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

(21) **PI0611782-1 A2**

BRPI0611782A2

(22) Data de Depósito: 13/06/2006
(43) Data da Publicação: 28/09/2010
(RPI 2073)

(51) Int.Cl.:
A61K 38/39
C07K 14/78
C07K 19/00
C07K 14/18
A61P 37/04

(54) Título: **USO DE UM POLIPEPTÍDIO, VETOR PROTEÍNICO, USO DO MESMO, ÁCIDO NUCLÉICO MODIFICADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA DE EXPRESSÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UM VETOR PROTEÍNICO, USO DE UM ÁCIDO NUCLÉICO MODIFICADO E DE UM POLIPEPTÍDIO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**

(30) Prioridade Unionista: 13/06/2005 ES P200501412

(73) Titular(es): PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L

(72) Inventor(es): CLAUDE LECLERC, JESÚS PRIETO VALTUEÑA, JUAN JOSÉ LASARTE SAGASTIBELZA, MARTA GORRAIZ AYALA

(74) Procurador(es): Vieira de Mello, Werneck Alves - Advogados S/C

(86) Pedido Internacional: PCT ES2006000343 de 13/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/134190de 21/12/2006

(57) Resumo: USO DE UM POLIPEPTÍDIO, VETOR PROTEÍNICO, USO DO MESMO, ÁCIDO NUCLÉICO MODIFICADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA DE EXPRESSÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UM VETOR PROTEÍNICO, USO DE UM ÁCIDO NUCLÉICO MODIFICADO E DE UM POLIPEPTÍDIO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. Refere-se a presente invenção ao uso de um polipeptídio na produção de um agente imunoestimulador, o dito polipeptídio compreendendo uma seqüência correspondente ao domínio de fibronectina de EDA, um fragmento do domínio de EDA que pode ligar-se a TLR4 ou uma variante do dito domínio de EDA ou um fragmento que pode ligar-se ao TLR4 e que tem uma homologia de mais de 70% com qualquer forma ou fragmento natural do domínio de EDA. A invenção também se refere aos métodos de produção e aplicações do dito agente.

USO DE UM POLIPEPTÍDIO, VETOR PROTEÍNICO, USO DO MESMO, ÁCIDO NUCLÉICO MODIFICADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA DE EXPRESSÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UM VETOR PROTEÍNICO, USO DE UM ÁCIDO NUCLÉICO MODIFICADO E DE UM POLIPEPTÍDIO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

Campo Técnico da Invenção

Refere-se a presente invenção a um vetor proteínico para transporte molecular para células que expressam o receptor TLR4 (receptor 4 semelhante a Toll), à preparação do dito vetor proteínico e suas aplicações, com uma incidência particular na preparação e uso de composições farmacêuticas, com particularidade composições imuno-terapêuticas, para o tratamento e prevenção de enfermidades infecciosas e tumorais.

Descrição da Técnica Anterior

Agentes patogênicos e câncer permanecem como as causas principais de óbitos no mundo inteiro. O desenvolvimento de vacinas para impedir enfermidades para as quais não existem atualmente vacinas, tais como AIDS ou malária, ou para tratar infecções crônicas ou cânceres, bem como o melhoramento da eficácia e segurança das vacinas existentes, permanece uma alta prioridade. Na maior parte dos casos, o desenvolvimento dessas vacinas requer estratégias capazes de estimularem especificamente os lifócitos T citotóxicos CD8+ (CTLs).

Os CTL são estimulados pela apresentação

aos receptores de células T (TCRs) de peptídios curtos associados com moléculas I da classe MHC. Estes complexos I de classe peptídio-MHC estão presentes na superfície de células de apresentação de antígenos (APCs), que também são capazes de proporcionar sinais co-estimuladores requeridos para ativação dos CTL.

As células dendríticas (DC) são as APC mais potentes, que são dotadas de uma capacidade única para interagir com os linfócitos T naturais e que iniciam respostas de imunização primárias, estimulando os linfócitos T auxiliar CD4+ e citotóxico CD8+. A apresentação de antígenos e estímulo de células T por DC é examinada detidamente por Guermonprez *et al.* ("Antígeno presentation e T cell stimulation by DC". *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20:621-627), que fica incluído neste contexto por referência.

Na ausência de respostas inflamatórias e de imunização em execução, as células dendríticas vigiam o sangue, tecidos periféricos, linfa e órgãos linfóides secundários. Nos tecidos periféricos, as células dendríticas consomem antígenos próprios e não-próprios. Os antígenos interiorizados são então processados em peptídeos proteolíticos, e estes peptídeos são carregados em moléculas da classe I e II (para ativação de linfócito T CD8+ ou CD4+ T, respectivamente). Este processo de consumo, degradação e carga de antígenos é chamado de apresentação de antígeno. Entretanto, na ausência de estímulo, as células dendríticas perifé-

ricas apresentam antígenos de forma inteiramente ineficiente. Sinal(s) exógeno(s) proveniente(s) de agentes patogênicos ou sinal(s) endógeno(s) induz(em) células dendríticas a inserir um programa de desenvolvimento, chamado maturação, que transforma as células dendríticas em ativadores de linfócitos T e APCs. Produtos bacterianos e virais, bem como citoquinas inflamatórias e outras auto-moléculas, induzem a maturação de células dendríticas através de interação direta com receptores de superfície de células dendríticas inatas. Linfócitos T, através de vias independentes e dependentes de CD40, e células endoteliais contribuem para a maturação final das células dendríticas através de contacto direto de célula com célula e a secreção de citoquinas. Logo depois de encontrar um sinal de perigo, a eficiência do consumo, transporte intracelular e degradação de antígeno, e o tráfego intracelular de moléculas MHC são modificados. A carga de peptídeos bem como o semi-período e distribuição para a superfície de célula das moléculas MHC é aumentada. A expressão de superfície das moléculas co-estimulantes de célula T também sobe. Desta forma, as células dendríticas tornam-se os APC mais potentes, e os únicos capazes de ativarem lifócitos T simples e de iniciarem respostas de imunização adaptativa. Concomitante com as modificações de suas habilidades de preservação de antígeno, a maturação também induz migração maciça das células dendríticas para fora dos tecidos periféricos. Modificações na ex-

pressão de receptores de quimioquina e moléculas de aderência, bem como mudanças profundas da organização de citosqueleto, contribuem para a migração de células dendríticas, através da linfa, no sentido de órgãos linfóides secundários.

Indução de maturação de célula dendrítica.

As células dendríticas reagem a dois tipos de sinais: reconhecimento direto de agentes patogênicos (através de receptores de reconhecimento padrão específicos) e detecção indireta de infecção (através de citoquinas inflamatórias, compostos celulares internos, e respostas de imunização específicas em execução). Em resposta a estes sinais, células dendríticas são ativadas e entram no programa de maturação, que transforma células dendríticas em estimuladores de células T eficientes. Pelo menos cinco tipos de receptores de superfície foram reportados como disparando a maturação de células dendríticas: (i) receptores semelhantes a Toll (TLR), (ii) receptores de citoquinas, (iii) moléculas da família de receptor de TNF (TNF-R), (iv) FcR, e (v) sensores para morte das células. Alguns dos estímulos de maturação mais eficientes são mediados por interação de TLR (TLR1-9) com os seus respectivos ligantes. Kaisho e Akira estudaram o conhecimento àcerca dos receptors semelhantes a Toll ("Toll-like receptors as adjuvant receptors". *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1589: 1-13). Os TLR são expressos em macrófagos

e células dendríticas bem como em outras células, tais como linfócitos B. Ligantes para vários dos TLR também foram identificados. A maior parte destes ligantes são derivados de agentes patogênicos, mas não encontrados no hospedeiro, sugerindo que os TLR são da maior importância para detecção de microorganismos invasores. O reconhecimento de ligantes por TLR provoca rápida ativação da imunidade inata por indução de produção de citoquinas pró-inflamatórias e melhoramento das moléculas co-estimuladoras. A imunidade inata ativada subseqüentemente conduz a imunidade adaptadora efetiva. Com relação a TLR4, padrões moleculares especificamente reconhecidos são LPS (Gram-bacterias), ácidos lipoteicóicos (Gram+bacterias), taxol, proteína F (Respiratory Syncytial Vírus), proteína de choque térmico 60, e domínio de Fibronectina EDA.

Conseqüentemente, uma vacina candidata capaz de induzir respostas de células T ótimas deve preencher várias condições. Primeira, tem de visar APC para distribuir os epítopes de células T derivadas de antígeno para moléculas de MHC da classe I e/ou II. Desta forma, visar-se DC poderá representar o objetivo principal na concepção de novos sistemas de distribuição para desenvolvimento de vacinas. Além disso, o vetor tem de distribuir sinais apropriados para DC para induzir a sua ativação. A distribuição de antígeno para DC sem um sinal de maturação poderá induzir a tolerância em vez de ativação do auxiliar T e células citó-

xicas. Além disso, a sua eficiência não deverá ser afetada por imunidade pré-existente contra o próprio vetor.

Uma primeira abordagem para distribuir peptídeos antigênicos a moléculas de MHC da classe I e/ou II é baseada em vacinas de peptídeos sintéticos, que contém epítopes selecionados capazes de aglutinação diretamente a estas moléculas na superfície de APC. Em alguns casos estes peptídeos conduziram à proteção contra tumores ou liberação de vírus em modelos de murídeos, enquanto que em outros eles conduziram à indução de tolerância. Experiências em seres humanos conduzidos com diferentes tipos de peptídeos deram origem a modestas respostas clínicas ao câncer.

Um grande número de diferentes estratégias encontra-se atualmente em desenvolvimento. Basicamente, elas são divididas em duas categorias. O primeiro tipo é baseado na síntese de antígeno pelo APC ou sua distribuição ativa no citoplasma destas células e explora o caminho de processamento de antígeno MHC I "clássico". O segundo tipo tira vantagem da capacidade de apresentação cruzada de APC e é baseado em antígenos exógenos livres ou associados a células. A distribuição de antígeno no citoplasma de APC tem sido realizada por meio de toxinas bacterianas (Morón *et al.* "New tools for antígeno delivery to the MHC class I pathway". *TRENDS in Immunology*, 2004; 25: 92-97). Como um exemplo, a EP1188446A1 refere-se a um vetor proteínico

baseado em toxina de ciclase de adenilato pertussis *Bordetella*, para distribuição de moléculas para células expressoras de CD11b.

A presente invenção refere-se ao Domínio Extra A de fibronectina (EDA), um possível ligante natural para TLR4, como um meio teórico para distribuição de antígeno para células expressoras de TLR4 que poderiam induzir seleção e maturação apropriadas de APC, e finalmente conduzir a uma resposta de CTL específica efetiva. As moléculas de fibronectina são os produtos de um único gene, e a proteína resultante pode existir em múltiplas formas que decorrem da junção alternativa de um único pré-mRNA (Pankov R e Kenneth MY, "Fibronectina at a glance". *Journal de Cell Science*, 2002; 115:3861-3863). Um tipo de junção principal ocorre dentro do conjunto central de repetições do tipo III. A utilização ou salto de Exon conduz à inclusão ou exclusão de cada uma de duas repetições do tipo III: domínio extra B (também chamado de EDB, EIIIB ou EDII), e domínio extra A (também chamado de EDA, EIIIA ou EDI). As fibronectinas celulares, que contém alternativamente EDA e EDB unidos, são produzidas em resposta à lesão de tecido. Entre outras funções, EDA tem mostrado induzir liberação de proteoglican, e expressão de metaloproteinases (MMP 1, 3, e 9) e de citoquinas pró-inflamatórias (para recapitulação vide Saito S et al. "The Fibronectina Extradomain A activates matrix metalloproteinase gene expression by an interleukin-1-dependent mecha-

nism", *J. Biol. Chem.* 1999; 161:3071-3076). Foi igualmente descrito que o EDA é capaz de ativar TLR4, induzindo desta forma respostas semelhantes a LPS (Okamura Y et al., "The domínio extra A de fibronectina activates Toll-like receptor 4", *J. Biol. Chem.* 2001; 276:10229-10233).

Tal como indicado anteriormente, o desenvolvimento de estratégias para o fortalecimento da resposta de imunização para um antígeno, abre a porta ao desenvolvimento de vacinas para o tratamento de câncer ou doenças infecciosas. Especificamente, na infecção por vírus C da hepatite, descreveu-se que a resposta de imunização desempenha um papel essencial na desobstrução da infecção, portanto o uso de estratégias de reforço de imunização constitui uma alternativa para o tratamento e prevenção desta infecção.

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus RNA de cordão único que pretence à família *Flaviviridae* (Miller RH. e Purcell RH. 1990. PNAS. 87:2057). Este vírus foi reconhecido como um dos agentes causais principais da hepatite crônica e enfermidades do fígado e é estimado que ele afeta 170 milhões de pessoas no mundo todo (World-Health-Organisation. Hepatitis C. Wkly Epidemiol Rec 1997; 72:65). Uma das características principais da infecção pelo HCV é sua alta tendência no sentido da condição crônica (70% de infecções) e do desenvolvimento de cirrose do fígado (20%) com um alto risco de desenvolvimento de hepatocarcinomas (Dienstag

et al. Gastroenterology 1983; 85:439). O tratamento com IFN-α é a terapia mais comum nas infecções de HCV, sendo que é efetivo somente em 20-30% dos pacientes tratados (Camps et al. J Hepatol 1993; 17:390). A combinação de IFN-α e de ribavirin melhorou estes resultados (30-40% dos pacientes desembaraçaram-se do vírus de uma maneira sustentada), mas ainda permanence uma alta percentagem de pacientes que são resistentes à terapia (Poynard et al. Lancet 1998; 352:1426). Desta maneira, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de hepatite C crônica é de vital importância.

O genoma de HCV é de 9,6 quilobases, ele contém regiões de não-codificação altamente conservadas nas extremidades 5' e 3' flanqueando um quadro de leitura ampla que codifica 3 proteínas estruturais (núcleo, E1 e E2) e pelo menos 6 proteínas não-estruturais (NS2, NS3, NS4a, NS5a e NS5b) (Major, ME e Feinstone SM. (1997) Hepatology 25, 1527).

A liberação viral depois de uma infecção aguda por HCV ou depois de tratamento com IFN-α está associada à presença de uma forte resposta de imunização de CD4 e CD8 celular às proteínas virais. Com particularidade, a resposta de CD4 à proteína NS3 não-estrutural de HCV tem estado associada à liberação viral depois de infecção aguda, enquanto a ausência desta resposta de célula T envolve persistência viral e o estabelecimento de uma infecção crônica (Diepolder et al.

Lancet 1995; 346:1006, Pape et al J Viral Hepat 1999; 6 Suppl 1:26-40). Também, vários estudos identificaram vários epítopes citotóxicos dentro da proteína NS3 em pacientes infectados por HCV. Estes dados sugerem que a proteína NS3 poderá ser um bom objetivo para a indução de resposta celular anti-HCV.

Descrição Detalhada da Invenção

De acordo com um aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de um polipeptídio que compreende a seqüência de aminoácidos correspondente a:

- domínio da fibronectina EDA (EDA), ou
- um fragmento do dito domínio de EDA que é capaz de vincular TLR4, ou
- uma variante do dito domínio ou fragmento de EDA que é capaz de vincular TLR4 e tem mais do que 70% de homologia com quaisquer formas ou fragmentos naturais de domínio de EDA,

na manufatura de uma resposta de célula de imunização ao agente estimulador de antígeno.

Na presente invenção, este agente inclui o domínio de EDA de fibronectina, e o antígeno para o qual se deseja gerar a resposta de imunização, sendo que estes componentes estão presentes como entidades separadas ou vinculadas de forma covalente.

Em uma concretização concreta da invenção, a dita variante do domínio ou fragmento de EDA capaz de vincular TLR4 citado no elemento c), é caracterizada

pelo fato de que a sua seqüência de aminoácidos resulta da substituição, da adição ou da supressão de um ou mais aminoácidos em um polipeptídio definido nos elementos a) e b).

De acordo com uma concretização preferível da invenção, o referido fragmento capaz de vincular o elemento c), é caracterizado pelo fato de que ele tem mais de 85% em grau de homologia com qualquer forma natural de domínio de EDA ou de seu fragmento correspondente, e em uma concretização de maior preferência, tem mais de 95% em grau de homologia com a dita forma natural de domínio de EDA de fibronectina ou seu fragmento correspondente.

De acordo com a invenção, em uma concretização particular a seqüência de aminoácidos de domínio de EDA de fibronectina é aquele de qualquer forma de domínio de EDA natural que é capaz de vincular TLR4. Este domínio de EDA pode ser selecionado entre as formas naturais do domínio em qualquer espécie de animal, particularmente mamíferos, ou seja, roedores (camundongos, ratos e outros), ou primatas (com particularidade seres humanos).

Em outra concretização específica, os agentes imuno-estimuladores compreendem uma seqüência de aminoácidos parcial de um domínio de EDA que é caracterizado pelo fato de que ele é capaz de vinculação a TLR4.

Ainda em uma outra concretização particu-

lar da invenção, o domínio de EDA é uma variante modificada de qualquer uma das ditas formas naturais ou fragmentos de domínio de EDA, e é também caracterizado pelo fato de que ele retém a propriedade de vinculação a TLR4. Em uma concretização particular, esse domínio de EDA variante tem mais de 70% de homologia com qualquer uma das formas naturais de domínio de EDA. Uma variante modificada apropriada pode ser selecionada comparando-se primeiro a seqüência de uma forma natural de domínio de EDA de fibronectina, ou fragmento da mesma, com outras seqüências polipeptídicas candidatas. Qualquer algoritmo de alinhamento (por exemplo, FASTA, Lipman DJ, Pearson WR. Rapid e sensitive protein similarity searches, Science. 1985 Mar 22;227(4693):1435-41), ou software de computador (isto é, Jellifish proveniente da Labvelocity Inc., ou software Blast a partir da NCBI) pode ser usado para análise de homologia. Subsequentemente, as seqüências polipeptídicas cândidatas dotadas de mais de 70% de homologia são testadas quanto à sua capacidade de vinculação a TLR4. As propriedades de vinculação a TLR4 podem ser avaliadas por meio de qualquer ensaio de vinculação convencional, por exemplo, mediante utilização de citometria de fluxo tal como descrita em "The Current Protocols in Immunology and in The current protocols in Protein Science" publicado por John Wiley & Sons (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober) (atualizado periodicamente. Atualizado

até 1 de maio de 2005).

De acordo com uma concretização da invenção o domínio de EDA compreende uma seqüência selecionada a partir de:

a) a seqüência de aminoácidos completa de domínio de EDA de camundongo (Entrez Protein: NM_010233, aminoácidos 1721 a 1810; SEQ. ID. NO: 2, aminoácidos 2-91);

b) a seqüência de aminoácidos completa de domínio de EDA humano (Entrez Protein NM_002026, aminoácidos 1631 a 1716; SEQ. ID. NO: 4); e

c) um fragmento de seqüências a) e b) capaz de vinculação a células expressoras de TLR4.

Em outra concretização particular, o dito domínio de EDA compreende uma seqüência selecionada a partir de:

a) aminoácidos 2-57 de SEQ. ID. NO: 6, que correspondem a uma forma unida alternativamente de domínio de EDA de fibronectina de camundongo;

b) SEQ. ID. NO: 8, que é uma forma unida alternativamente de domínio de EDA humano; e

c) um fragmento das seqüências a) e b) capabaz de vinculação às células expressoras de TLR4.

De acordo com algumas concretizações, o agente imunoestimulador poderá incluir ainda uma ou mais moléculas de interesse. Quando se encontra presente no agente imunoestimulador, a molécula de interesse pode ser administrada em uma quantidade tal que,

em combinação com os outros componentes do agente, é efetiva no sentido de gerar uma resposta de imunização contra a molécula.

Em uma concretização preferida, o domínio de EDA (ou fragmento ou variante do mesmo) e a molécula de interesse são vinculados entre si na mesma molécula híbrida ou vetor proteináceo.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um vetor proteináceo tal como descrito anteruiormente, em que a dita molécula de interesse é selecionada a partir do grupo que consiste de polipeptídios, lipopeptidios, oligossacarides, polissacarides, ácidos nucléicos, lípides e agentes químicos.

Em uma concretização particular do vetor proteináceo, a dita molécula de interesse é um antígeno ou um epítope. Em uma concretização da invenção, o antígeno acoplado ao vetor é um antígeno viral, um antígeno bacteriano, um antígeno fungico, ou um antígeno parasítico. Em uma concretização concreta, o dito antígeno viral é um antígeno viral proveniente do vírus de hepatite C, e em uma concretização preferida o dito antígeno de vírus de hepatite C é a proteína NS3 ou um fragmento antigênico da mesma. A proteína NS3 refere-se à proteína NS3 não-estruturak do vírus de hepatite C, uma proteína 67kDa que inclui dois domínios, uma serina-protease que compreende os 189 aminoácidos provenientes da extremidade N-terminal, e uma triofosfatase helicase-nucleoside que compreende os 442 aminoácidos a

partir da extremidade C-terminal. A seqüência de proteínas NS3 incluídas no vetor proteináceo da invenção pode corresponder a qualquer variedade ou isolado do vírus de hepatite C humano.

Em uma outra concretização o dito antígeno é um antígeno tumoral ou uma determinante antigênica tumoral. Da maneira que é utilizado neste contexto, "epítope" refere-se a uma seqüência de peptídeos que se vincula às moléculas da classe I ou class II de MHC e pode ser reconhecida pela molécula receptora de célula T das células T CD8+ ou CD4+ respectivamente, e induzir uma resposta de imunização.

Em uma concretização específica a dita molécula de interesse é a determinante T citotóxica antigênica proveniente de ovalbumina (OVA 257-264) ou SIINFEKL (SEQ. ID. NO: 2, aminoácidos 95-102, que foi flanqueada com 3 aminoácidos adicionais no término-C- e no término-N da eítope, QLE-SIINFEKL-TEW).

O antígeno pode ser qualquer material capaz de produzir uma resposta immune de Th, uma resposta de linfócito T $CD8^+$, uma resposta de célula NK, uma resposta de linfócito T γ/δ, ou uma resposta de anticorpo. Sem com isso se ficar limitado aos mesmos, os antígenos apropriados incluem peptídeos, polipeptídios, lipidios, glicolipídios, polissacárides, carboidratos, polinucleotídeos, prions, bactérias, vírus ou fungos vivos ou inativados; e antígenos derivados de bacterias, vírus, fungos, protozoários, tumores ou microorga-

nismos, toxinas ou toxóides.

Em uma outra concretização particular do vetor proteínico a dita molécula de interesse é um alérgeno.

Desta maneira, o domínio de EDA atua também como um vetor para a distribuição de antígeno às células expressoras de TLR4.

Em uma outra concretização particularmente interessante da invenção, a dita molécula de interesse é um produto químico ou uma droga acoplada quimicamente ou geneticamente ao vetor proteínico. Desta forma o dito vetor proteínico é de utilidade para visar drogas específicas para células expressoras de TLR4.

Em uma concretização particular o vetor proteínico é também caracterizado pelo fato de ele também compreende uma seqüência Tag, por exemplo, uma ponta de histidina N-terminal. Isto simplificará o processo de purificação quando o vetor proteínico é manufaturado por meio de métodos de engenharia genética. Como um exempleo, as seqüências SEQ. ID. NO: 2 e SEQ. ID. NO: 6 representam concretizações específicas do vetor proteínico da invenção. Em uma concretização não limitativa concreta da presente invenção, o vetor proteínico compreende a seqüência SEQ ID NO: 10, que compreende um fragmento de proteína NS3.

O domínio de EDA incorporado no vetor proteínico é caracterizado pelo fato de que ele vincula-se a TLR4 e, além disso, facilita a translocação da molé-

cula de interesse para o citossol de células expressoras de TLR4.

A invenção também se refere ao uso do vetor proteínico para mirar e transestabelecer uma molécula de interesse para células expressoras de TLR4. Em uma concretização particular, as células expressoras de TLR4 são quaisquer espécies de células apresentadoras de antígeno (APC). Em uma concretização preferida essas APC são células dendríticas.

Em uma concretização particular da invenção, o vetor proteínico é caracterizado pelo fato de que ele facilita a translocação do antígeno ou epítope de interesse, favorecendo ainda o processamento e carga de moléculas de MHC para a apresentação de antígeno aos linfócitos T.

Em uma outra concretização, o vetor proteínico é caracterizado pelo fato de ser capaz de estimular a maturação do APC visado, aumentando desta forma a expressão de moléculas de MHC e de sinais co-estimuladores. Em uma concretização vantajosa particular, o vetor proteínico é caracterizado pelo fato de que é capaz de induzir simultaneamente apresentação de antígeno e de promover maturação de APC, induzindo dêsta forma uma resposta de imunização específica de antigeno efetiva. De acordo com uma concretização de maior preferência esta resposta de imunização específica de antígeno é uma resposta de CTL.

O vetor proteínico da invenção pode ser

obtido por tecnologia de DNA recombinante. Desta maneira, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um ácido nucléico modificado que codifica um vetor proteínico da invenção. Este ácido nucléico pode ser facilmente deduzido da seqüência de aminoácidos do vetor proteínico.

Este ácido nucléico modificado pode estar contido dentro de uma construção de DNA. Desta forma, a invenção proporciona uma construção de DNA que compreende um ácido nucléico que codifica o vetor proteínico da invenção. Esta construção de DNA pode incorporar uma seqüência de controle vinculada operacionalmente ao ácido nucléico que codifica o vetor proteínico da invenção. "Vinculado operacionalmente" quando referente aos ácidos nucléicos significa que os ácidos nucléicos são colocados em uma relação funcional com outra seqüência de ácido nucléico. As "seqüências de controle" são sinais de expressão reconhecidos por uma célula receptora específica, que regula funções tais como transcrição e translação de seqüências de codificação particulares (exemplos de seqüências de controle são promotores, intensificadores, terminadores de transcrição, locais de ligação de *ribosome*, peptídeos de sinal para secreção de proteínas ou para outras localizações sub-celulares). A aglutinação das seqüências desejadas é realizada por ligação em locais de restrição convenientes. Se esses locais não existirem, utilizam-se adaptadores ou vinculadores de oligonucleotídeos sinté-

ticos de acordo com métodos convencionais. Uma vantagem neste sentido é representada pelo fato de que esta construção de DNA também compreende um marcador ou gene que codifica um motivo ou fenótipo que permite a seleção da célula receptora por meio da construção de DNA. O ácido nucléico modificado e construção de DNA proporcionados por esta invenção podem ser obtidos por meio de métodos convencionais amplamente conhecidos os quais são sumariados em muitos manuais de laboratórios (por exemplo, "Molecular Cloning: a Laboratory manual". Joseph Sambrook, David W. Russel Eds. 2001, 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York).

Em uma concretização particular o ácido nucléico ou construção de DNA modificados proporcionados pela invenção compreendem a SEQ. ID. NO: 1, SEQ ID. NO: 5, SEQ ID NO: 9 (EDA-NS3) ou SEQ ID NO: 11 (EDA-OVA).

O ácido nucléico modificado ou construção de DNA proporcionado por esta invenção pode ser inserido em um vetor apropriado. Desta forma, em um outro aspecto, a invenção refere-se a um vetor, tal como um vetor de expressão, que compreende o mencionado ácido nucléico ou construção de DNA modificado. A escolha do vetor dependerá da célula hospedeira na qual ele se destina a ser inserido. Como um exemplo, o vetor dentro do qual o ácido nucléico é inserido pode ser um plasmídio ou vírus que, quando da inserção na célula, poderá ou não integrar o genoma da célula. O vetor po-

de ser obtido por meio de métodos convencionais (Sambrook *et al.*, 2001, citado *supra*).

De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a uma célula receptora, tal como célula receptora transformada, que compreende um ácido nucléico ou construção de DNA modificado proporcionado por esta invenção. De acordo com a invenção, a expressão de célula receptora é uma hospedeira procariótica, isto é, *Escherichia coli*, ou uma hospedeira eucariótica, isto é, fermento (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia Pastoris*), células de insetos, ou células de mamíferos.

Em uma outra particular concretização da invenção, o vetor de expressão que compreende o ácido nucléico ou construção de DNA modificado que codifica o vetor proteínico da invenção, destina-se à transferência de gene *in vivo* ou terapia. Em uma concretização mais particular, o dito vetor de expressão é um vetor viral. Vetores virais apropriados para este efeito incluem: adenovírus, adenoassociados, retrovírus, lentivírus, alfavírus, herpesvírus, coronavírus derivados de vetores, e assemelhados.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método para produzir um vetor proteínico da invenção, que compreende cultivar uma célula receptora que contém u ácido nucléico ou construção de DNA modificado da invenção, sob condições que permitem a expressão do vetor proteínico. As condições para otimizarem a

cultura da célula receptora dependerão do tipo de célula receptora empregado. Se desejado, o procedimento para produzir o vetor proteínico da invenção inclui isolamento e purificação do mesmo.

Alternativamente, o vetor proteínico da invenção poderá ser obtido por outros métodos convencionais. Esses métodos incluem, por exemplo, síntese química de fase sólida; purificação com cromatografia de líquido de alto desempenho (HPLC); e, se preferido, análise por técnicas convencionais, tais como técnicas de seqüenciação ou espectrometria de massa, análise de aminoácidos, ressonância magnética e outras.

Em uma outra concretização, o vetor proteínico da invenção pode ser obtido por ligação covalente do polipeptídio com a seqüência de aminoácidos correspondente ao domínio de fibronectina de EDA (EDA), ou um fragmento do dito domínio de EDA capaz de vinculação a TLR4, ou uma variante do dito domínio de EDA), com a molécula de interesse (por exemplo: polipeptídios, lipopeptidios, oligossacárides, polissacárides, ácidos nucléicos, lipídeos, ou outros produtos químicos). Isto pode ser executado pela utilização de métodos convencionais sumariados em manuais de laboratórios, por exemplo, "The current protocols in protein chemistry", published by John Wiley & Sons (periodically updated. Updated up to May 1, 2005), or "Immobilized affinity ligand Techniques", GT Hermanson, AK Mallia e PK Smith, Academic Press, Inc. San Diego, CA, 1992.

Subsequentemente, de acordo com a invenção, o vetor proteínico, ou ácido nucléico modificado e construção de DNAs que codificam os mesmos, ou os vetores de expressão e células receptoras de expressão que incorporam os ditos ácidos nucléicos ou construções de DNA, podem ser usados na preparação de uma composição farmacêutica.

Em uma outra concretização, a presente invenção refere-se ao uso do polipeptídio com a seqüência de aminoácidos correspondente ao domínio de EDA de fibronectina (EDA), ou um fragmento ou variante do mesmo, tal como descrito anteriormente, na preparação de um agente imunoestimulador, caracterizado pelo fato de que o dito agente é uma composição farmacêutica.

Em algumas concretizações, a composição farmacêutica da invenção pode ser usada para estimular a maturação das células de apresentação de antígeno, ou para induzir uma imuno-resposta efetiva específica para a molécula de interesse. Em uma concretização particular, a dita composição farmacêutica pode ser usada para induzir uma imuno-resposta Th1 em um paciente ao qual a composição imunoestimuladora é administrada. Da maneira que é utilizado neste contexto, "induzir uma imuno-resposta Th1" pode incluir situações em que a composição imuno-estimuladora induz uma resposta Th1/Th2 mista. Em outros casos, entretanto, a composição imuno-estimuladora pode induzir uma imuno-resposta Th1 com pouca ou substancialmente nenhuma indução da imuno-

resposta Th2. Em uma concretização particular, a dita composição farmacêutica pode ser usada para induzir uma resposta de CTL.

Em algumas concretizações, a composição imunoestimuladora pode ser usada como um adjuvante imunoestimulador, por exemplo, combinado com um ou mais antígenos, seja com ou sem adjuvantes adicionais. Desta forma, em alguns casos, a composição imunoestimuladora pode formar uma vacina. Em outros casos, a composição imunoestimuladora pode servir como um adjuvante que pode ser usado em conexão com uma vacina.

A composição imunoestimuladora que inclui o polipeptídio que compreende domínio de EDA de fibronectina (ou fragmento ou variante do mesmo) pode aumentar a expansão dos linfócitos T CD8+ ativados, a geração de linfócitos T CD8+ de memória, ou os dois. Desta maneira, a composição imunoestimuladora da invenção pode aumentar a imunidade antígeno-específica mediada por célula em um paciente que recebe a composição imunoestimuladora.

Em uma concretização particular, a composição imunoestimuladora que compreende o domínio de EDA de fibronectina (ou fragmento ou variante do mesmo) é de utilidade para o tratamento ou profilaxia de uma enfermidade infecciosa, uma enfermidade de tumor, ou uma enfermidade alérgica. Em uma concretização concreta da presente invenção, a dita composição é usada para o tratamento e profilaxia de hepatite C.

A composição imunoestimuladora que compreende o domínio de EDA de fibronectina (ou fragmento ou sua variante) pode conter adicionalmente carreadores, excipientes, e outros ingredientes farmaceuticamente aceitáveis conhecidos.

A composição imunoestimuladora da invenção pode ser administrada a animais, por exemplo, mamíferos (humanos ou não-humanos), aves, e assemelhados, de acordo com métodos convencionais amplamente conhecidos daqueles versados na tpecnica (por exemplo, oralmente, subcutaneamente, nasalmente, topicamente).

A invenção também proporciona um método terapêutico e/ou profilático que inclui administrar uma composição imunoestimuladora que compreende domínio de EDA de fibronectina (ou fragmento ou variante da mesma) a um paciente.

As vias de administração que são adequadas incluem transdérmica ou absorção transmucosa, injeção (por exemplo, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, e assemelhadas.), ingestão, inalação, e assemelhadas.

De acordo com um outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica que inclui pelo menos um carreador farmaceuticamente aceitável e uma quantidade efetiva do vetor proteínico em pelo menos uma de suas formas de expressão ou concretizações:

a) o vetor proteínico na forma polipeptídica;

b) um ácido nucléico modificado que codifica o dito

vetor proteínico;

c) um vetor de expressão que compreende o dito ácido nucléico modificado; ou

d) expressão de células receptoras que também compreendem o dito ácido nucléico modificado.

Em uma outra particular concretização, a composição farmacêutica é caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade efetiva de células dendríticas, em que as ditas células dendríticas foram incubadas *in vitro* com o vetor proteínico em pelo menos uma de suas formas de expressão ou concretizações. De acordo com uma concretização mais particular a dita composição farmacêutica é uma vacina ou composição imunoterapêutica.

Além disso, alguns usos adicionais do vetor proteínico são proporcionados neste contexto. Em uma concretização da invenção, o vetor proteínico em qualquer uma de suas formas de expressão é usado para a preparação de uma composição farmacêutica efetiva para induzir maturação de células dendríticas *in vitro* ou *in vivo*.

Em uma outra concretização, o dito vetor proteínico é usado para a preparação de uma composição farmacêutica para induzir uma imuno-resposta específica contra a molécula de interesse (antígeno ou epítope) acoplada ao vetor proteínico. Esta imuno-resposta é uma imuno-resposta humoral (produção de anticorpos côn-

tra a molécula de interesse), uma resposta de auxiliar T, ou uma resposta de célula T citotóxica. Em uma composição a dita imuno-resposta é uma resposta de CTL.

Em uma concretização mais particular, a invenção refere-se ao uso do vetor proteínico na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e profilaxia de uma enfermidade infecciosa. A dita enfermidade infecciosa poderá ser uma enfermidade bacteriana, viral, por fungo ou infecciosa parasítica.

Em uma outra particular concretização, a invenção refere-se ao uso do vetor proteínico da invenção na preparação de uma composição farmacêutica de utilidade para o tratamento e profilaxia de uma enfermidade por tumor.

Ainda em outra concretização particular, a invenção refere-se ao uso do vetor proteínico na preparação de uma composição farmacêutica de utilidade para o tratamento e profilaxia de uma enfermidade alérgica. Um número de enfermidades alérgicas encontra-se relacionada com a ativação da imuno-resposta de Th2. Desta forma, um desvio, ou uma mudança de uma resposta de Th2 para Th1 pelo uso do vetor proteínico portador de um alérgeno particular, poderá ter um efeito protetor ou terapêutico na enfermidade alérgica.

De acordo com uma concretização particular da invenção, a composição farmacêutica proposta é usada para administração a um receptor animal ou humano. Qualquer via de administração adequada poderá ser usa-

da. Em uma concretização particular, a composição farmacêutica é administrada por uma via parenteral (isto é, intravenosa, subcutânea, intramuscular), uma via transdérmica, ou uma via de mucosa.

Descrição Breve dos Desenhos

Figura 1. Análise SDS-PAGE de proteínas EDA e EDA-SIINFEKL produzidas e purificadas. Uma alíquota das proteínas EDA e EDA-SIINFEKL foi cararegada em gel de poliacrilamida a 15% e submetida a eletroforese. Marcadores de peso molecular (MWM) estão indicados em KDa. Observa-se uma banda correspondente ao peso molecular putativo das proteínas EDA e EDA-SIINFEKL (13-14 KDa).

Figura 2. Vinculação do vetor proteínico EDA-SIINFEKL a TLR4. 2A. Ensaios de vinculação direta. Células HEK293-LacZ e células (HEK293-LacZ) e HEK293-TLR4/MD2/CD14 (HEK293-TLR4) foram pulsadas com 1μM EDA-SIINFEKL, fixadas com paraformaldeído, rotuladas com anticorpos anti-His e anti-EDA, reveladas com anti-camundongo IgG-FITC e analisadas por citometria de fluxo. **2B. EDA capacidade de inibir vinculação dos anticorpos anti-TLR4 às células expressoras de TLR4.** Incubaram-se células HEK-TLR4 durante 2 horas a 4°C na presença ou ausência de 500 nM de proteína EDA-SIINFEKL. As células foram lavadas e incubadas com anticorpos anti-TLR4 manchados com FITC e analisados por citometria de fluxo. **2C. Percentagem de inibição de vinculação**

de de anticorpo anti-TLR4 a células expressoras de TLR4 por meio de utilização de diferentes concentrações de proteína EDA-SIINFEKL. **2D. Ensaios de aderência de células.** Células HEK-hTLR4 ou HEK-LacZ, manchadas com timidina tritiada foram distribuídas em cavidades de uma microplaqueta de 96 cavidades previamente revestidas com proteína de EDA e incubadas durantes 2 horas a 37°C. As células não aderentes foram eliminadas enquanto que as células aderentes foram coletadas e a radioatividade incorporada foi medida em um contador de cintilação Topcount. Os números de células aderentes por cavidade foram calculados com o auxílio de curvas padrão.

Figura 3. EDA-SIINFEKL activa rota de sinalização de TLR4. Medição colorimétrica de gene de fosfatase alcalina embrionária secretada humana nos sobrenadantes de cultura de células expressoras de HEK293/TLR4-MD2-CD14 ou HEK293/LacZ transfectadas com este gene relator cuja expressão é controlada por um promotor ELAM-1 induzível por NF-kB. 24 horas depois da transfecção, as células foram incubadas na presença ou ausência de diferentes concentrações de LPS, 100 nM de proteína EDA-SIINFEKL (EDA), ou 100 nM de proteína EDA-SIINFEKL previamente digerida com proteínase K. Barras representam indução dupla de NF-kB (OD obtido com sobrenadantes a partir de HEK293/TLR4-MD2-CD14 dividido por OD obido com sobrenadante proveniente de HEK293/LacZ).

Figura 4. EDA-SIINFEKL induz secreção de citoquinas pró-inflamatórias por DC *in vitro*. Medulas espinais derivadas de DC foram cultivadas na presença de LPS (1 μg/ml), EDA-SIINFEKL (500 nM), EDA-SIINFEKL (500 nM) digeridas com proteínase K, ou solução salina. Depois de 24 horas, as presenças de IL-12 (A) e de TNF-α(B) foram medidas em sobrenadante de cultura por meio de ELISA.

Figura 5. EDA-SIINFEKL induzs maturação de CD11c DC *in vivo*. A maturação de células dendríticas é um requisito para o estímulo ótimo de uma resposta de célula T. Quando ocorre a maturação, as APC aumentam a expressão de moléculas de superfície tais como as moléculas classe I ($H2K^b$ no modelo dos inventores) e classe II MHC (IA^b no modelo dos inventores), CD40, CD80 e CD86. Portanto, os inventores analisaram se EDA-SIINFEKL induziria maturação das células expressoras de CD11c in vivo. Camundongos C57BL/6 wt foram imunizados i.v. com 25 μg de EDA-SIINFEKL, 25 μg de EDA-SIINFEKL digerido com proteínase K, 25 μg de LPS ou com PBS sozinho. De mesma forma, camundongos C57BL/6 TLR4 KO foram imunizados com 25 μg de EDA-SIINFEKL ou com PBS sozinho. Quinze horas depois os camundongos foram sacrificados e as células CD11c purificadas por autoMACS. As células foram rotuladas e analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de moléculas de H-2Kb, I-Ab, CD40, CD80 e CD86.

Figura 6: EDA-SIINFEKL é eficientemente

apresentado por células dendríticas a T células específicas para epitope SIINFEKL. Os inventores caracterizaram a capacidade de EDA-SIINFEKL serem capturadas por APC para apresentação de epitope SIINFEKL processado por CTL às células T provenientes de camundongos transgênicos OT-1, específico para este epítope. **(A) Produção de IFN-γ por células não-aderentes a partir de camundongos transgênicos OT-1.** Cultivou-se medula óssea derivada de DC na presença de meio sozinho, diferentes concentrações de peptídeo SIINFEKL sintético, SIINFEKL e EDA, EDA-SIINFEKL (proteína de fusão) ou EDA sozinho. Vinte e quatro horas depois foram coletadas DC e usadas como APC na presença de 10^5 de células OT-1 não-aderentes. Depois de outras 24 horas, o sobrenadante foi recuperado e mediu-se o IFN-γ secretado. **(B) Dependência de molécula TLR4.** Células de hibridoma B3Z (10^5 células/cavidade) foram incubadas na presença de células do baço provenientes de camundongos C57BL/6wt ou com esplenócitos provenientes de camundongos abatidos para moléculas TLR4 (10^5 células/cavidade) e proteína EDA-SIINFEKL (100 nM). **(C)** As células provenientes do baço de camundongos C57BL76wt foram cocultivadas com células de hibridoma B3Z e proteína EDA-SIINFEKL na presença ou ausência de um anticorpo anti-TLR4. **(B e C)** A quantidade de IL-2 segregada para o sobrenadante de cultura foi medida por bioensaio baseado no uso de linha de células CTLL. **(D) Efeito de cloroquina, monensina, brefeldina ou cicloeximida na apresentação de**

antígeno à proteína de fusão EDA-SIINFEKL. Células dendríticas derivadas de medula óssea foram incubadas durante 1 hora com ausência ou presença de 30 mM de cloroquina, brefeldina, monensina ou 4 μg/ml cicloeximida, antes da adição de EDA-SIINFEKL ou de peptídeo sintético SIINFEKL (barras brancas). Depois de 10 horas em cultura, as ditas DC foram fixadas em glutaraldeído e usadas como células de apresentação de antígeno (APC) (10^4 células/cavidade) em co-culturas com células de camundongo não-aderentes OT-1 (10^5 células/cavidade). 24 horas depois, a quantidade de IFN-γ secretado foi medida por um ELISA comercial.

Para estudar se a expressão de TLR4 em APC poderia favorecer o processo de apresentação, os inventores cultivaram células de hibridoma B3Z (específicas para epítope SIINFEKL) na presença de células de baço provenientes de camundongos C57BL/6 wt ou a partir de camundongos TLR4 KO, e diferentes concentrações de EDA-SIINFEKL (nM). A quantidade de IL-2 liberada para o sobrenadante de cultura foi medida por um bioensaio baseado em CTLL (Figura 6E).

Figura 7. Imunização de camundongos com EDA-SIINFEKL induz uma resposta de célula específica para epítope SIINFEKL. Os resultados precedentes demonstraram que a proteína recombinantee EDA-SIINFEKL é bioativa e especificamente promove a ativação das APC. A indução de imuno-respostas de células T específicas *in vivo* é da maior importância para o desenvolvimento

de uma vacina. Desta maneira, os inventores testaram se camundongos imunizados com proteína de fusão EDA-SIINFEKL desenvolveram respostas de células específicas contra este epítope. **(A) Indução de células produtoras de IFN-γ.** Nos dias 0 e 10, imunizaram-se camundongos C57BL/6 com 1,5 nmol de EDA-SIINFEKL ou com 1,5 nmol de peptídeo SIINFEKL. No dia 20, células de baço foram incubadas durante 48 horas na presença ou ausência de SIINFEKL, e a quantidade de IFN-γ secretado foi medida por meio de ELISA. **(B) Indução de análise de resposta de CTL específica de SIINFEKL.** Esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com EDA-SIINFEKL ou com SIINFEKL foram restimulados durante 5 dias na presença de peptídeo SIINFEKL. Depois desta incubação mediu-se a atividade de CTL contra células visadas EL-4, na ausência ou presença de peptídeo SIINFEKL por um ensaio de liberação de cromo^{51} convencional. Os dados representam as percentagens médias dos valores de lise específica líquido (%lise de uma célula visada pulsada com SIINFEKL menos a percentagem de lise de uma célula visada não-pulsada) a partir de amostras em triplicata.

Figura 8. EDA-SIINFEKL protege da provocação de tumor com células expressoras de EG7 OVA. Para se estudar a capacidade da proteína de fusão de EDA-SIINFEKL proteger camundongos contra injeção de células de tumor EG7OVA, camundongos foram imunizados s.c. nos dias 0 e 10 com 3 nmol de EDA-SIINFEKL, SIINFEKL ou com solução salina. Vinte dias depois da segunda imuniza-

ção os camundongos foram provocados s.c. com 10^5 células EG7OVA. O crescimento do tumor foi monitorado utilizando-se um calibre e expressou-se em milímetros cúbicos utilizando-se utilizando-se a fórmula V = (L x w^2)/2, onde L, comprimento; w, largura. Os camundongos foram sacrificados quando a dimensão do tumor atingiu um volume maior do que 8 cm^3.

Figura 9. EDA atua como um ajuvante na indução de respostas citotóxicas depois da imunização com proteína OVA. Existe a possibilidade de que se EDA for capaz de promover a maturação de células dendríticas *in vivo*, ele possa agir como um agente adjuvante depois da imunização com uma proteína que contém o epítope citotóxico, mas seja incapaz de ativação de uma resposta citotóxica por si mesmo. Para testar esta possibilidade, os inventores imunizaram um grupo de camundongos com 50 µg de EDA, com 500µg de OVA proteína (A) e outro grupo de camundongos com 500µg de OVA (B), sem utilizar qualquer outro tipo de adjuvante. Uma semana depois da imunização, os camundongos foram sacrificados e esplenócitos foram cultivados na presença de peptídeo sintético SIINFEKL synthe. Depois de 5 dias na cultura, a resposta citotóxica às células visadas EL-4 pulsadas com peptídeo SIINFEKL foi medida em um ensaio de liberação de Cr^{51} convencional.

Figura 10. EDA pode agir como um veículo para antígenos maiores. Nas experiências anteriores foi provado que a proteína de EDA pode agir como um ve-

ículo para transportar um epítope cititóxico e favorecer a indução de uma resposta de CTL contra o dito epítope. Em uma etapa posterior os inventores quiseram estudar se o EDA foi capaz de transportar um antígeno maior e facilitar a indução de uma resposta celular contra o dito antígeno. Com este objetivo, os inventores construíram a proteína de fusão EDA-OVA e realizaram as seguintes experiências *in vitro* e *in vivo*. **(A) Análise SDS-PAGE de proteína EDA-OVA recombinantee.** Proteína EDA-OVA recombinantee foi expressada em *E. coli*, purificada por cromatografia de afinidade, dessalinizada, desentoxicada, concentrada e analisada por SDS-PAGE. Observou-se uma banda de aproximadamente 55kDa, correspondente ao peso molecular putativo da dita proteína. **(B) Experiências de apresentação de antígeno.** Cultivaram-se DCs derivados de medula óssea na presença ou ausência de OVA, EDA-OVA (proteína de fusão), EDA plus OVA, ou EDA sozinha. 24 horas depois, os DCs foram usados como células de apresentação de antígeno na presença de 10^5 células não-aderentes provenientes de camundongos OT-1. A produção de IFN-γ por células não-aderentes a partir de camundongos OT-1 na presença de DC foi quantificada por um ELISA comercial ELISA. **(C) Proteína EDA-OVA induz CTLs específicos de OVA *in vivo*.** Camundongos C57BL/6 foram imunizads com 1 nmol de EDA-OVA ou com 1 nmol de OVA. Sete dias depois da imunização, esplenócitos provenientes de camundongos imunizados foram re-estimulados *in vitro* durante 5 dias na

presença de peptídeo SIINFEKL. Depois disso, mediu-se a atividade específica de CTL contra células EL-4 incubadas na ausência ou presença de de SIINFEKL em um ensaio de liberação de Cr^{51} convencional. Os dados representam as percentagens médias dos valores de lise específica líquida (% de lise de uma célula visada, pulsada com SIINFEKL menos % de lise de uma célula visada não pulsada) a partir de amostras em triplicata.

Figura 11. A proteína EDA-NS3 produz uma resposta de CTL específica contra proteína de vírus de hepatite C, NS3. Depois que se observou que a proteína EDA poderia atuar como um veículo para antígenos grandes, a capacidade da EDA para induzir uma resposta antivírus à proteína NS3 de vírus de hepatite C (aminoácidos 1-196 provenientes da região de protease de proteína NS3) foi analisada, como uma estratégia de vacinação contra infecção pelo dito vírus. **(A) Análise de SDS-PAGE da proteína recombinantee EDA-NS3 (1-196).** Proteína de fusão recombinantee EDA-NS3 foi construída e expressada em *E. coli*, e analisada por SDS-PAGE. **(B) A proteína EDA-OVA induz CTL específico de OVA *in vivo*.** Camundongos HHD (transgênicos para proteína HLA-A2.1) foram imunizados, por viai.v. com 100 µg/camundongo de proteína EDA-NS3 dissolvida em solução salina. Uma semana depois da imunização, esplenócitos foram reestimulados *in vitro* com peptídeo NS3 1073 (que contém uma determinante T citotóxica imunodominante proveniente de proteína NS3 para restrição de HLA-A2). Depois

de 5 dias em cultura, a atividade citotóxica foi medida contra células visadas T2 incubadas com peptídeo 1073(V) (SEQ ID NO: 20, CVNGVCWTV), ou com 1073(L) variante do dito peptídeo (SEQ ID NO: 21, CLNGVCWTV) ou na ausência de peptídeo, utilizando-se um ensaio de liberação de Cr^{51} convencional. **(C) A proteína EDA-NS3 induz uma resposta multiepitópica contra diferentes epítopes provenientes da proteína NS3.** Esplenócitos obtidos a partir de camundongos imunizados com EDA-NS3 foram reestimulados *in vitro* durante 48 horas na presença de peptídeos 1038-1046, NS3 1073-1081 ou NS3 1169-1177 (que contêm três determinantes citotóxicas para restrição de HLA-A2 dentro do fragmento 1-196 de proteína NS3) ou com proteína NS3 recombinante (Mikrogen). A quantidade de IFN-γ segregado no sobrenadante foi medida por meio de uma ELISA comercial. **(D)** A **proteína EDA-NS3 induz uma resposta citotóxica prolongada.** Camundongos HHD foram imunizados por via i.v. com 100 µg/camundongo de proteína EDA-NS3 em solução salina. Sessenta dias depois de imunização, os camundongos foram sacrificados e a presença de CTLs específicas para peptídeo NS3 1073 foi medida em um ensaio de liberação de $cromo^{51}$ convencional, utilizando-se células visadas T2 incubadas na ausência ou presença de peptídeo NS3 1073. **(E) Imunização de camundongos C57BL/6 com DC incubado com EDA-NS3 protege camundongos contra infecção por vírus de enfermidade vHCV(1-3011) recombinante que expressa proteínas de vírus de hepatitis C.** Camundon-

gos foram imunizados com 10^6 de DC previamente incubado com proteína EDA-NS3 e 7 dias depois eles receberam uma provocação de $5x10^6$ de vírus de enfermidade vHCV(1-3011) por via i.p. Três dias depois da infecção os camundongos foram sacrificados e a carga viral foi quantificada/mg de tecido ovariano, por meio de um ensaio de infecção por células BSC-1.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Domínio Extra A a partir de fibronectina interage com TLR4 e ativa trajeto de sinalização de TLR4.

1.1 Materiais e Métodos

1.1.1 Expressão de proteínas EDA e EDA-SIINFEKL de vetor proteínico recombinante

Preparação do vetor proteínico recombinante

Domínio Extra A de fibronectina (EDA) foi amplificado por RT-PCR utilizando-se preparadores específicos e RNA a partir de hepatócitos obtidos a partir de camundongos tratados com concanavalin-A para induzir lisão no fígado [Lasarte et al, Hepatology. 2003; 37(2):461-70.]. Seções de tecido do fígado foram homogeneizadas e lisadas em Ultraspec (Biotecx, Houston, TX, USA) utilizando-se um Ultraturrax Driver T.25 (Janke & Kunkel, Ika-Labortechnik, Germany). O RNA foi isolado de acordo com a os métodos de Chomczynski e Sacchi (*Chomczynski P e Sacchi N. Single-step method de RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-*

chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-159). O RNA foi transcrito inverso (60 min a 37°C) com 200U de M-MuLV de transcriptase inversa (Gibco-BRL) em 20 µL volume de 5xRT amortecedor (250 mM Tris-HCl Ph 8,3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$) suplementado com 5 mM de ditiotreitol (DDT), 0,5 mM de trifosfato de deoxinucleoside (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 25U de inibidor de ribonuclease (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e 200 ng de hexâmeros aleatórios (Boehringer Mannheim). Depois de aquecimento (95°C, 1 min) e resfriamento brusco em gelo, utilizou-se 0,3 µg dagrupamento cDNA para amplificação PCR em 20 µl de 10x solução amortecedora (100 mM Tris-HCl pH 9,3, 500 mM KCl, 1% Triton X-100) que contém 0,08 mM dNTP, preparadores a montante e a jusante (40 ng cada um), 1,5 mM $MgCl_2$ e 2U de *Taq* DNA polimerase (Promega Corporation). O preparador de montante foi (SEQ. ID. NO: 13)

5' C<u>CATATG</u>*AACATTGATCGCCCTAAAGGACT* 3'

(as bases sublinhadas foram adicionadas aos preparadores para introduzir uma seqüência reconhecida pela enzima de restrição NdeI enquanto a seqüência em itálico corresponde ao início de EDA)

E preparador de jusante (SEQ. ID. NO: 14)

5'A<u>GCGGCCGC</u>**CCATTCAGTCAGTTTTTCAAAGTTGATTATACTCTCAAGCTG***TG TGGACTGGATTCCAATCAGGGG* 3'

(As bases sublinhadas foram adicionadas aos preparadores para introduzir a seqüência reconhecida pela enzima de restrição NotI; a seqüência em negrito corresponde à

seqüência de codificação para o epítope OVA CTL (SIINFEKL) flanqueado por três aminoácidos nas duas extremidades QLE**SIINFEKL**TEV, enquanto que a seqüência em itálico corresponde ao final de EDA).

O fragmento amplificado PCR foi clonado em pCR2.1-TOPO utilizando-se o kit de clonagem TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Este plasmídio foi digerido com NdeI e NotI e o fragmento de DNA resultante foi subclonado no plasmídio digerido NdeI/NotI pET20b (Novagen), que possibilita a expressão das proteínas de fusão que carregam seis resíduos de histidina (6xHis etiquetas) no término carboxi.

O plasmídio pET20b2-26 resultante que expressou a proteína de fusão EDA-SIINFEKL-6xHis foi transfectado em células BL21(DE3) para a expressão do vetor proteínico recombinante. As células transfectadas foram desenvolvidas em 1 l de LB a 37°C até OD600 alcançar 0,5-1. IPTG foi adicionado à cultura para uma concentração final de 0,4 mM e incubado com agitação sob temperatura ambiente durante a noite. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 0,1 de M Tris-HCl, pH=7,2, tratadas com lisozime, rompidas médiante utilização de uma prensa French (duas passagens a 20.000 pst), clarificadas por centrifugação e filtradas. A proteína de fusão presente na fração solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade (Histrap, Pharmacia) mediante utilização de uma plataforma FPLC (AKTA, Pharmacia). A proteína eluída foi

dessalinizada utilizando-se colunas de dessalinização Hitrap (Pharmacia), e concentrada utilizando-se dispositivo de filtro Amicon Ultra 4-5000 MWCO Centrifugal (Millipore Carrighwahill, Ireland). O vetor proteínico recombinante foi purificado a partir de endotoxinas por utilização de colunas Endotrap (Profos Ag, Regensburg, Germany) até os níveis de endotoxina ficarem abaixo de 0,2EU/μg de proteína (avaliado pelo ensaio LAL, Cambrex).

Para se obter um plasmídio de expressão para a proteína EDA, realizou-se uma PCR utilizando-se preparadores CCATATG*AACATTGATCGCCCTAAAGGACT* (SEQ ID NO: 13) e AGCGGCCGC*TGTGGACTGGATTCCAATCAGGGG* (SEQ ID NO: 15) e estratégias de clonagem semelhantes àquelas descritas para o plasmídio EDA-SIINFEKL, resultando no plasmídio pET20bEDA1.2. Adicionaram-se 20 μg de proteína a cada amostra em um gel de SDS-acrylamide a 15%, seguido por coloração com azul Coomassie. Observou-se uma banda correspondente ao peso molecular putativo (13 kDa).

1.1.2. Vinculação de EDA-SIINFEKL a TLR4. Citometria de fluxo e ensaios de aderência.

Para testar se a proteína recombinante EDA-SIINFEKL foi capaz de vincular-se às células de expressão TLR-4, utilizou-se HEK293 de expressão humana TLR4-MD2-CD14 293 (proveniente da Invivogen). Também se utilizaram células HEK293 transfectadas com LacZ (Invivogen) como um controle negativo. As células fo-

ram pulsadas com 1 mM EDA-SIINFEKL durante 1 h a 4°C, lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeido a 4% em PBS durante 10 min. Depois de 3 lavagens, as células foram rotuladas com anticorpos 1/100 anti-His (Qiagen) e 1/200 anti-CD16 (FcBlock, provenientes da Becton Dickinson) durante 1 hora e 30 min. Depois de três lavagens, as células foram incubadas durante 30 minutos com 1/100 diluição de um IgG anti-camundongo rotulado com fluoresceina e analisado por Citometria de fluxo.

Alternativamente, mediu-se a capacidade da proteína EDA-SIINFEKL inibir vinculação de anticorpo TLR4 anti-humano colorido-FITC às células HEK-hTLR4. Para isto, células HEK TLR4 foram incubadas durante 2 h a 4°C na presença ou ausência de doses diferentes de EDA-SIINFEKL. Depois disso, as células foram lavadas e incubadas com anticorpos anti-TLR4 e analisadas por citometria de fluxo. A percentagem de inibição foi calculada para diferentes concentrações ensaiadas de EDA-SIINFEKL. Ensaios de aderência de células também foram realizados. Células HEK LacZ ou HEK hTLR4 foram previamente coloridas com timidina tritiada e distribuídas em placas de 96 cavidades previamente revestidas com proteína de EDA. Depois de uma incubação de 2-horas a 37°C, as células não-aderentes foram removidas enquanto as células aderentes foram colhidas e radioatividade incorporada foi medida em um contador por cintilação Topcount. O número de células aderentes por cavidade foi calculado com o auxílio de curvas padrão obtidas

utilizando-se diferentes concentrações das células coloridas.

1.1.3. Ativação de caminho de sinalização de TLR4

Células de expressão HEK293/hTLR4-MD2-CD14 ou HEK293/LacZ foram transfectadas com um plasmídio carregando o gene de fosfatase alcalina embrionária secretada humano (SEAP) de acordo com as instruções do fabricante (Invivogen). Expressão SEAP é controlada por um promotor ELAM-1a induzível por NF-kB (pNiFty-SEAP (Invivogen)). Vinte e quatro horas depois da transfecção, células foram incubadas na presença ou ausência de diferentes concentrações de LPS, 100 nM de proteína EDA-SIINFEKL ou 100 nM de proteína EDA-SIINFEKL previamente digerida com proteínase-K. Depois de 24 horas, a expressão do gene reporter foi medida nos sobrenadantes da cultura por meio de um ensaio colorimétrico (Invivogen). Na Figura 3, as barras representam o fator de indução NF-kB dobrado (OD obtido nos sobrenadantes provenientes de HEK293/TLR4-MD2-CD14 dividido pelo OD obtido nos sobrenadantes provenientes de HEK293/LacZ). A quantidade de contaminantes de endotoxina em preparados de EDA neste ensaio foi inferior a 0,0003 μg/ml.

1.2 Resultados

1.2.1. Expressão de proteínas de fusão recombinantes de EDA e EDA-SIINFEKL

A proteína de EDA-SIINFEKL recombinante foi expressada em *E. coli* como uma proteína de fusão 6xHis (SEQ. ID. NO: 2), purificada por cromatografia de afinidade, dessalinizada e purificada a partir de endotoxinas tal como descrito na seção de métodos. As proteínas resultantes foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* utilizando-se anticorpos anti-his (Figura 1). Uma banda correspondente ao peso molecular putativo (13 kDa) foi observada para cada proteína.

1.2.2. Proteína de fusão EDA-SIINFEKL vincula TLR4

Descreveu-se que o Domínio Extra A de fibronectina ativa o receptor semelhante a Toll 4 (Okamura *et al*, JBC, 2001; 276:10229-10233). Entretanto, não existe evidência direta de vinculação física de EDA to TLR4. Os inventores analisaram primeiro se a proteína EDA-SIINFEKL tem a capacidade de vincular células que expressam TLR4. Células TLR4-MD2-CD14 ou HEK293 humanas expressoras de HEK293 transfectadas com LacZ (Invivogen) foram pulsadas com 1μM de proteína EDA-SIINFEKL, rotulada com anticorpos anti-His e um anti-camundongo IgG rotulado com fluoresceina (vide métodos) e analisadas por Citometria de fluxo. Constatou-se que as células HEK 293 expressoras de TLR4-MD2-CD14 humano apresentaram uma intensidade de fluorescência ligeiramente mais alta do que as células HEK 293 expressoras de LacZ (Figura 2A). A capacidade da proteína EDA-SIINFEKL inibir o anticorpo colorido de fluoresceina vincular-se

ao TLR4 humano, também foi medida. Os resultados mostraram que a incubação prévia de células HEK-hTLR4 com 500 mM de proteína EDA-SIINFEKL inibiu em aproximadamente 50% da dita vinculação de anticorpo (Figura 2B). A Figura 2C mostra o efeito inibidor de diferentes doses de EDA-SIINFEKL na dita vinculação de anticorpo. Por outro lado, mediu-se a capacidade das células de controle HEK hTLR4 e de controle HEK LacZ se vincularem em um ensaio de aderência, às cavidades plásticas previamente revestidas com proteína EDA. Observa-se que as células HEK hTLR4 são capazes de se vincularem especificamente às cavidades que contêm EDA. Todas estas experiências indicam que as proteínas EDA e EDA-SIINFEKL são capazes de vinculação a TLR4.

1.2.3. A proteína de fusão EDA-SIINFEKL activa o caminho de sinalização de TLR4

A sinalização de TLR4 conduz à translocação de NF-kB, um fator de transcrição que vincula os elementos de consenso dentro dos promotores de uma variedade de genes. Para se determinar se a proteína EDA-SIINFEKL recombinante pode ativar TLR4, utilizaram-se células HEK293/hTLR4-MD2-CD14 ou HEK293/LacZ transfectadas com um plasmídio portador de gene de fosfatase alcalina embrionária segregada humana (SEAP) sob o controle de um promotor de ELAM-1 induzível por NF-kB-(pNiFty-SEAP (Invivogen)). Constatou-se que a proteína EDA-SIINFEKL foi capaz de estimular a expressão de SEAP

somente nas células transfectadas HEK293/hTLR4-MD2-CD14, atingindo um fator de indução de NF-kB duplo de 7, semelhante àquele encontrado quando células foram incubadas com 0,01 μg de LPS (Figura 3). Esta capacidader de estimular a translocação nuclear NF-kB foi completamente anulada se a proteína EDA-SIINFEKL foi previamente digerida com proteínase K (Figura 3), sugerindo que a ativação EDA de TLR4 não pode ser responsável pela contaminação de LPS podtencial na preparação de proteína recombinante.

1.3 Discussão.

Os inventores construíram o plasmídio recombinante pET20b2-26 que permitiu a expressão de proteína de fusão recombinante EDA-SIINFEKL 6xHis em *E. coli*. A presença de 6 histidinas facilita a detecção e purificação da proteína de fusão. Desta forma, foi possível purificar-se a partir da fração citoplásmica de culturas de *E. coli* quantidades consideráveis da proteína de fusão. Ensaios de vinculação realizados em células expressoras de TLR4 sugeriram que a proteína EDA-SIINFEKL é capaz de vincular TLR4 especificamente. Além disso, foi mostrado aqui que a EDA-SIINFEKL é capaz de ativar o caminho de sinalização de TLR-4. Esta ativação não está relacionada à contaminação de LPS potencial da proteína, uma vez que a digestão prévia com proteínase K anula completamente a capacidade de estimular translocação nuclear de NF-kB. Além disso, a

quantidade de contaminantes de endotoxina na preparação de EDA neste ensaio esteve abaixo de 0,0003 μg/ml (conforme avaliado pelo ensaio de LAL) que é incapaz de ativar o caminho de sinalização de TLR-4 neste ensaio *in vitro*. Estes resultados sugerem que a proteína EDA poderia ser usada como um veículo proteináceo para antígenos visados para células de expressão de TLR4. É sabido que as células dendríticas expressam receptores semelhantes a tributo e particularmente TLR4. é igualmente conhecido que alguns dos estímulos de maturação mais potentes para DC provêm da interação do receptores de TLR receptors com seus respectivos ligantes. Desta forma, a interação de uma proteína de fusão que contém EDA e um determinado antígeno poderia favorecer a rapida ativação de imunidade inata por indução de produção de citoquinas pró-inflamatórias e aperfeiçoamento de moléculas co-estimuladoras. Além disso, a objetivação desta proteína de fusão para a superfície da DC poderia aumentar a captura e endocitose do antígeno pela DC e conseqüentemente, aumentar a imuno-resposta contra este antígeno.

Exemplo 2. EDA que contém proteínas de fusão induz a maturação de células dendríticas *in vitro* e *in vivo* e permite a indução de linfócitos T citotóxicos

2.1 Materiais e Métodos.

2.1.1. Medula óssea derivada de geração de células den-

dríticas.

Desenvolveram-se células dendríticas a partir de células de medula óssea. Depois de lisagem dos eritrócitos com amortecedor de lise de ACK, as células foram lavadas e subsequentemente esgotadas de linfócitos e granulócitos por incubação com uma mistura de anticorpos contra CD4 (GK1; ATCC, Manassas, VA), CD8 (53.6.72; ATCC), Ly-6G/Gr1 (BD-Pharmingen; San Diego CA) e CD45R/B220 (BD-Pharmingen) seguida por complemento de coelho. As células remanescentes foram desenvolvidas em 10^6 células/ml em placas de 12-cavidades em meio completo suplementado com 20 ng/ml de mGM-CSF e 20 ng/ml de mIL-4 (ambos provenientes da Peprotech; London, UK). A cada dois dias, o meio foi substituído com meio fresco que continha citoquinas. As células dendríticas não-aderentes foram colhidas no 7° dia e cultivadas na presença ou ausência de 1 μg/ml ou 15 ng/ml LPS (Sigma), EDA-SIINFEKL (500 nM) ou SIINFEKL (10 μM) a 37°C e 5% CO_2. Em algumas experiências adicionou-se às culturas polimixin (10μg/ml) para inibir o efeito dos contaminantes de endotoxina. Depois de 24 h de culture, os sobrenadantes foram colhidos e IL-12 e TNF-α foram medidos por ELISA (BD-Pharmingen), de acordo com as instruções do fabricante.

2.1.2 Medição da maturação *in vivo* de células CD11c depois de imunização com EDA-SIINFEKL. Efeito de digestão com proteínase-K.

Maturação de DC foi evalada *in vitro* por citometria de fluxo que media a expressão de vários marcadores de superfície. Camundongos C57BL6 foram injetados i.v. com 25 μg de EDA-SIINFEKL, 25 μg de EDA-SIINFEKL digerido com proteínase K, 25 μg LPS ou com PBS sozinho. A digestão de EDA-SIINFEKL com proteínase K foi realizada pela utilização de agarose-proteínase K (Sigma, St Louis). Sucintamente, 5 mg/ml de glóbulos de agarose proteínase lavadas em amortecedor de lavagem (20 mM Tris-HCl, pH 7,2, 1 mM EDTA, 1mM $ClCa_2$) foram usados para digerir a proteína EDA-SIINFEKL ou LPS durante 20 minutos a 30°C. Os glóbulos de agarose-proteínase K foram removidos por centrifugação. Quinze horas depois de imunização, os camundongos foram sacrificados e células CD11c purificadas por autoMACS. As células foram rotuladas e analisadas por citometria de fluxo.

2.1.3. Estudos *In vitro* para analisar a capacidade de apresentação de antígeno.

Os inventores caracterizaram a capacidade da EDA-SIINFEKL ser capturada por APC para apresentar o SIINFEKL o epítope CTL processado às células T provenientes de camundongos transgênios OT-1, ou ao T hibridoma B3Z, os dois específicos para este epítope. Medula

óssea derivada de DC foi cultivada na presença de diferentes concentrações de EDA-SIINFEKL, EDA e SIINFEKL (não vinculados covalentemente) ou SIINFEKL. Depois de vinte e quatro horas de culture, sobrenadantes foram coletados e a produção de IFN-γ foi medida por ELISA. Alternativamente, 12 horas depois da iniciação da cultura, DC foram coletados, fixados com glutaraldehyde 0,05% e usados como APC na presença de diferentes quantidades de células não-aderentes provenientes de OT-1 ou na presença de linha de células T de hibridoma B3Z. Em algumas experiências DC foram incubadas na presença ou ausência de cloroquina (3 μM), monensina (1 μl Golgystop, Pharmingen), brefeldine (1 μl Golgyplug, Pharmingen), cicloeximida (4 μg/ml), e então incubadas na presença de peptídeo EDA-SIINFEKL ou SIINFEKL. Em alguns casos anticorpo anti-TLR4 foi adicionado às culturas.

A ativação de células B3Z na presença de APC tratadas foi realizada pela medição da produção de IL-2. Células de hibridoma B3Z (10^5 células/cavidade) foram cultivadas em meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% FCS, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina e $5x10^{-5}$M 2-mercaptoetanol) for 18 hours na presença de células de baço (10^5 células/cavidade) a partir de camundongos C57BL/6 wt ou a partir de camundongos TLR4 KO, e diferentes concentrações de EDA-SIINFEKL. A quantidade de IL-2 liberada para o sobrenadante de cultura foi medida por um bioen-

saio baseado em CTLL tal como descrito anteriormente.

2.1.4. Medição de indução *in vivo* de células de produção de linfócitos T citotóxicos (CTL) e IFN-γ depois de imunização.

Camundongos C57BL6 foram imunizados i.v. com 50 μg de EDA-SIINFEKL ou com SIINFEKL nos dias 0 e 10. No dia 20, os camundongos foram sacrificados para análise de resposta CTL contra SIINFEKL. Esplenócitos provenientes de animais imunizados foram cultivados na presença de 0,1 μg/ml de SIINFEKL a 5 x 10^6 células/ml (10 ml) durante 5 dias em meio completo. No 5° dia, as células foram colhidas para ensaios de liberação de cromo. A atividade lítica foi medida por incubação durante 4 horas de diferentes números de células de órgão motor com 1x 10^4 de células EL-4 alvo previamente carregadas com ^{51}Cr e com ou sem SIINFEKL. A percentagem de lise específica foi calculada de acordo com a fórmula: (cpm experimental - cpm espontâneo)/(cpm máximo - cpm espontâneo) x 100, onde lise espontâneo corresponde às células alvo incubadas na ausência de células de órgão motor e lise máximo é obtido por incubação de celulas alvo com 5% Triton x100.

Para medir a produção de IFN-γ em resposta a SIINFEKL, esplenócitos provenientes de camundongos imunizados foram chapeados em placas de 96 cavidades sob 8x10^5 células/cavidade com meio completo sozinho, ou com 30 μM de peptídeo em um volume final de 0,25 ml.

Sobrenadantes (50 µl) foram removidos 48 horas depois e a IFN-γ foi medida por ELISA (Pharmingen, San Diego, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

Em um outro grupo de experiências foi confirmada a capacidade da proteína EDA atuar como um adjuvante em uma mistura. Neste caso, um group de camundongos C57BL/6 foi iminizado por meio i.v. com 50 µg de EDA-SIINFEKL na presença de 500 µg de proteína OVA em PBS enquanto que outro grupo foi imunizado com 500 µg. de proteína OVA sozinha alone em PBS. Uma semana depois os camundogos foram sacrificados para se determinar a resposta de CTL contra SIINFEKL nos dois grupos, tais como indicados anteriormente.

2.1.5. Proteção contra provocação de células de tumor EG7OVA

Camundongos foram imunizados s.c. nos dias 0 e 10 com 3 nmol de EDA-SIINFEKL or SIINFEKL. Vinte dias depois da segunda imunização os camundongos foram provocados s.c. com 10^5 de células EG7OVA. O crescimento de tumor foi controlado com um calibre e expresso em mm^3 utilizando-se a fórmula $V = (L \times w^2)/2$, em que L é comprimento; w, largura. Os camundongos foram sacrificados quando as dimensões de tumor alcançaram um volume maior do que 8 cm^3.

2.2. Resultados

2.2.1. Proteína de fusão EDA-SIINFEKL estimula a produ-

ção de IL-12 e TNF-α por medula óssea derivada de células dendríticas (BMDC).

Os inventores examinaram se a proteína recombinante EDA-SIINFEKL foi capaz de estimular BMDC para produzir citoquinas pró-inflamatórias tais como IL-12 ou TNF-α. Desta forma, BMDC foram cultivados com SIINFEKL (10 μM), LPS (1 μg/ml e 15 ng/ml) ou EDA-SIINFEKL-6xHis (500 nM). Vinte e quatro horas depois, IL-12 ou TNF-α no sobrenadante da cultura foram medidos por ELISA. Foi constatado que EDA-SIINFEKL foi capaz de estimular a produção de níveis muito altos de IL-12 ou TNF-α por BMDC (Figura 4). Esta capacidade imunoestimuladora desapareceu quando a proteína foi previamente tratada com proteínase K, indicando que esta atividade não foi devida a possíveis resíduos de endotoxina nas amostras de proteína.

2.2.2. EDA-SIINFEKL induz maturação *in vivo* dependente de TLR4 da DC expressora de CD11c.

Células dendríticas (DC) são as células de apresentação de antígeno mais potentes com uma habilidade única de estimularem células T naturais e respostas secundárias a antígenos. As DC têm a capacidade de capturar antígenos, processá-los em peptídeos e apresentar os peptídeos em associação com moléculas MHC classe I ou II a células T citotóxicas (CTL) ou células T auxiliares, respectivamente. As DC imaturas podem capturar antígenos, mas elas devem diferenciá-los ou

amadurecer para se tornarem capazes de estimular células T naturais. Desta forma, a maturação de células dendríticas é um requisito para o estímulo ótimo de uma resposta a célula-T. Quando a maturação ocorre, as APC aumentam as moléculas de expressão de superfície tais como as moléculas MHC classe I e classe II, CD40, CD80 e CD86. Portanto, os inventores analisaram se EDA-SIINFEKL poderia induzir a maturação de células de expressão de CD11c *in vivo*. Camundongos C57BL6 foram imunizados i.v. com 25 μg de EDA-SIINFEKL, 25 μg de EDA-SIINFEKL digeridas com proteinase K, 25 μg LPS ou com PBS sozinha. Quinze horas depois os camundongos foram sacrificados e as células CD11c purificadas por auto-MACS, rotuladas por anticorpos e analisadas por citometria de fluxo. Os inventores constataram que a imunização com EDA-SIINFEKL foi capaz de induzir a expressão de moléculas MHC da classe I e classe II, CD40 e CD86. Esta capacidade de EDA-SIINFEKL foi completamente anulada quando a proteína foi digerida com proteínase K antes da imunização (Figura 5). A digestão de LPS com proteinase K não teve qualquer efeito inibidor na capacidade de LPS induzir a expressão destes marcadores de maturação (não ilustrados). Os inventores testaram a capacidade de EDA-SIINFEKL induzir maturação das células CD11c provenientes de camundongos C57BL/6 TLR4 KO e constataram que a EDA-SIINFEKL foi incapaz de induzir sobre-expressão de marcadores de maturação encontrados em camundongos C57BL/6 wt (Figura 5).

2.2.3 EDA-SIINFEKL é apresentada eficientemente pelas células dendríticas às células T específicas para epítope de SIINFEKL.

Os inventores caracterizaram a habilidade de EDA-SIINFEKL ser capturado por APC para apresentar o SIINFEKL epítope CTL processado às células T a partir de camundongos transgênicos OT-1, específicos para este epítope. Medula óssea derivada de DC (10^5 células/cavidade) foi cultivada na presença de diferentes concentrações de peptídeo EDA-SIINFEKL, EDA+SIINFEKL, EDA ou SIINFEKL. Quarenta e oito horas depois, adicionaram-se 10^5 células OT-1 não-aderentes. A produção de IFN-γ por células OT-1 não-aderentes foi medida (Figura 6A). Peptídeo SIINFEKL foi eficientemente apresentado às células T a partir de camundongos OT-1 conforme provado por produção de IFN-μ. EDA-SIINFEKL também induz altos níveis de IFN-γ, muito embora sejam necessárias altas doses da proteína para se obterem níveis similares ou mesmo mais elevados de IFN-γ, indicando claramente que a proteína EDA carrega este epítope SIINFEKL para as moléculas MHC classe I. A adição da proteína EDA à DC incubada com peptídeo SIINFEKL não aumenta a produção de IFN-γ pelas células T a partir de camundongos OT-1. Como é de se esperar, DC incubada com EDA sozinho não ativa as células T provenientes de camundongos OT-1. Para analisar se a expressão de molécula TLR4 em DC poderá aumentar a apresentação de EDA-SIINFEKL, células B3Z específicas de SIINFEKL foram in-

cubadas com diferentes concentrações de EDA-SIINFEKL na presença de células de baço a partir de camundongos C57BL/6 wt ou TLR4KO. A apresentação de EDA-SIINFEKL às células B3Z foi mais eficiente na presença de antígeno que apresenta células que expressaram TLR4 (Figura 6B). Também, a apresentação de EDA-SIINFEKL a células B3Z foi completamente bloqueada pela adição de anticorpos anti-TLR4 (Figura 6C), sugerindo que TLR4 está envolvida na captura de EDA-SIINFEKL. Depois disso, os inventores estudaram o efeito de diferentes drogas no processamento de EDA-SIINFEKL e constataram que esta apresentação foi totalmente inibida por monensina, brefeldina ou cicloeximida, mas não por cloroquina, um inibidor de acidificação conhecido em endosomes e lisosomes posteriores (Figura 6D). Como é de se esperar, a apresentação de peptídeo sintético SIINFEKL não foi afetada por estas drogas. Estes dados sugerem que a internalização de EDA-SIINFEKL não é mediada por macropinocitose e demonstram que EDA-SIINFEKL é processado por intermédio de caminho de processamento citossólico de classe I.

2.2.4. EDA-SIINFEKL induz CTL específico de SIINFEKL in vivo.

Os resultados precedentes demonstram que a proteína recombinante EDA-SIINFEKL é bioativa e especificamente ativa APCs. A indução de imuno-respostas de linfócito T específico *in vivo* é da maior importância

para o desenvolvimento de uma vacina. Assim, os inventores testaram se camundongos imunizados com proteína de fusão EDA-SIINFEKL desenvolveu respostas de CTL específicas contra células visadas pulsadas com epítope de SIINFEKL. Camundongos C57BL6 foram imunizados i.v. com 50 μg de EDA-SIINFEKL ou com SIINFEKL em PBS nos dias 0 e 10. No dia 20, os camundongos foram sacrificados para análise de resposta de CTL contra SIINFEKL. Constatou-se que EDA-SIINFEKL foi capaz de induzir CTL contra células alvo EL-4 pulsadas com SIINFEKL. Por outro lado, nenhuma atividade de CTL foi encontrada quando camundongos foram imunizados com SIINFEKL sozinho (Figura 7). Devido à capacidade de EDA induzir maturação de células dendríticas *in vivo*, a capacidade de EDA atuar como um adjuvante foi também analisada quando imunizada com proteína OVA. Nesta experiência, os inventores observaram que a presença de EDA na mistura de imunização teve um efeito imunoestimulador e é capaz de aumentar a indução de resposta de CTL contra SIINFEKL induzida pela proteína OVA (compare-se a atividade lítica entre os painéis A e B da figura 9).

2.2.5. EDA-SIINFEKL protege camundongos da provocação com células de tumor expressoras de proteína OVA.

Para estudar a capacidade da proteína fusão EDA-SIINFEKL proteger camundongos contra injeção de células de tumor EG7OVA, camundongos foram imunizados s.c. com 3 nmol de EDA-SIINFEKL, SIINFEKL ou com solu-

ção salina. Vinte dias depois da segunda imunização os camundongos foram provocados s.c. com 10^5 EG7OVA células. Os inventores constataram que a imunização de EDA-SIINFEKL protege os camundongos do crescimento de tumores. Todos os camundongos imunizados com SIINFEKL ou com solução salina desenvolveram tumores, enquanto que 40% dos camundongos imunizados com EDA-SIINFEKL permaneceram isentos de tumores e os restantes 60% experimentaram retardamento de crescimento de tumores (Figura 8).

2.3. Discussão.

No presente estudo, utilizando-se proteína EDA recombinante como um vetor de distribuição epítope, estabeleceu-se uma estratégia para imunização que provê respostas de CTL *in vivo*, contornando a necessidade de um adjuvante. Os inventores identificaram os mecanismos que contribuem para a eficiência de EDA que contém proteínas de fusão como um vetor para distribuir antígenos às células expressoras TLR-4 e para induzir imuno-respostas celulares contra um antígeno.

Primeiro os inventores descobriram que o estímulo *in vitro* de BMDC com EDA foi capaz de estimular a produção de sitoquinas proinflamatórias, tais como IL-12 e TNF-α. Estas citoquinas são conhecidas como sendo cruciais para a iniciação de uma forte imunoresposta contra um antígeno. Adicionalmente, foi constatado que a imunização *in vivo* com EDA foi capaz de

induzir maturação de DC e aumentar a expressão de moléculas co-estimuladoras na superfície da DC. A expressão destas moléculas co-estimuladoras é de suma importância para a indução eficiente de imuno-respostas contra um antígeno. Constatou-se que este efeito é dependente da presença de TLR4, uma vez que células CD11c isoladas *in vivo* provenientes de camundongos C57BL/6 TLR4 KO previamente imunizados com EDA, não mostram qualquer melhoramento no seu estado de maturação em comparação com aquelas encontrados nos animais não-imunizados.

Os inventores constataram que a presença de molécula TLR4 em APC aperfeiçoa a apresentação de antígeno depois de incubação com proteína de fusão EDA-SIINFEKL e que esta apresentação não foi afetada pela cloroquinona, que inibe proteólise endolisossomal. Estes dados sugerem que a internalização de EDA-SIINFEKL não é mediada por macropinocitose e demonstra que a proteína EDA-SIINFEKL recombinante é processada como um antígeno citosólico, e implica em que a proteína de fusão tem de ser distribuída para o citosol através da membrana de plasma de APC.

E o mais importante, os inventores constataram que a imunização de camundongos com a proteína de fusão EDA-SIINFEKL recombinante é capaz de induzir *in vivo* uma resposta de CTL específica contra o epítope SIINFEKL. Além disso, a imunização com EDA-SIINFEKL é capaz de proteger camundongos contra provocação com cé-

lulas de tumor EG7OVA. Todos estes dados mostram que este vetor proteínico que contém EDA é capaz de: (i) visar antígenos para as células expressoras de TLR4 e em particular APC profissional; (ii) distribuir o antígeno vetorizado para o caminho de processamento de antígeno Classe-I clássico; (iii) induzir a maturação de células dendríticas *in vivo* e *in vitro*; e (iv) preparar o CTL *in vivo* contra o antígeno vetorizado na ausência de adjuvante e, assim, pode ser usado em estratégias de vacinação contra agentes infecciosos ou contra câncer. Também, estas proteínas de fusão que contêm EDA podem servir para a distribuição citossólica de moléculas farmaceuticamente relevantes para células de expressão de TLR4. Adicionalmente, a capacidade da EDA para induzir maturação *in vivo* de células dendríticas permite o seu uso como um adjuvante em formulações que contêm um antígeno contra o qual se deseja produzir uma resposta imunogênica, abrindo o espectro de possibilidades para o uso de EDA no desenvolvimento de vacinas.

Exemplo 3. A proteína EDA pode ser usada como um veículo para transportar antígenos de pelo menos 390 aminoácidos.

3.1 Materiais e métodos.

3.1.1 Expressão de proteínas recombinantes EDA-OVA e EDA-NS3.

Para a construção um plasmídio de Expressão de EDA-OVA, mRNA foi extraído de células de tumor

EG7OVA, que expressam proteína OVA. Depois de transcrição reversa e amplificação por PCR com preparadores GCGGCCGC*AATGGGCTCCATCGGCGCA* (SEQ ID NO: 16) e GCGGCCG-C*AGGGGAAACACATCT* (SEQ ID NO: 17) (as bases sublinhadas foram adicionadas para introduzir a seqüência reconhecida pela enzima NotI de restrição, enquanto que a seqüência em itálico pertence ao início e final de ovalbumina). O produto PCR foi clonado em pCR2.1-TOPO utilizando-se o kit TOPO TA (Invitrogen), digerido com NotI e subclonados em plasmídio pET20EDA 1.2 (que expressa proteína EDA) previamente digerida com NotI. A orientação correta da construção foi verificada por seqüenciação. Depois de indução de *E. coli* transformado com as culturas de plasmídio, a proteína de fusão presente na fração solúvel foi purificada por afinidade cromatográfica (Histrap, Pharmacia) utilizando-se uma plataforma FPLC (AKTA, Pharmacia). A proteína foi dessalinizada com colunas de dessalinização Hitrap (Pharmacia), e foi concentrada com o dispositivo de filtro por centrifugação Amicon Ultra 4-5000 MWCO (Millipore Carrighwahill, Ireland). O vetor de proteína recombinante foi purificado utilizando-se colunas de endotoxina Endotrap (Profos Ag, Regensburg, Germany), até os níveis de endotoxina se encontrarem abaixo de 0,2 EU/μg de proteína (medidos por ensaio de LAL, Cambrex). Para a construção de proteína EDA-NS3 seguiu-se uma estratégia de construção similar utilizando-se preparadores A***GCGGCCGC***AGCCACCATGGCGCCTATCACGGCCTATTC (SEQ ID NO: 18)

e A***GCGGCCGC***TTGCGGTACGGCCGGAGGGGATGAGTT (SEQ ID NO: 19) que permitem a expressão do fragmento amino-terminal da proteína NS3 (aminoácidos 1026-1221). Em contraste à proteína EDA-OVA que foi extraída a partir da fração solúvel das frações de *E. coli*, no caso da proteína EDA-NS3, a proteína foi purificada a partir de corpos de inclusão previamente dissolvidos em 8M uréia. Depois de uma cromatografia de afinidade utilizando-se colunas Histrap, realizou-se uma cromatografia de permuta iônica (DEAE-sefarose). A fração purificada proveniente desta segunda cromatografia foi redobrada seguindo-se um protocolo de redobramento em uma coluna G25. Uma vez redobrada, a coluna EDA-NS3 foi dessalinizada e purificada de endotoxinas utilizando-se colunas Endotrap (Profos, Germany).

As proteínas assim purificadas foram analisadas por SDS-PAGE.

3.1.2 Estudos *In vitro* studies para avaliar a capacidade de apresentação de antígeno.

Avaliou-se a capacidade da EDA-OVA ser capturada por APC e subseqüente apresentação de CTL epítope processed SIINFEKL para linfócitos T proveniente de camundongos transgênicos OT-1. Medula óssea-derivada de células dendríticas (10^5 células/cavidade) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de EDA-OVA, EDA + OVA (vinculação de forma não-covalente), OVA ou EDA. 12 h depois adicionaram-se 10^5

células/cavidade de células não-aderentes provenientes de camundongos transgenicos OT-1. 24 horas a partir do início da cultura o sobrenadante foi extraído para quantificação de IFN-γ segregado por um ensaio ELISA comercial.

3.1.3 Medição de indução *in vivo* de células de produção de linfócitos T citotóxicos (CTL) e IFN-γ depois de imunização.

Camundongos C57BL6 ou HHD (transgênicos para molécula HLA-A2.1) foram imunizados i.v. com 50 μg de EDA-OVA ou EDA-NS3, respectivamente, nos dias 0 e 10. No dia 20, os camundongos foram sacrificados para se determinar a resposta CTL contra SIINFEKL ou contra peptídio NS3 1073. Esplenócitos provenientes de animais imunizados foram cultivados na presença de 0,1 μg/ml de SIINFEKL ou 1 μg/ml de NS3 1073 a 5 x 10^6 células/ml (10 ml) durante 5 dias em meio completo. No 5° dia, as células foram colhidas para ensaios de liberação de cromo. A atividade lítica foi medida por incubação durante 4 horas de diferentes quantidades de células de órgão motor com 1x 10^4 de células EL-4 alvo previamente carregadas com ^{51}Cr e com ou sem peptídio. A percentagem de lise específica foi calculada de acordo com a fórmula: (cpm experimental - cpm espontâneo)/(cpm máximo - cpm espontâneo) x 100, onde lise espontâneo corresponde às células alvo incubadas na ausência de células de órgão motor e lise máximo é obtido

por incubação de celulas alvo com 5% Triton x100.

Para medir a produção de IFN-γ em resposta aos diferentes peptídios, esplenócitos provenientes de camundongos imunizados foram chapeados em placas de 96 cavidades sob 8 x 10^5 células/cavidade, somente com meio completo sozinho, ou com 30 μM de peptídeos NS3 1038-1046 (SEQ ID NO: 23), 1073-1081 (SEQ ID NO: 20, CVNGVCWTV), 1169-1177 (SEQ ID NO: 22), ou com 1 μg/ml de recombinante NS3 in a final volume de 0.25 ml. Sobrenadantes (50 μl) foram removidos 48 horas depois e a IFN-γ foi medida por ELISA (Pharmingen, San Diego, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.1.4 Proteção contra infecção por vírus de enfermidade vHCV 1-1031 que expressa poliproteína de vírus de hepatite C.

C57BL/6 foram imunizados nos dias 1 e 10 com 1 x 10^6 de medula óssea-derivada de células dendríticas pulsadas com proteína EDA-NS3. Dez dias depois da segunda imunização, os camundongos foram infectados via i.p. com 5 x 10^6 pfu de recombinante vírus de enfermidade vHCV 1-1031. Três dias depois da infecção, os animais foram sacrificados e a carga viral/mg de tecido ovariano foi quantificada por um ensaio de quantificação de unidade de formação de placa baseada no uso de linha de células CBSC-1.

3.2 Resultados.

3.2.1 Expressão e purificação de proteínas EDA-OVA e

EDA-NS3 p.

Tal como indicado na seção Materiais e métodos, EDA-OVA ou EDA-NS3 foram purificados a partir de extratos de *E. coli* transformados utilizando-se a fração solúvel no caso de EDA-OVA e forma corpos de inclusão no caso de EDA-NS3. Nas Figuras 10A e 11A está ilustrado o resultado de SDS-PAGE para as duas proteínas. Obtiveram-se bandas simples correspondentes às proteínas de dimensões de 55 kDa e 32 kDa correspondentes, respectivamente, às dimensões esperadas para cada uma destas proteínas.

3.2.2 Vinculação de EDA à proteína OVA aumenta a apresentação de antígeno de IVA aos linfócitos T provenientes de camundongos transgênicos OT-1.

Os inventores analisaram a capacidade de vinculação de EDA à proteína OVA para aumentar a apresentação de antígeno de epítope SIINFEKL a células T específicas para este epítope. Os inventores observaram que as células dendríticas derivadas de medula óssea cultivadas na presença de EDA-OVA estimularam a produção de IFN-γ mais forte por células não-aderentes de camundongos OT-1 do que aquelas induzidas por quantidades equimolares de proteína OVA sozinha (Figura 9B). Os inventores observaram que a produção de IFN-γ também foi aumentada em co-culturas que continham proteína EDA e proteína OVA, quando comparadas à proteína OVA sozinha, sugerindo que a maturação de DC induzida

por EDA pôde aumentar a ativação de células T.

3.2.3. Vinculação de EDA à proteína OVA ou à proteína NS3 aumenta a indução de linfócitos T citotóxicos específicos *in vivo*.

Analizou-se a capacidade de EDA-OVA e EDA-NS3 induzirem uma resposta de CTL contra epítope SIINFEKL ou contra epítope NS3 1073, respectivamente. Os inventores observaram, para a proteína EDA-OVA, que imunização com esta proteína dissolvida em solução salina foi capaz de induzir uma resposta citotóxica contra células alvo incubadas com peptídeo SIINFEKL, que a imunização com proteína OVA sozinha não é capaz de induzir (Figura 9C). Da mesma maneira, imunização de camundongos HHD (transgênicos para HLA-A2.1) com proteína EDA-NS3 induz uma resposta citotáxica efetiva contra células alvo previamente incubadas com peptídeo NS3 1073 (V) (SEQ ID NO: 20, CVNGNCWTV), ou com variante 1073 (L) deste peptídeo (SEQ ID NO: 21, CLNGVCWTV) Figura 11B. Os inventores também observaram que imunização de camundongos HHD com proteína EDA-NS3 induz a ativação de células produtoras de IFNγ específicas para peptídeos NS3 1038 (SEQ ID NO: 23), 1073 (SEQ ID NO: 20, CVNGVCWTV) e 1169 (SEQ ID NO: 22) (Figura 11C). Além disso, a imunização de camundongos com proteína EDA-NS3 induz uma resposta celular citotóxica de longa permanência específica contra peptídeo NS3 1073. Com efeito, quando camundongos imunizados com proteína EDA-

NS3 foram sacrificados 60 dias depois da imunização, os inventores detectaram a presença de CTL específico para este peptídio (Figura 11D).

3.2.4 Imunização de camundongos C57BL/6 com células dendríticas incubadas com proteína EDA-NS3 protege camundongos contra infecção por um vírus de enfermidade que expressa proteínas de vírus da hepatite C.

Os inventores quiseram estudar se a imunização com células dendríticas incubadas *in vitro* com proteína EDA-NS3 era capaz de induzir uma resposta de célula capaz de proteger camundongos contra provocação com um vírus recombinante expressor de proteínas de vírus da hepatite C. Por esta razão, os inventores imunizaram camundongos C57/BL6 com células dendríticas incubadas derivadas de medula óssea com proteína EDA-NS3 ou com células dendríticas que não tinham sido previamente incubadas com qualquer antígeno. Dez dias depois da segunda imunização, os camundongos foram infectados com 5 x 10^6 pfu de vírus recombinante de enfermidade vHCV 1-3011 (um presente gentil do Dr Rice, Washington University School of Medicine, St Louis, MO and described by Grakoui A, et al. J Virol. 1993; 67:1385). Três dias depois a carga viral foi medida nos dois grupos de camundongos. Nesta experiência os inventores observaram que imunização com DC incubada com proteína EDA-NS3 foi capaz de proteger 6% de camundongos contra infecções por vírus de enfermidade recombinante.

3.3. Discussão.

Tal como se encontra ilustrado nos resultados anteriores, a proteína EDA pode servir como um vetor de utilidade para objetivação de epítope de SIINFEKL proveniente da proteína OVA proteína para células expressoras de molécula TLR4 e aumenta a sua imunogenicidade. Para se avaliar a capacidade de EDA aumentar a imunogenicidade de proteínas maiores, os inventores construíram proteínas recombinantes de fusão de EDA-OVA que continham OVA completa (397 aminoácidos) e proteína EDA-NS3 que continha o fragmento com atividade de protease de proteína NS3 a partir de vírus de hepatite C.

Estes resultados demonstram que a proteína de EDA pode agir como um vetor muito eficiente para antígenos maiores visados. Desta forma, os inventores acharam que em ensaios de apresentação de antígeno que a vinculação da OVA ao EDA aumenta a captura de antígeno capture pelas células de apresentação de antígeno, aumentando a ativação de célula T específica. Também, os inventores observaram que imunização com estas proteínas de fusão (EDA-OVA e EDA-NS3) permite a indução de respostas citotóxicas específicas contra estes antígenos. Estas respostas induzidas foram de longa duração. Finalmente, os inventores observaram que a administração da proteína EDA-NS3 com células dendríticas permitem a indução de uma resposta celular protetora contra a infecção por vírus antivariólico que expressa as proteínas de vírus de hepatite C.

Estes dados indicam que a proteína de EDA pode ser um vetor de proteína muito adequado para a indução de respostas celulares contra um antígeno de interesse. A construção das proteínas de fusão baseada em proteína de EDA constitui uma estratégia apropriada nos protocolos de vacinação contra as enfermidades de tumores ou as enfermidades provocadas por agentes infecciosos.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS

<110> PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA S.L.

<120> AGENTES e MÉTODOS BASEADOS NO USO DE DOMÍNIO DE EDA DE FIBRONECTINA

<130> 1.2006.0176/ZAR

<150> ES200501412
<151> 2005-06-13

<160> 23

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1
<211> 348
<212> DNA
<213> Vetor proteináceo recombinante

<400> 1

atgaacattg atcgccctaa aggactggca ttcactgatg tggatgtcga ttccatcaaa 60

attgcttggg aaagcccaca ggggcaagtt tccaggtaca gggtgaccta ctcgagccct 120

gaggatggaa tccgggagct tttccctgca cctgatggtg aagacgacac tgcagagctg 180

cagggcctca ggccggggtc tgagtacaca gtcagtgtgg ttgccttgca cgatgatatg 240

gagagccagc ccctgattgg aatccagtcc acacagcttg agagtataat caactttgaa 300

aaactgactg aatgggcggc cgcactcgag caccaccacc accaccac 348

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> Vetor proteináceo recombinante

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (1)..(116)
<223> Vetor proteináceo recombinante mEDA-SIINFEKL-6xHis (EDA-SIINFEKL), codificado pela seqüência SEQ. ID. NO.: 1

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (2)..(91)
<223> domínio de fibronectina EDA de camundong (mEDA)

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (92)..(105)<223> Peptídio QLE-SIINFEKL-TEW

<220><221> CONDIÇÃO_MISC<222> (111)..(116)<223> Final de histidina 6xHis

<400> 2

Met Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val
1 5 10 15

Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
20 25 30

Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe
35 40 45

Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg
50 55 60

Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met
65 70 75 80

Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Gln Leu Glu Ser Ile
85 90 95

Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Ala Ala Ala Leu Glu His His
100 105 110

His His His His
115

<210> 3
<211> 255
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3

aacattgatc gccctaaagg actggcattc actgatgtgg atgtcgattc catcaaaatt 60

gcttgggaaa gcccacaggg gcaagtttcc aggtacaggg tgacctactc gagccctgag 120

gatggaatcc atgagctatt ccctgcacct gatggtgaag aagacactgc agagctgcaa 180

ggcctcagac cgggttctga gtacacagtc agtgtggttg ccttgcacga tgatatggag 240

agccagcccc tgatt 255

<210> 4
<211> 85
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp

1 5 10 15

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro
35 40 45

Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro
50 55 60

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu
65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Ile
85

<210> 5
<211> 246
<212> DNA
<213> Vetor proteínico recombinante

<400> 5

atgaacattg atcgccctaa aggactggca ttcactgatg tggatgtcga ttccatcaaa 60

attgcttggg aaagcccaca ggggcaagtt tccaggtaca gggcctcagg ccggggtctg 120

agaacacagt cagtgtggtt gccttgcacg atgatatgga gagccagccc ccagcttgag 180

agtataatca actttgaaaa actgactgaa tgggcggtcg cactcgagca ccaccaccac 240

caccac 246

<210> 6
<211> 82
<212> PRT
<213> Vetor proteínico recombinante

<220>
<221> condição_misc
<222> (1)..(82)
<223> Vetor proteínico recombinante mEDAalt-SIINFEKL-6xHis, codificado por seqüência SEQ. ID. NO.: 5

<220>
<221> condição_misc
<222> (2)..(57)
<223> Domínio de fibronectina EDA alternativo de camundongo (mEDAalt), gerado por junção alternativa

<220>
<221> condição_misc
<222> (58)..(71)
<223> Peptídio QLE-SIINFEKL-TEW

<220>
<221> condição_misc
<222> (77)..(82)
<223> Final de histidina

<400> 6

Met Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val
1 5 10 15

Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
20 25 30

Tyr Arg Ala Ser Gly Arg Gly Leu Arg Thr Gln Ser Val Trp Leu Pro
35 40 45

Cys Thr Met Ile Trp Arg Ala Ser Pro Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn
50 55 60

Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Ala Val Ala Leu Glu His His His His
65 70 75 80

His His

<210> 7
<211> 168
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7

aacattgatc gccctaaagg actggcattc actgatgtgg atgtcgattc catcaaaatt 60

gcttgggaaa gcccacaggg gcaagtttcc aggtacaggg cctcagaccg ggttctgagt 120

acacagtcag tgtggttgcc ttgcacgatg atatggagag ccagcccc 168

<210> 8
<211> 56
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
1 5 10 15

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Arg Ala Ser Asp Arg Val Leu Ser Thr Gln Ser Val Trp Leu Pro Cys
35 40 45

Thr Met Ile Trp Arg Ala Ser Pro
50 55

<210> 9
<211> 909
<212> DNA
<213> Vetor proteínico recombinante

<400> 9

atgaacattg atcgccctaa aggactggca ttcactgatg tggatgtcga ttccatcaaa 60

attgcttggg aaagcccaca ggggcaagtt tccaggtaca gggtgaccta ctcgagccct 120

gaggatggaa tccgggagct tttccctgca cctgatggtg aagacgacac tgcagagctg 180

cagggcctca ggccggggtc tgagtacaca gtcagtgtgg ttgccttgca cgatgatatg 240

gagagccagc ccctgattgg aatccagtcc acagcggccg cagccaccat ggcgcctatc 300

acggcctatt cccaacaaac gcggggcctg cttggctgta tcatcactag cctcacaggt 360

cgggacaaga accaggtcga tggggaggtt caggtgctct ccaccgcaac gcaatctttc 420

ctggcgacct gcgtcaatgg cgtgtgttgg accgtctacc atggtgccgg ctcgaagacc 480

ctggccggcc cgaagggtcc aatcacccaa atgtacacca atgtagacca ggacctcgtc 540

ggctggccgg cgccccccgg ggcgcgctcc atgacaccgt gcacctgcgg cagctcggac 600

ctttacttgg tcacgaggca tgccgatgtc attccggtgc gccggcgagg cgacagcagg 660

gggagtctac tctcccctag gcccgtctcc tacctgaagg gctcctcggg tggaccactg 720

ctttgccctt cggggcacgt tgtaggcatc ttccgggctg ctgtgtgcac ccgggggttt 780

gcgaaggcgg tggacttcat acccgttgag tctatggaaa ctaccatgcg gtctccggtc 840

ttcacagaca actcatcccc tccggccgta ccgcaagcgg ccgcactcga gcaccaccac 900

caccaccac 909

<210> 10
<211> 303
<212> PRT
<213> Vetor proteínico recombinante

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (1)..(303)
<223> Vetor proteínico recombinante mEDA-NS3-6xHis (EDA-NS3), codificado por seqüência SEQ. ID. NO.: 9

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (2)..(91)
<223> Domínio de fibronectina EDA de camundongo (mEDA)

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (97)..(292)
<223> NS3 proteína proveniente de vírus de hepatite C

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (298)..(303)
<223> Final de histidina

<400> 10

Met Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val
1 5 10 15

Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
20 25 30

Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe
35 40 45

Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg
50 55 60

Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met
65 70 75 80

Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Ala Ala Ala Ala Thr
85 90 95

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
100 105 110

Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Asp Gly
115 120 125

Glu Val Gln Val Leu Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys
130 135 140

```
Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr
145                 150                 155                 160

Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
                165                 170                 175

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Met Thr
            180                 185                 190

Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
        195                 200                 205

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
225                 230                 235                 240

Leu Cys Pro Ser Gly His Val Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
                245                 250                 255

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Met
            260                 265                 270

Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro
        275                 280                 285

Ala Val Pro Gln Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
    290                 295                 300
```

<210> 11
<211> 1473
<212> DNA
<213> Vetor proteínico recombinante

<400> 11

```
atgaacattg atcgccctaa aggactggca ttcactgatg tggatgtcga ttccatcaaa     60

attgcttggg aaagcccaca ggggcaagtt tccaggtaca gggtgaccta ctcgagccct    120

gaggatggaa tccgggagct tttccctgca cctgatggtg aagacgacac tgcagagctg    180

cagggcctca ggccggggtc tgagtacaca gtcagtgtgg ttgccttgca cgatgatatg    240

gagagccagc ccctgattgg aatccagtcc acagcggccg caatgggctc catcggcgca    300

gcaagcatgg aattttgttt tgatgtattc aaggagctca aagtccacca tgccaatgag    360
```

aacatcttct actgccccat tgccatcatg tcagctctag ccatggtata cctgggtgca 420

aaagacagca ccaggacaca gataaataag gttgttcgct ttgataaact tccaggattc 480

ggagacagta ttgaagctca gtgtggcaca tctgtaaacg ttcactcttc acttagagac 540

atcctcaacc aaatcaccaa accaaatgat gtttattcgt tcagccttgc cagtagactt 600

tatgctgaag agagataccc aatcctgcca gaatacttgc agtgtgtgaa ggaactgtat 660

agaggaggct tggaacctat caactttcaa acagctgcag atcaagccag agagctcatc 720

aattcctggg tagaaagtca gacaaatgga attatcagaa atgtccttca gccaagctcc 780

gtggattctc aaactgcaat ggttctggtt aatgccattg tcttcaaagg actgtgggag 840

aaaacattta aggatgaaga cacacaagca atgcctttca gagtgactga gcaagaaagc 900

aaacctgtgc agatgatgta ccagattggt ttatttagag tggcatcaat ggcttctgag 960

aaaatgaaga tcctggagct tccatttgcc agtgggacaa tgagcatgtt ggtgctgttg 1020

cctgatgaag tctcaggcct tgagcagctt gagagtataa tcaactttga aaaactgact 1080

gaatggacca gttctaatgt tatggaagag aggaagatca aagtgtactt acctcgcatg 1140

aagatggagg aaaaatacaa cctcacatct gtcttaatgg ctatgggcat tactgacgtg 1200

tttagctctt cagccaatct gtctggcatc tcctcagcag agagcctgaa gatatctcaa 1260

gctgtccatg cagcacatgc agaaatcaat gaagcaggca gagaggtggt agggtcagca 1320

gaggctggag tggatgctgc aagcgtctct gaagaattta gggctgacca tccattcctc 1380

ttctgtatca agcacatcgc aaccaacgcc gttctcttct ttggcagatg tgtttcccct 1440

gcggccgcac tcgagcacca ccaccaccac cac 1473

<210> 12
<211> 491
<212> PRT
<213> Vetor proteínico recombinante

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (1)..(491)
<223> Vetor proteínico recombinante mEDA-OVA-6xHis (EDA-OVA), codificado por seqüência SEQ. ID. NO.: 11

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (2)..(91)
<223> Domínio de fibronectina EDA de camundongo (mEDA)

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (95)..(480)
<223> Proteína OVA

<220>
<221> CONDIÇÃO_MISC
<222> (486)..(491)
<223> Final de histidina

<400> 12

Met Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val
1 5 10 15

Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
20 25 30

Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe
35 40 45

Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg
50 55 60

Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met
65 70 75 80

Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Ala Ala Ala Met Gly
85 90 95

Ser Ile Gly Ala Ala Ser Met Glu Phe Cys Phe Asp Val Phe Lys Glu
100 105 110

Leu Lys Val His His Ala Asn Glu Asn Ile Phe Tyr Cys Pro Ile Ala
115 120 125

Ile Met Ser Ala Leu Ala Met Val Tyr Leu Gly Ala Lys Asp Ser Thr
130 135 140

Arg Thr Gln Ile Asn Lys Val Val Arg Phe Asp Lys Leu Pro Gly Phe
145 150 155 160

Gly Asp Ser Ile Glu Ala Gln Cys Gly Thr Ser Val Asn Val His Ser
165 170 175

Ser Leu Arg Asp Ile Leu Asn Gln Ile Thr Lys Pro Asn Asp Val Tyr
180 185 190

Ser Phe Ser Leu Ala Ser Arg Leu Tyr Ala Glu Glu Arg Tyr Pro Ile
195 200 205

```
Leu Pro Glu Tyr Leu Gln Cys Val Lys Glu Leu Tyr Arg Gly Gly Leu
    210                 215                 220

Glu Pro Ile Asn Phe Gln Thr Ala Ala Asp Gln Ala Arg Glu Leu Ile
225                 230                 235                 240

Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Ile Ile Arg Asn Val Leu
                245                 250                 255

Gln Pro Ser Ser Val Asp Ser Gln Thr Ala Met Val Leu Val Asn Ala
            260                 265                 270

Ile Val Phe Lys Gly Leu Trp Glu Lys Thr Phe Lys Asp Glu Asp Thr
        275                 280                 285

Gln Ala Met Pro Phe Arg Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Pro Val Gln
    290                 295                 300

Met Met Tyr Gln Ile Gly Leu Phe Arg Val Ala Ser Met Ala Ser Glu
305                 310                 315                 320

Lys Met Lys Ile Leu Glu Leu Pro Phe Ala Ser Gly Thr Met Ser Met
                325                 330                 335

Leu Val Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu Ser
            340                 345                 350

Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Ser Ser Asn Val Met
        355                 360                 365

Glu Glu Arg Lys Ile Lys Val Tyr Leu Pro Arg Met Lys Met Glu Glu
    370                 375                 380

Lys Tyr Asn Leu Thr Ser Val Leu Met Ala Met Gly Ile Thr Asp Val
385                 390                 395                 400

Phe Ser Ser Ser Ala Asn Leu Ser Gly Ile Ser Ser Ala Glu Ser Leu
                405                 410                 415

Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala
            420                 425                 430

Gly Arg Glu Val Val Gly Ser Ala Glu Ala Gly Val Asp Ala Ala Ser
        435                 440                 445
```

Val Ser Glu Glu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Cys Ile Lys
450 455 460

His Ile Ala Thr Asn Ala Val Leu Phe Phe Gly Arg Cys Val Ser Pro
465 470 475 480

Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
485 490

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Oligonucleotídio sintético

<400> 13

ccatatgaac attgatcgcc ctaaaggact 30

<210> 14
<211> 75
<212> DNA
<213> Oligonucleotídio sintético

<400> 14

agcggccgcc cattcagtca gtttttcaaa gttgattata ctctcaagct gtgtggactg 60

gattccaatc agggg 75

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Oligonucleotídio sintético

<400> 15

agcggccgct gtggactgga ttccaatcag ggg 33

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Oligonucleotídio sintético

<400> 16

gcggccgcaa tgggctccat cggcgca 27

<210> 17
<211> 23
<212> DNA

<213> Oligonucleotídio sintético

<400> 17

gcggccgcag gggaaacaca tct 23

<210> 18
<211> 39
<212> DNA
<213> Oligonucleotídio sintético

<400> 18

agcggccgca gccaccatgg cgcctatcac ggcctattc 39

<210> 19
<211> 36
<212> DNA
<213> Oligonucleotídio sintético

<400> 19

agcggccgct tgcggtacgg ccggagggga tgagtt 36

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Peptídio sintético

<400> 20

Cys Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Peptídio sintético

<400> 21

Cys Leu Asn Gly Val Cys Trp Thr Val
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Peptídio sintético

<400> 22

Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Peptídio sintético

<400> 23

Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser
1 5

REIVINDICAÇÕES

1 - Uso de um polipeptídio que compreende a seqüência de aminoácidos selecionada entre:

a) domínio EDA de fibronectina (EDA), ou

b) um fragmento do dito domínio de EDA capaz de ligação a TLR4, ou

c) uma variante do dito domínio ou fragmento de EDA capaz de ligação a TLR4 e com mais de 70% de homologia com quaisquer formas ou fragmentos naturais de domínio de EDA

caracterizado pelo fato de ser usado na manufatura de uma composição farmacêutica estimuladora de uma resposta imune específica de antígeno.

2 - Uso de um polipeptídio, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de se destinar à manufatura de uma composição farmacêutica estimuladora de uma resposta imune para o tratamento e profilaxia de uma enfermidade infecciosa, de tumor ou alérgica.

3 - Uso de um polipeptídio, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a dita composição farmacêutica se destina ao tratamento e profilaxia de uma enfermidade infecciosa.

4 - Uso de um polipeptídio, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a dita composição farmacêutica se destina ao tratamento e profilaxia de hepatite C.

5 - Uso de um polipeptídio, de acordo com

a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a dita composição farmacêutica se destina ao tratamento e profilaxia de uma enfermidade de tumor.

6 - Uso de um polipeptídio, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a dita composição farmacêutica se destina ao tratamento e profilaxia de uma enfermidade alérgica.

7 - Uso de um polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o fragmento correspondente ao domínio de EDA compreende uma seqüência selecionada a partir de:

a) aminoácidos 2-91 da SEQ. ID. NO: 2;

b) SEQ. ID. NO: 4; e

c) um fragmento das seqüências a) e b) capaz de ligar células expressoras de TLR4.

8 - Uso de um polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o fragmento correspondente ao domínio de EDA compreende uma seqüência selecionada a partir de:

a) aminoácidos 2-57 da SEQ. ID. NO: 6;

b) SEQ. ID. NO: 8; e

c) um fragmento das seqüências a) e b) capaz de ligar células expressoras de TLR4.

9 - Uso de um polipeptídio, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado pelo fato** de que a dita composição farmacêutica compreende ainda uma ou mais moléculas de interesse selecionadas a partir de: um antígeno, um epítope, e um alérgeno.

10 - Uso de um polipeptídio, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o dito polipeptídio é encadeado à dita molécula de interesse.

11 - Uso de um polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 e 10, caracterizado pelo fato de que o dito antígeno é selecionado a partir de um antígeno viral, um antígeno fúngico, um antígeno bacteriano, e um antígeno parasítico.

12 - Uso de um polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 e 10, **caracterizado** pelo fato de que o dito antígeno é um antígeno viral proveniente de vírus da hepatite C.

13 - Uso de um polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicaçõe**s** 9 e 10, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno é selecionado a partir de um antígeno de tumor e uma determinante antigênica de tumor.

14 - Uso de um polipeptídio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 e 10, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de interesse é um alérgeno.

15 - Vetor proteínico, **caracterizado** pelo fato de compreender um polipeptídio cuja seqüência de

aminoácidos é selecionada a partir de:

a) domínio EDA de fibronectina (EDA),

b) um fragmento do dito domínio de EDA capaz de ligação a TLR4, ou

c) uma variante do dito domínio ou fragmento de EDA capaz de ligação a TLR4 e com mais de 70% de homologia com qualquer forma ou fragmento natural do dito domínio de EDA:

ligado a uma molécula de interesse selecionada a partir de: um antígeno, um epítope, e um alérgeno.

16 - Vetor proteínico, conforme descrito na reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que a dita molécula de interesse é selecionada a partir de um antígeno viral, um antígeno fúngico, um antígeno bacteriano, e um antígeno parasítico.

17 - Vetor proteínico, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a dita molécula de interesse é um antígeno viral proveniente do vírus de hepatite C.

18 - Vetor proteínico de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno viral de hepatite C é a proteína NS3 ou um fragmento antigênico da dita proteína.

19 - Vetor proteínico, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que a dita seqüência de aminoácidos é SEQ ID NO: 10.

20 - Vetor proteínico, de acordo com a

reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que a dita molécula de interesse é selecionada a partir de um antígeno tumoral e de uma determinante antigênica tumoral.

21 - Vetor proteínico, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que a dita molécula de interesse é um alérgeno.

22 - Vetor proteínico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 21, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir dos aminoácidos 2-91 da SEQ ID NO: 2 ou aminoácidos 2-57 da SEQ ID NO: 6.

23 - Ácido nucléico modificado, **caracterizado** pelo fato de que ele codifica um vetor proteínico conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 15 a 22.

24 - Ácido nucléico modificado, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que também compreende uma seqüência de controle encadeada operacionalmente reguladora de expressão do vetor proteínico.

25 - Ácido nucléico modificado, de acordo com as reivindicações 23 ou 24, **caracterizado** pelo fato de que compreende a SEQ. ID. NO: 1, ou SEQ ID. NO: 5.

26 - Ácido nucléico modificado, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, **caracterizado** pelo fato de ser compreendido pela SEQ ID NO: 9.

27 - Vetor de expressão para a expressão

de gene de um vetor proteínico conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 15 a 22, **caracterizado** pelo fato de que o dito vetor de expressão compreende um ácido nucléico modificado definido em qualquer uma das reivindicações 23 a 26.

28 - Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que o dito vetor é um vetor viral.

29 - Célula hospedeira de expressão, **caracterizada** pelo fato de compreender um ácido nucléico modificado conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 23 a 26, ou um vetor de expressão definido nas reivindicações 27 ou 28.

30 - Célula hospedeira de expressão, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizada** pelo fato de que a dita célula de expressão de hospedeira é *Escherichia coli*.

31 - Método para produzir um vetor proteínico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 22, **caracterizado** pelo fato de compreender cultivar uma célula de expressão de hospedeira definida nas reivindicação 29 ou 30 sob condições que permitem a produção do dito vetor proteínico e recuperação do mesmo.

32 - Uso de um ácido nucléico modificado, conforme descrito em qualquer uma das reivindicações 23 a 26, um vetor de expressão definido nas reivindicações 27 a 28, ou uma célula hospedeira definida nas reivindicações 29 ou 30, **caracterizado** por ser usado na pre-

paração de uma composição farmacêutica estimuladora de uma imuno resposta específica de antígeno para o tratamento e profilaxia de uma enfermidade infecciosa, de tumor, ou alérgica.

33 - Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de compreender pelo menos um carreador farmaceuticamente aceitável, e pelo menos um dos seguintes componentes:

i) um vetor proteínico definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 22;

ii) um ácido nucléico modificado definido em qualquer uma das reivindicações 23 a 26;

iii) um vetor de expressão que compreende o dito ácido nucléico modificado definido nas reivindicações 27 a 28; ou

iv) uma célula hospedeira de expressão que também compreende o dito ácido nucléico modificado definido nas reivindicações 29 ou 30.

34 - Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de compreender uma quantidade de células dendríticas, em que as ditas células dendríticas foram incubadas *in vitro* com pelo menos um dos seguintes componentes:

i) um vetor proteínico definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 22;

ii) um ácido nucléico definido em qualquer uma das reivindicações 23 a 26; ou

iii) um vetor de expressão que compreende o dito

ácido nucléico definido nas reivindicações 27 a 28.

35 - Composição farmacêutica, de acordo com as reivindicações 33 ou 34, **caracterizada** pelo fato de que a composição é uma vacina ou uma composição imuno-terapêutica.

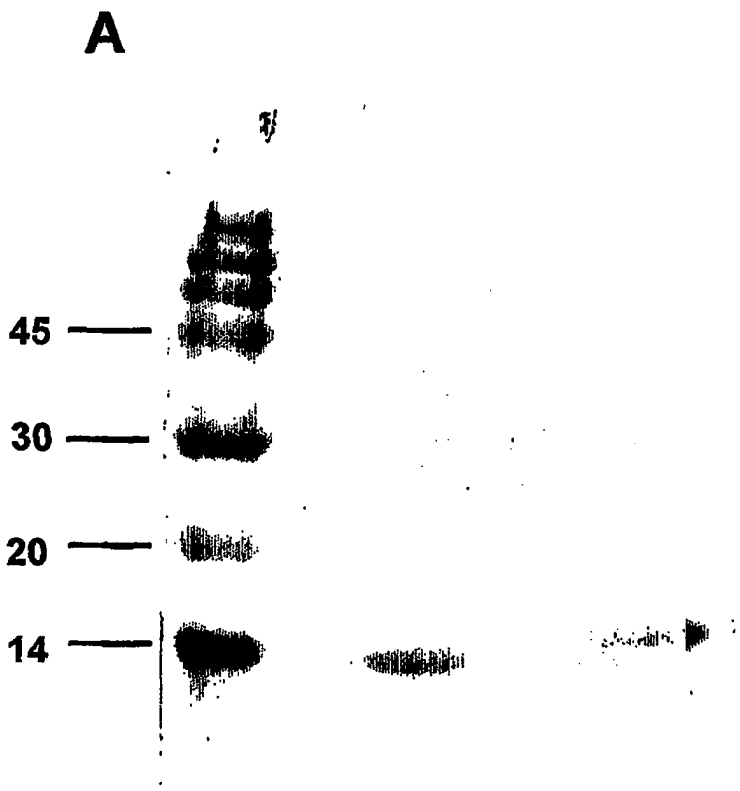


Figura 1

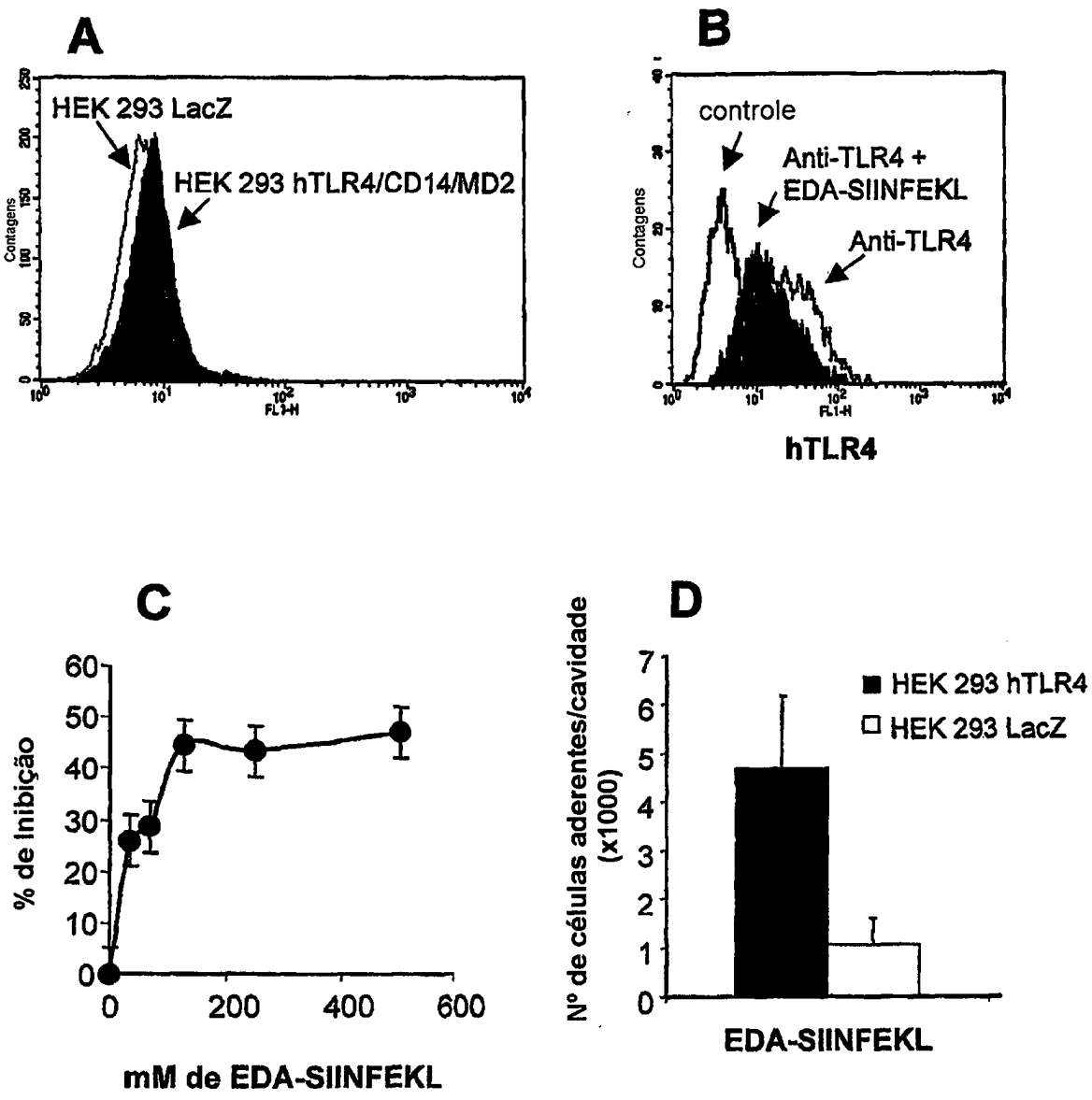

A
HEK 293 LacZ
HEK 293 hTLR4/CD14/MD2
Contagens
FL1-H
B
controle
Anti-TLR4 +
EDA-SIINFEKL
Anti-TLR4
Contagens
FL1-H
hTLR4
C
% de Inibição
mM de EDA-SIINFEKL
D
Nº de células aderentes/cavidade
(x1000)
HEK 293 hTLR4
HEK 293 LacZ
EDA-SIINFEKL

Figura 2

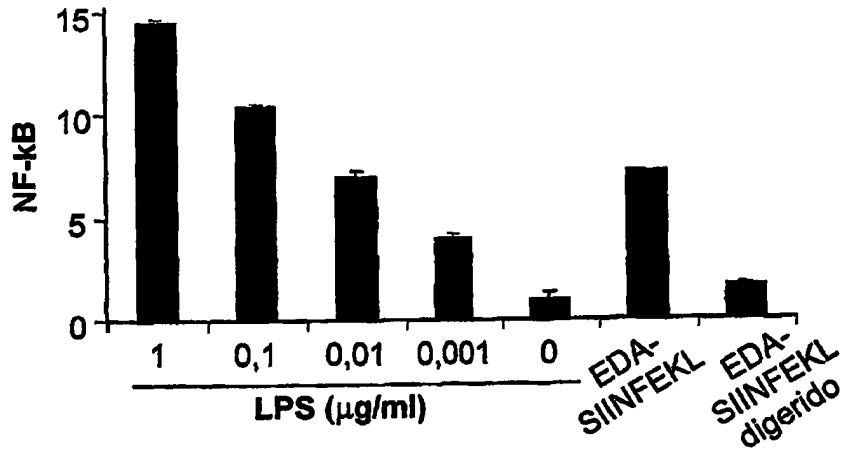


Figura 3

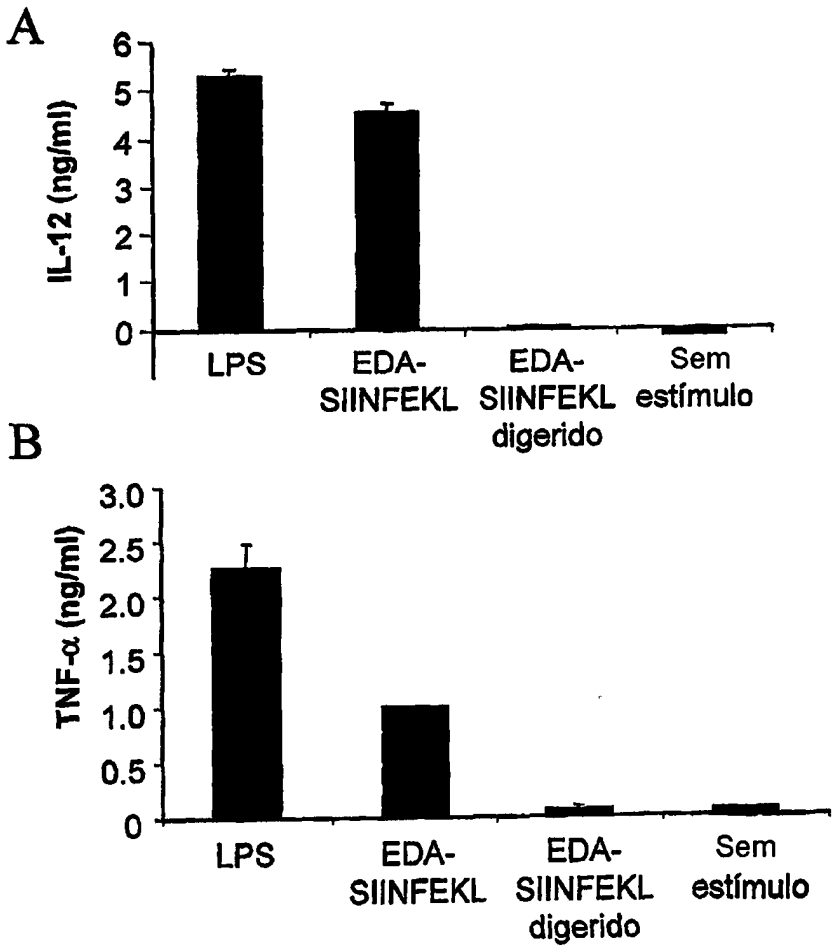


Figura 4

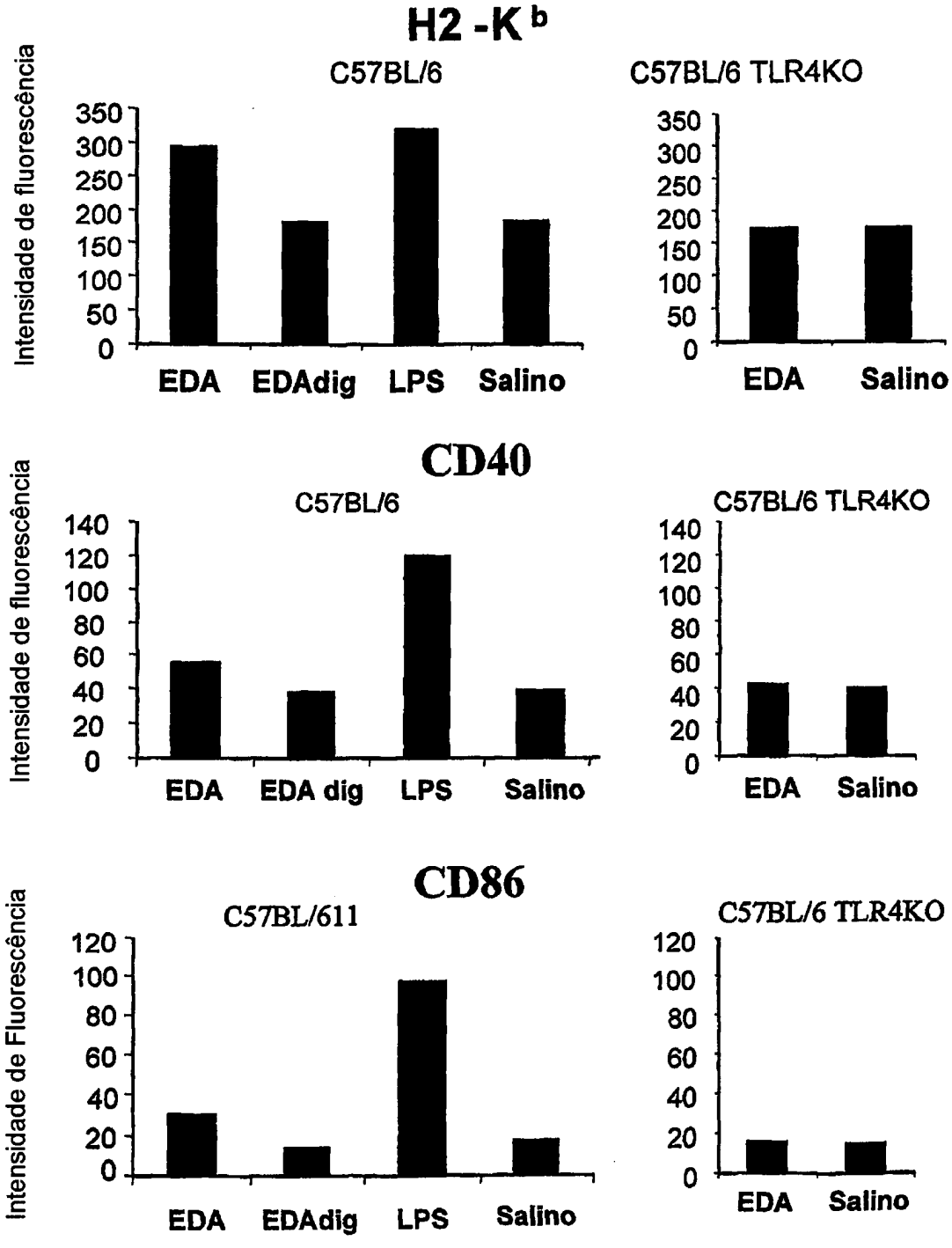
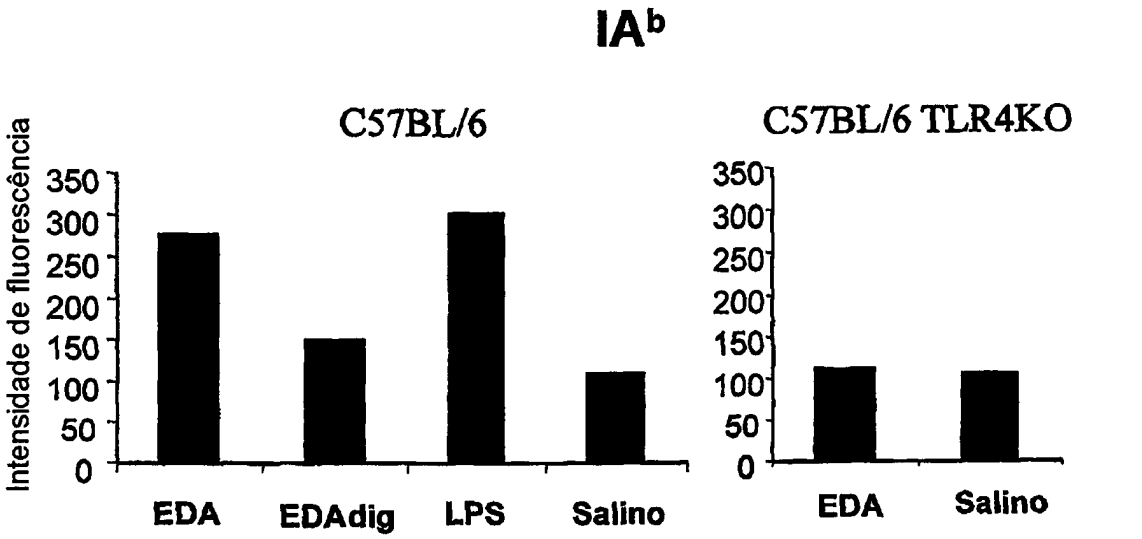

H2 -K b
C57BL/6
C57BL/6 TLR4KO
Intensidade de fluorescência
350
300
250
200
150
100
50
0
EDA
EDAdig
LPS
Salino
CD40
C57BL/6
C57BL/6 TLR4KO
Intensidade de fluorescência
140
120
100
80
60
40
20
0
EDA
EDA dig
LPS
Salino
CD86
C57BL/611
C57BL/6 TLR4KO
Intensidade de Fluorescência
120
100
80
60
40
20
0
EDA
EDAdig
LPS
Salino

Figura 5A


IA^b
C57BL/6
C57BL/6 TLR4KO
Intensidade de fluorescência
350
300
250
200
150
100
50
0
EDA
EDAdig
LPS
Salino
EDA
Salino

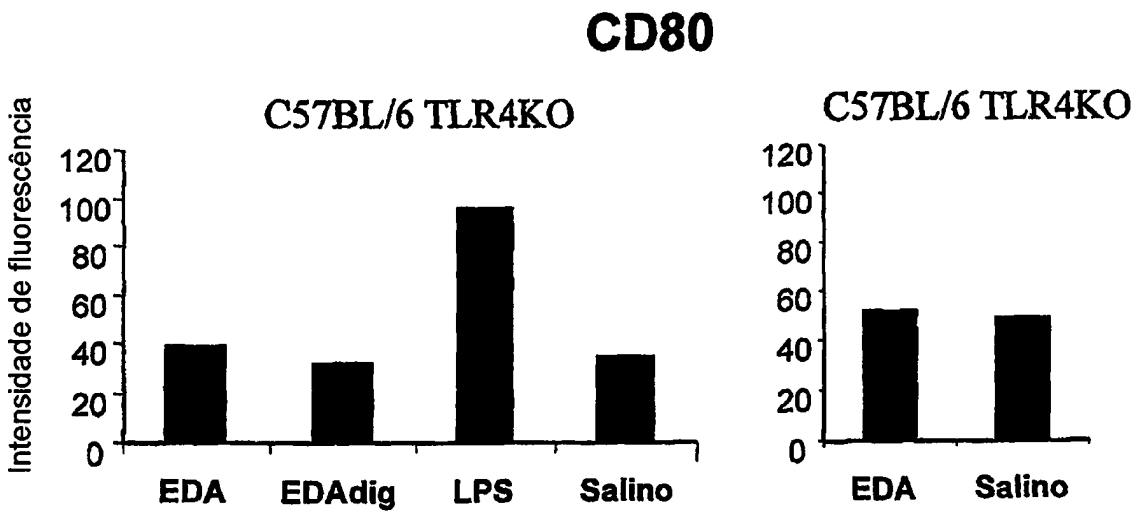

CD80
C57BL/6 TLR4KO
C57BL/6 TLR4KO
Intensidade de fluorescência
120
100
80
60
40
20
0
EDA
EDAdig
LPS
Salino
EDA
Salino

Figura 5B

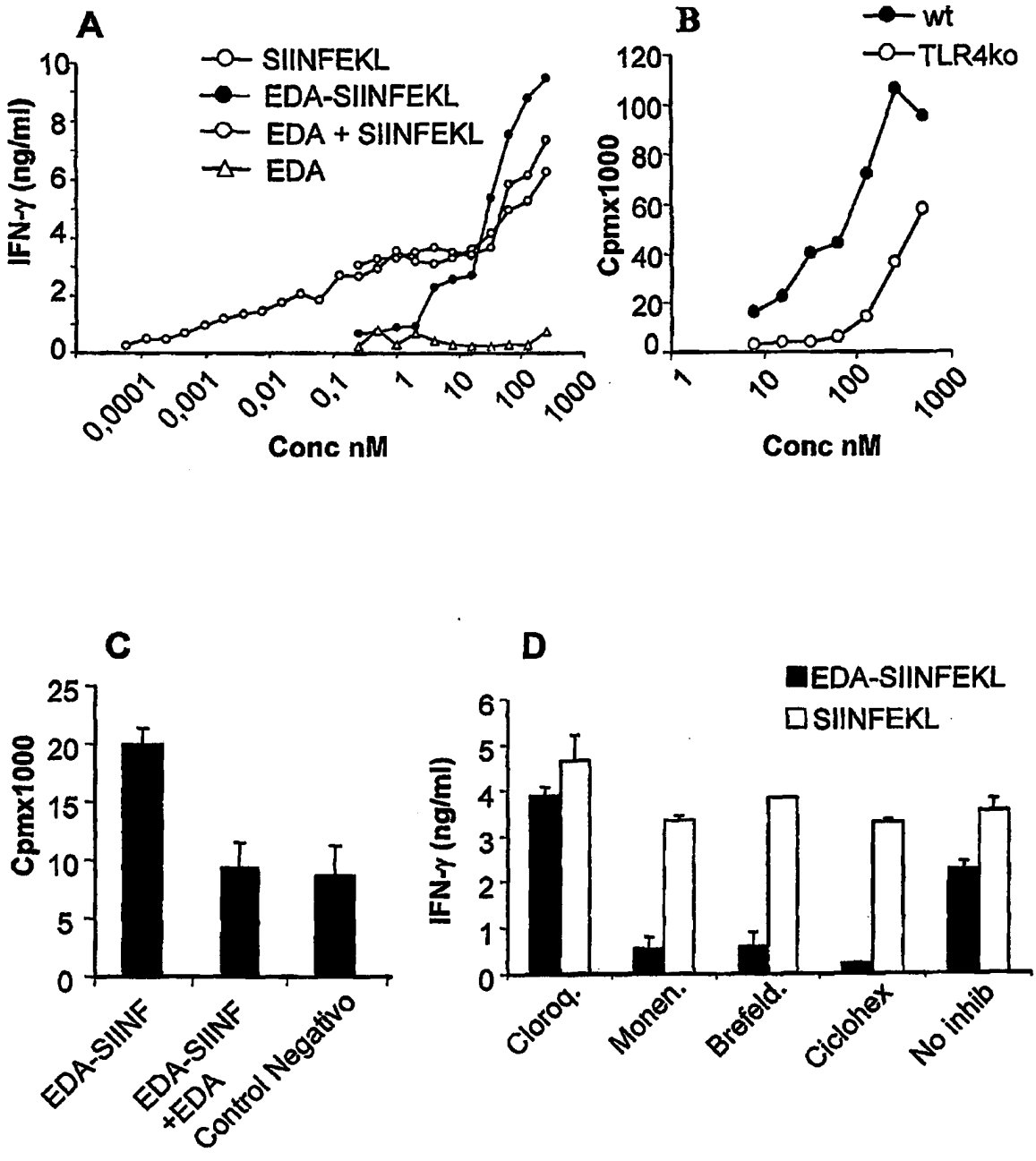

A
SIINFEKL
EDA-SIINFEKL
EDA + SIINFEKL
EDA
IFN-γ (ng/ml)
Conc nM
B
wt
TLR4ko
Cpmx1000
Conc nM
C
Cpmx1000
EDA-SIINF
EDA-SIINF +EDA
Control Negativo
D
EDA-SIINFEKL
SIINFEKL
IFN-γ (ng/ml)
Cloroq.
Monen.
Brefeld.
Ciclohex
No inhib

Figura 6

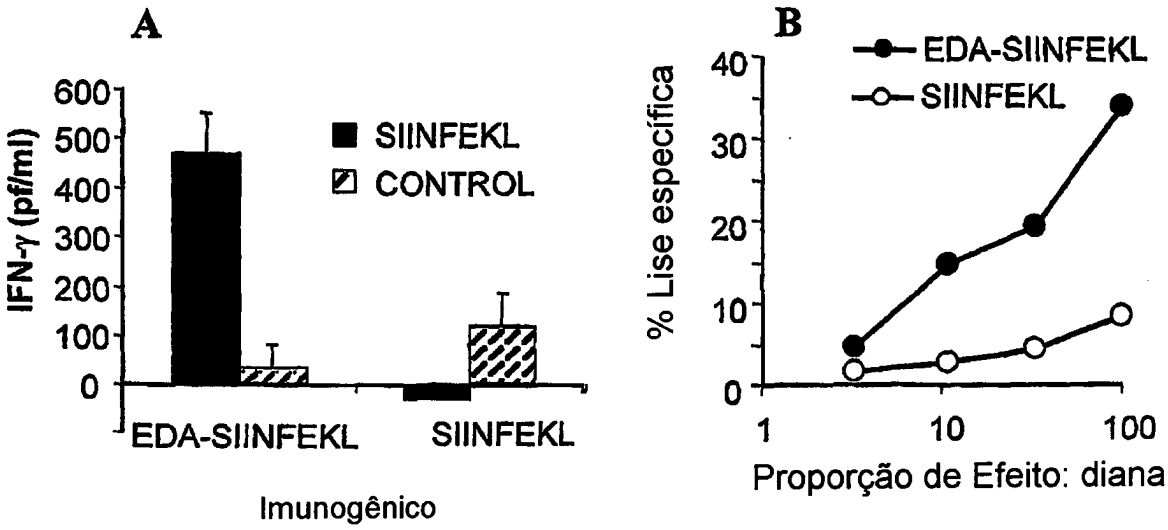


Figura 7

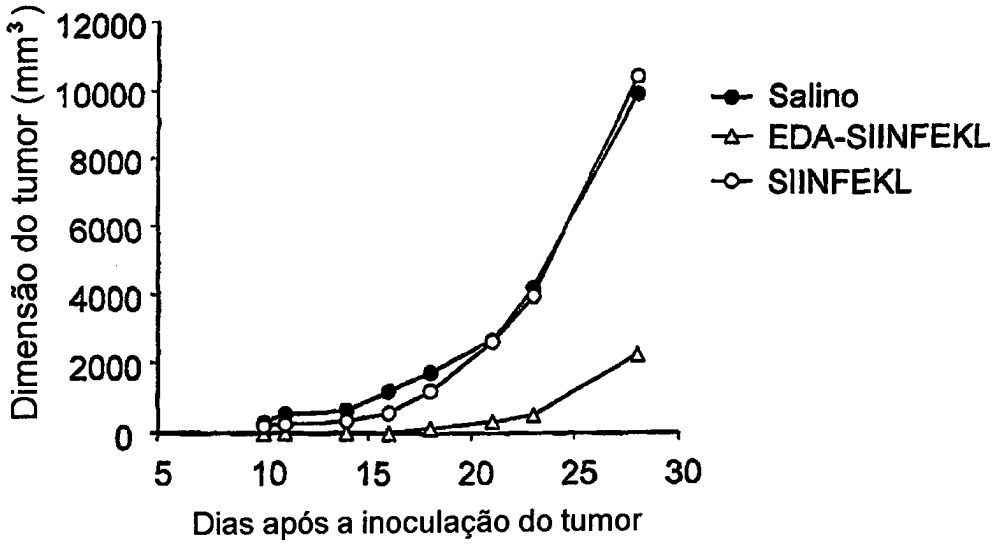


Figura 8

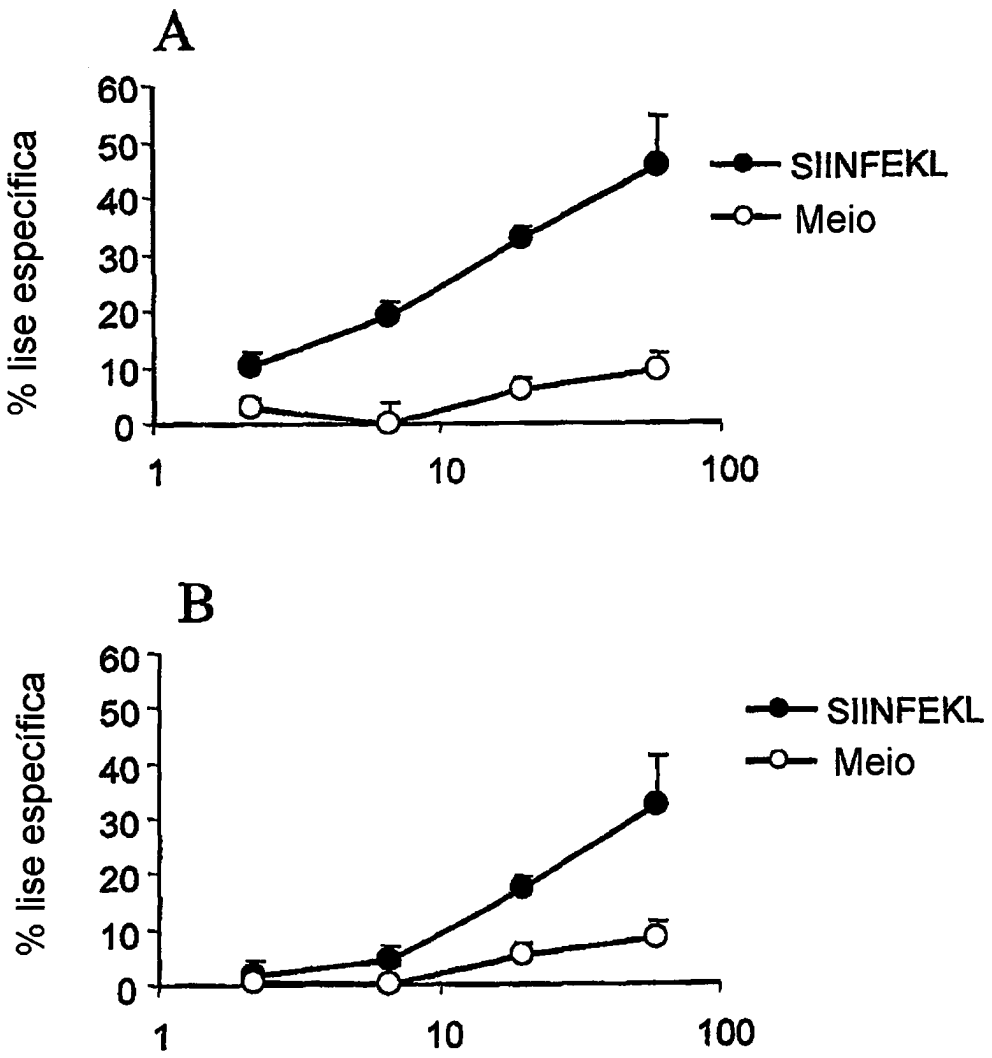

A
% lise específica
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
SIINFEKL
Meio
B
% lise específica
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
SIINFEKL
Meio

Figura 9

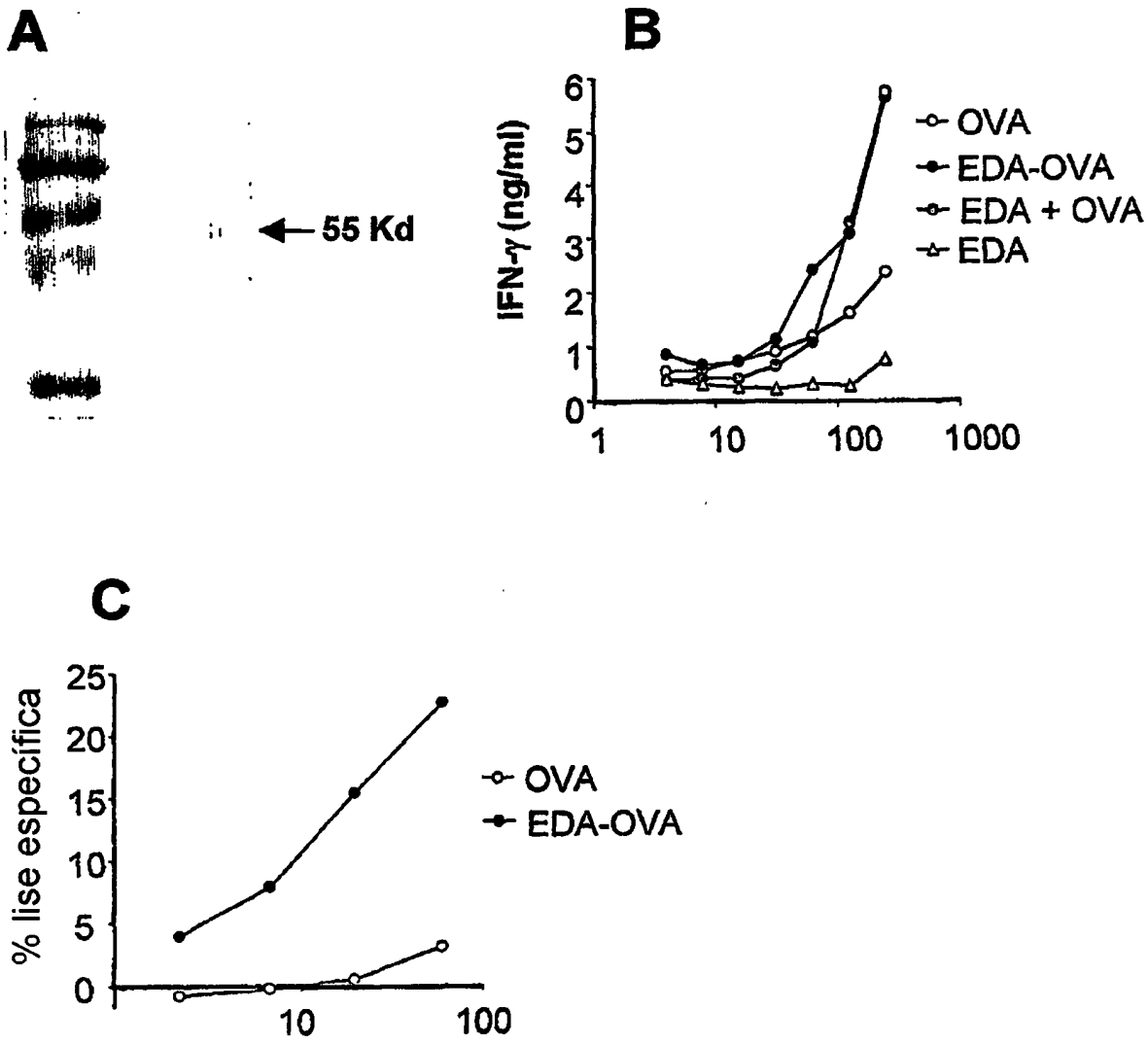

A
55 Kd
B
IFN-γ (ng/ml)
6
5
4
3
2
1
0
1
10
100
1000
OVA
EDA-OVA
EDA + OVA
EDA
C
% lise específica
25
20
15
10
5
0
10
100
OVA
EDA-OVA

Figura 10

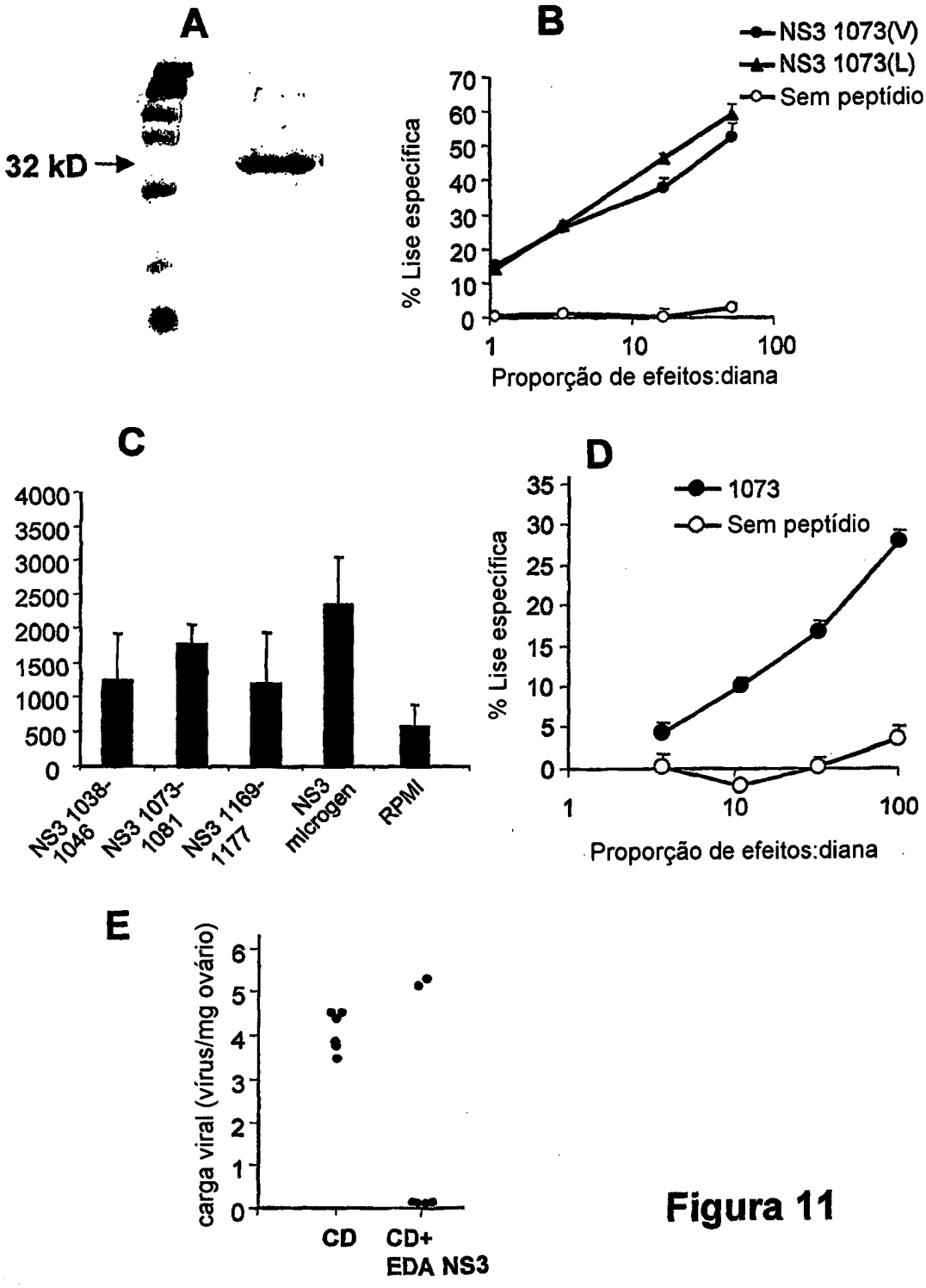

A
32 kD
B
NS3 1073(V)
NS3 1073(L)
Sem peptídio
% Lise específica
Proporção de efeitos:diana
C
IFN-γ (pg/ml)
NS3 1038-1046
NS3 1073-1081
NS3 1169-1177
NS3 microgen
RPMI
D
1073
Sem peptídio
% Lise específica
Proporção de efeitos:diana
E
carga viral (vírus/mg ovário)
CD
CD+ EDA NS3

Figura 11

PI 0611782-1

RESUMO

USO DE UM POLIPEPTÍDIO, VETOR PROTEÍNICO, USO DO MESMO, ÁCIDO NUCLÉICO MODIFICADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA DE EXPRESSÃO, MÉTODO PARA PRODUZIR UM VETOR PROTEÍNICO, USO DE UM ÁCIDO NUCLÉICO MODIFICADO E DE UM POLIPEPTÍDIO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

Refere-se a presente invenção ao uso de um polipeptídio na produção de um agente imunoestimulador, o dito polipeptídio compreendendo uma seqüência correspondente ao domínio de fibronectina de EDA, um fragmento do domínio de EDA que pode ligar-se a TLR4 ou uma variante do dito domínio de EDA ou um fragmento que pode ligar-se ao TLR4 e que tem uma homologia de mais de 70% com qualquer forma ou fragmento natural do domínio de EDA. A invenção também se refere aos métodos de produção e aplicações do dito agente.