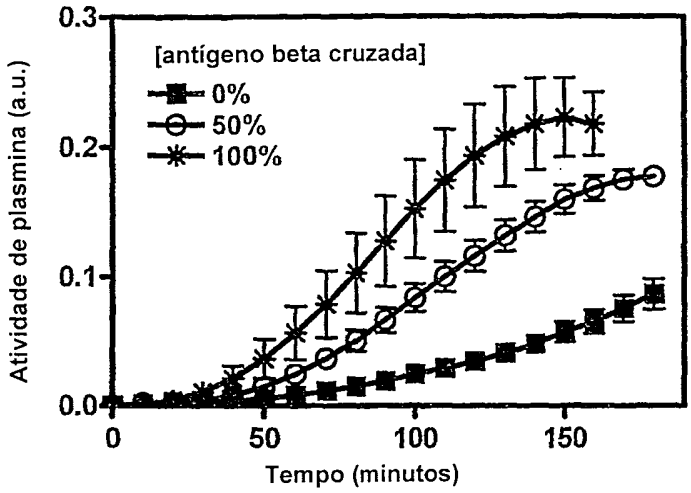
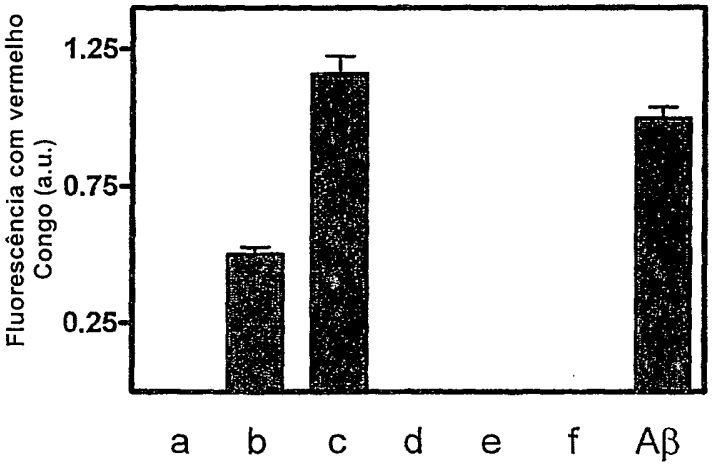

A.
Fluorescência de Tioflavina T (a.u.)
1 H5 não-tratada
2 mal-dobrada (H5 + OVA)
3 H5-OVA-1 mal-dobrada
4 H5-OVA-2 mal-dobrada
5 b amilóide
B.
Atividade de plasmina (a.u.)
tamponador
E2 não-tratada
E2 mal-dobrada
alquila-E2
Tempo (minutos)
C.
Fluorescência de Tioflavina T (a.u.)
1 E2 não-tratada
2 E2 mal-dobrada
3 alquila-E2
D.
Atividade de plasmina (a.u.)
recentemente dissolvido
temperatura ambiente
37°C
65°C

FIGURA 11

A.



B.



C.

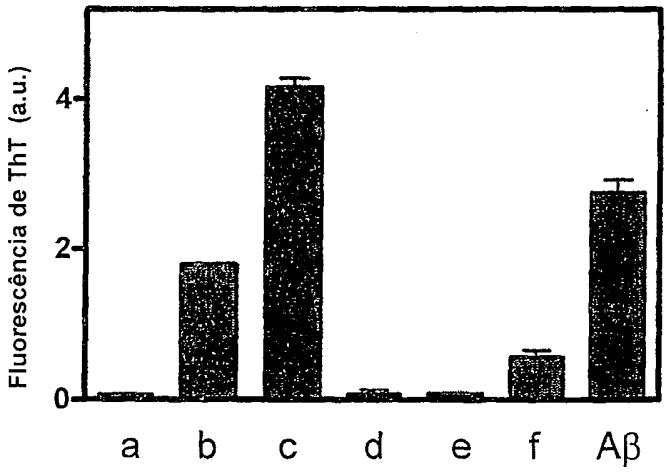


FIGURA 12

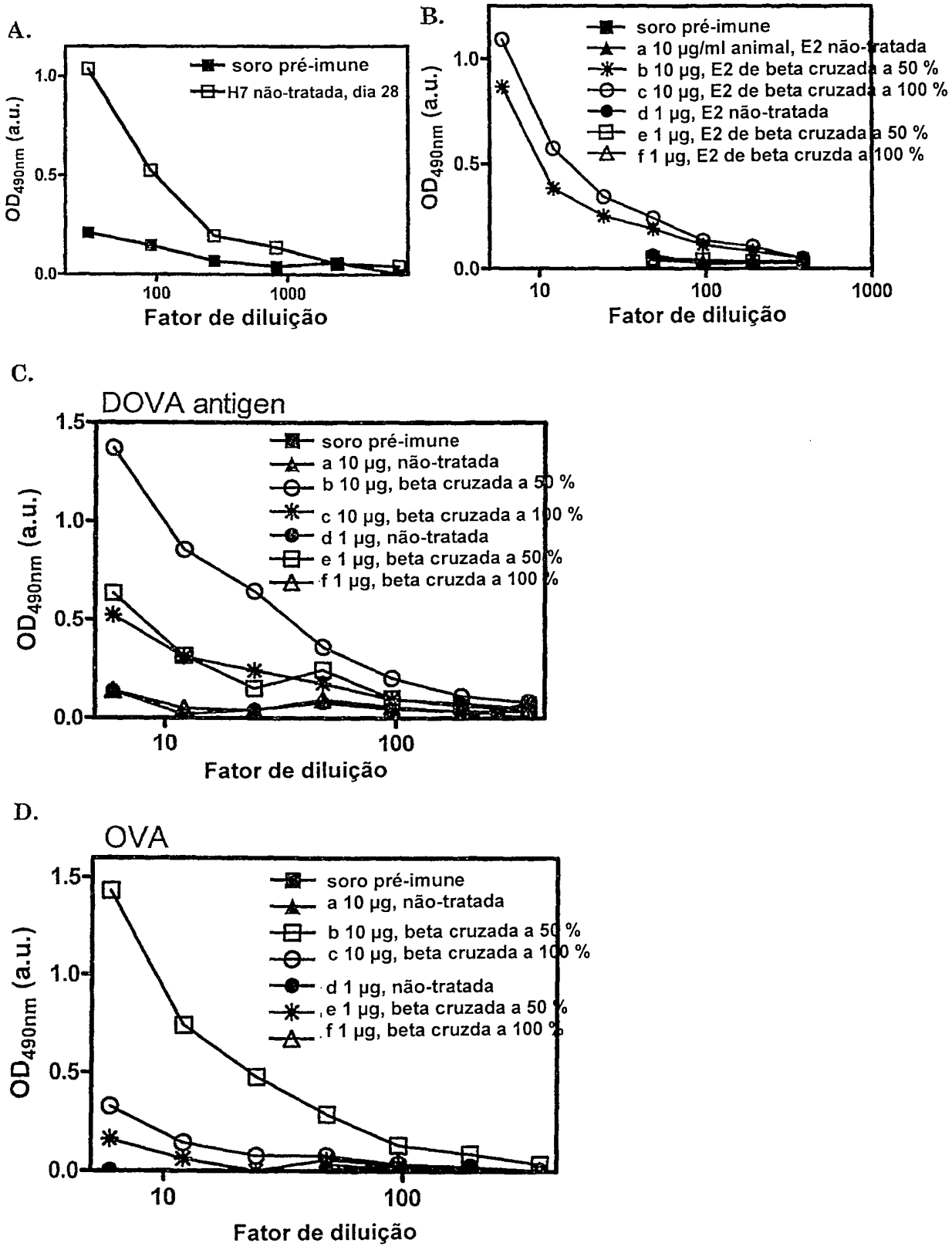
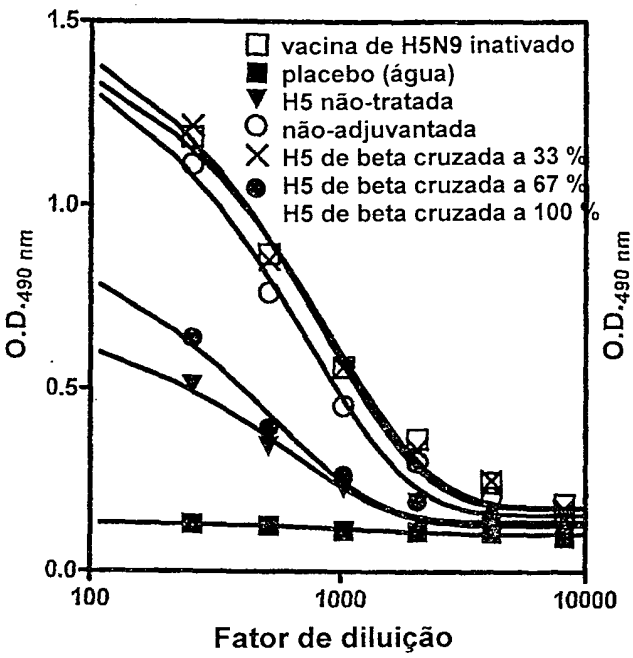
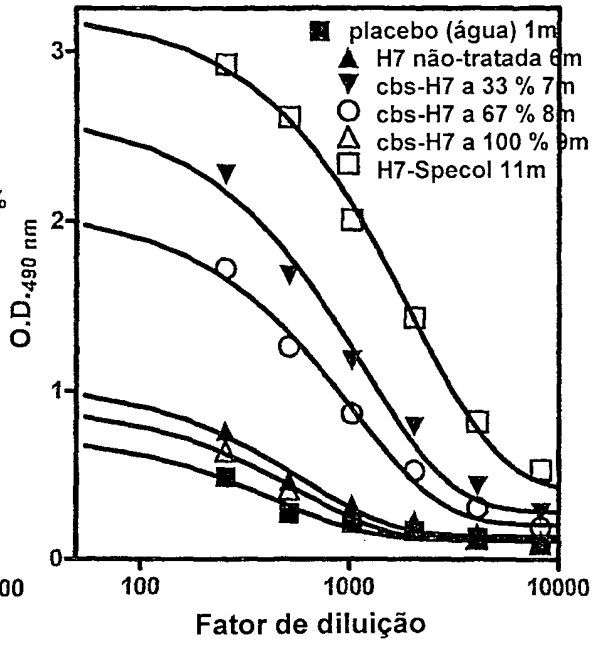

A.
soro pré-imune
H7 não-tratada, dia 28
OD490nm (a.u.)
1.0
0.5
0.0
100
1000
Fator de diluição
B.
soro pré-imune
a 10 µg/ml animal, E2 não-tratada
b 10 µg, E2 de beta cruzada a 50 %
c 10 µg, E2 de beta cruzada a 100 %
d 1 µg, E2 não-tratada
e 1 µg, E2 de beta cruzada a 50 %
f 1 µg, E2 de beta cruzda a 100 %
OD490nm (a.u.)
1.0
0.5
0.0
10
100
1000
Fator de diluição
C.
DOVA antigen
soro pré-imune
a 10 µg, não-tratada
b 10 µg, beta cruzada a 50 %
c 10 µg, beta cruzada a 100 %
d 1 µg, não-tratada
e 1 µg, beta cruzada a 50 %
f 1 µg, beta cruzda a 100 %
OD490nm (a.u.)
1.5
1.0
0.5
0.0
10
100
Fator de diluição
D.
OVA
soro pré-imune
a 10 µg, não-tratada
b 10 µg, beta cruzada a 50 %
c 10 µg, beta cruzada a 100 %
d 1 µg, não-tratada
e 1 µg, beta cruzada a 50 %
f 1 µg, beta cruzda a 100 %
OD490nm (a.u.)
1.5
1.0
0.5
0.0
10
100
Fator de diluição

FIGURA 13

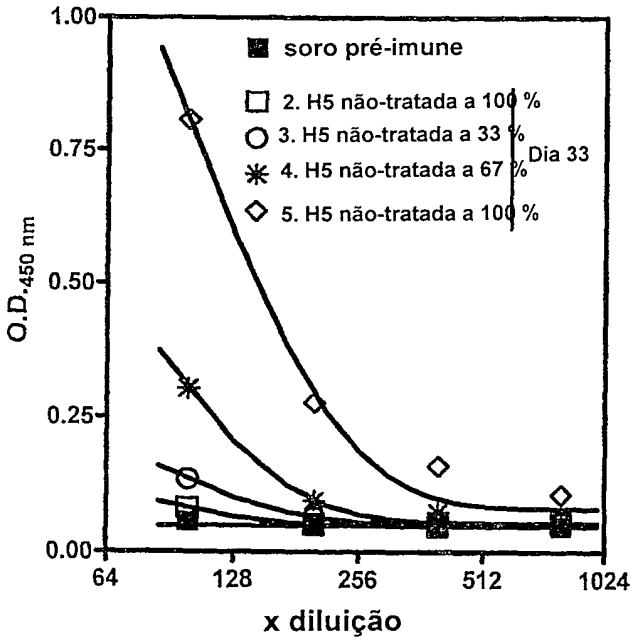
A. Titulações anti-H5 em camundongos



B.



C.



D.

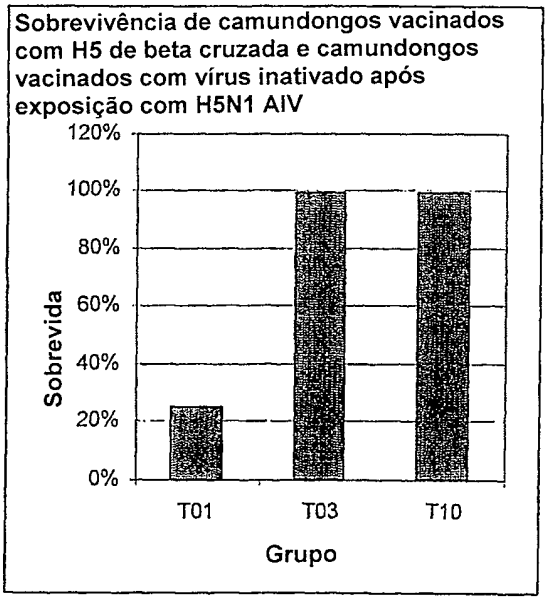
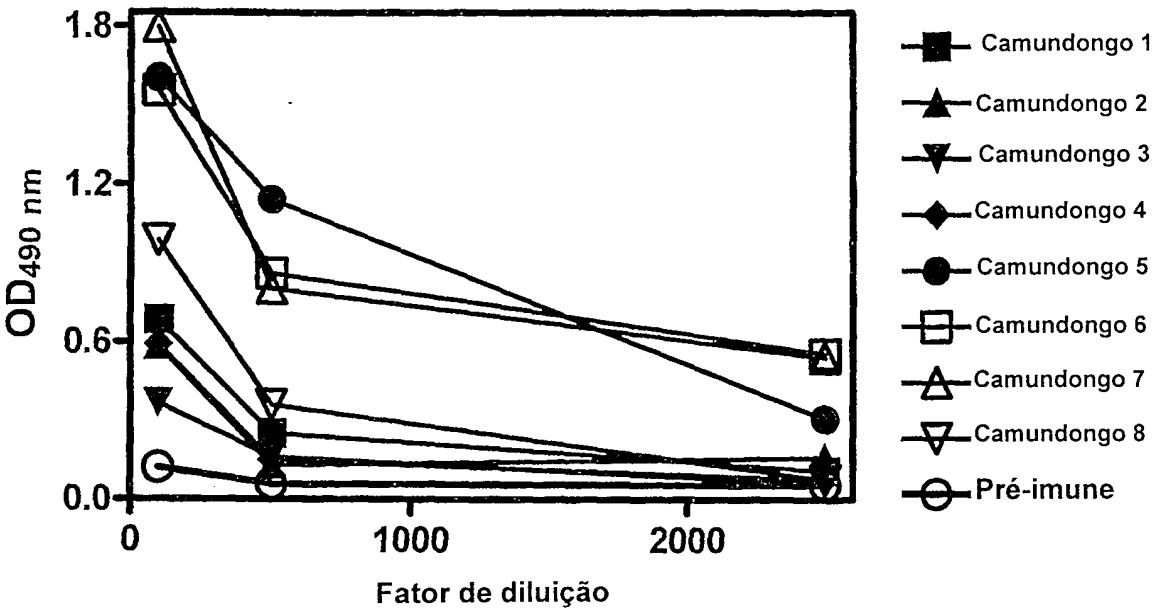


FIGURA 13 CONT.

E.



F.

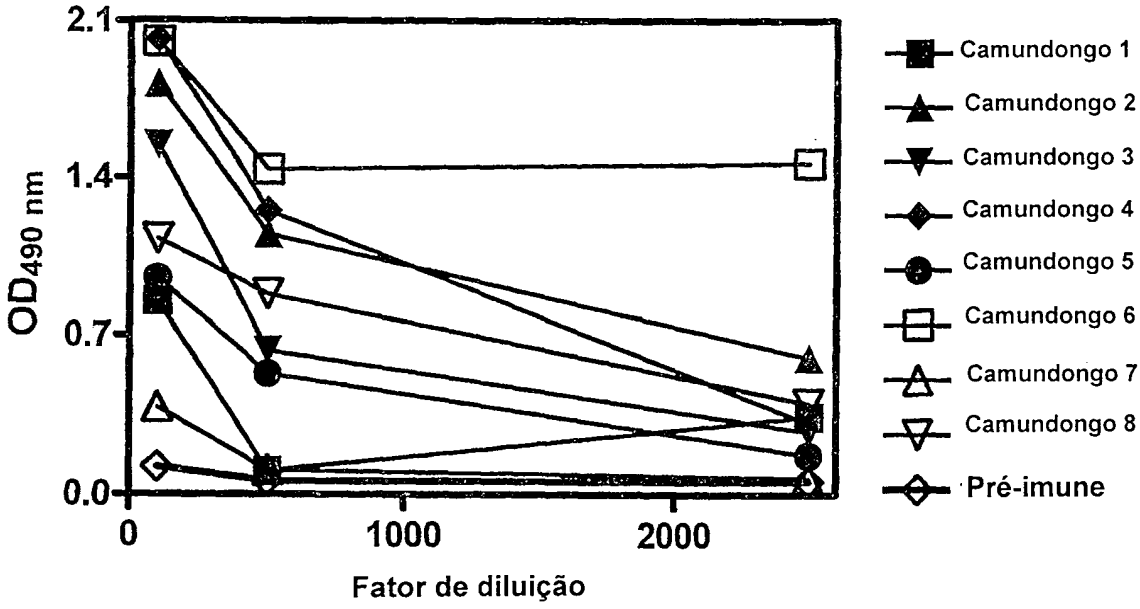
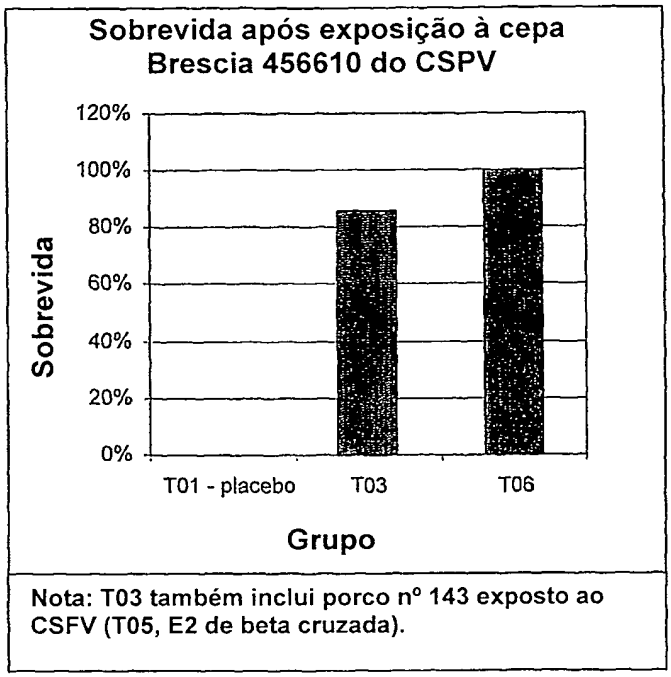
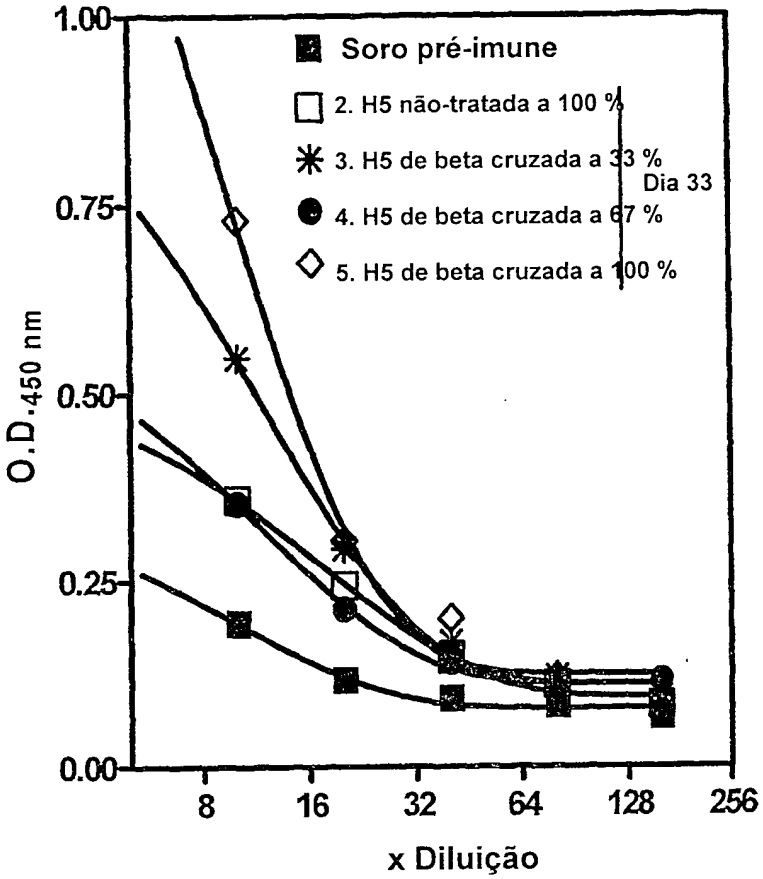


FIGURA 14



Nota: T03 também inclui porco nº 143 exposto ao CSFV (T05, E2 de beta cruzada).

FIGURA 15


1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
O.D.450 nm
8
16
32
64
128
256
x Diluição
Soro pré-imune
2. H5 não-tratada a 100 %
3. H5 de beta cruzada a 33 %
4. H5 de beta cruzada a 67 %
5. H5 de beta cruzada a 100 %
Dia 33

PI0613525-0

RESUMO

"MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PARA MELHORAR A IMUNOGENICIDADE DE UMA COMPOSIÇÃO, PARA INTENSIFICAR A IMUNOGENICIDADE DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA, E PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE ESTRUTURAS BETA-CRUZADAS EM UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA, USOS DE ESTRUTURAS BETA-CRUZADAS, E DE UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, VACINA DE SUBUNIDADE, E, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA"

A invenção refere-se a novos métodos e meios para prover substâncias proteináceas, como peptídeos, polipeptídeos, glicoproteínas, lipoproteínas e compostos complexos compreendendo o primeiro em combinação com outras substâncias, como ácidos nucleicos, estruturas de membrana, estruturas de carboidratos, com estruturas β-cruzadas, que melhoram a imunogenicidade de referida substância proteinácea. Os peptídeos, proteínas, glicoproteínas, etc., resultantes são preferivelmente usados em vacinas. A invenção provê um método para produzir uma composição imunogênica compreendendo pelo menos um peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína, e/ou lipoproteína, compreendendo prover referida composição com pelo menos uma estrutura β-cruzada. A invenção também descreve o uso de estruturas β-cruzadas na preparação de uma vacina para a profilaxia de uma doença infecciosa. A invenção ainda provê um método para melhorar a imunogenicidade de uma composição compreendendo pelo menos um peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína, compreendendo contatar pelo menos um dentre referido peptídeo, polipeptídeo, proteína, glicoproteína e/ou lipoproteína com um agente indutor β-cruzado, assim provendo referida composição com estruturas β-cruzadas adicionais.