



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112013028892-2 B1**



**(22) Data do Depósito:** 11/05/2012

**(45) Data de Concessão:** 15/06/2021

**(54) Título:** PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À BIOTINA MODIFICADA, PROTEÍNAS DE FUSÃO DA MESMA E APLICAÇÕES

**(51) Int.Cl.:** A61K 31/00; A61K 39/085; A61P 37/02; A61K 38/00; A61P 31/00; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 08/03/2012 US 61/608,168; 11/05/2011 US 61/484,934; 13/03/2012 US 61/609,974.

**(73) Titular(es):** CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION.

**(72) Inventor(es):** RICHARD MALLEY; YINGJIE LU; FAN ZHANG.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2012037541 de 11/05/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2012/155053 de 15/11/2012

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 08/11/2013

**(57) Resumo:** PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À BIOTINA MODIFICADA, PROTEÍNAS DE FUSÃO DA MESMA E APLICAÇÕES. A descrição provê proteínas de ligação à biotina modificadas que podem ser expressadas em forma solúvel com um rendimento elevado em bactérias. Também são providas proteínas de fusão compreendendo a proteína de ligação à biotina modificada e um antígeno. A descrição ainda provê variantes não hemolíticas de alfa-hemolisina de *S. aureus* e proteína de fusão compreendendo variante não hemolítica de alfa-hemolisina e domínios de ligação de biotina. As composições imunogênicas compreendendo as proteínas são também descritas e o uso de tais composições imunogênicas para induzir uma resposta imune ou para vacinação de um indivíduo são também descritos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: "PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À BIOTINA MODIFICADA, PROTEÍNAS DE FUSÃO DA MESMA E APLICAÇÕES".

#### PEDIDOS RELACIONADOS

5 O pedido reivindica benefício sob 35 USC § 119 (e) dos Pedidos Provisórios US 61/484.934 depositado em 11 de maio de 2011, US 61/608.168 depositado em 8 de março de 2012, e US 61/609.974 depositado em 13 de março de 2012, sendo o conteúdo de cada incorporado aqui integralmente por  
10 referência.

#### **CAMPO TÉCNICO**

A presente descrição refere-se a proteínas de ligação à biotina e proteínas de fusão/composições compreendendo tais proteínas de ligação de biotina. São aqui também  
15 descritos métodos para a expressão de proteínas de ligação à biotina e/ou as proteínas de fusão das mesmas em alto rendimento e solúvel em bactérias.

#### **ANTECEDENTES**

20 A proteína de ligação à biotina e seus derivados podem ser amplamente usados em várias aplicações. No entanto, produção ou purificação das proteínas recombinantes de ligação de biotina pode ser muito difícil. Quando expressadas em *E. coli*, a maioria das proteínas de ligação à biotina tende a se acumular em corpos de inclusão, a

desnaturação, a reduplicação e processamento a jusante  
tedioso são requeridos na preparação de proteínas ativas.  
Expressão em *E. coli* é preferível por causa do baixo custo  
de produção e o potencial para posterior engenharia, assim,  
5 proteínas de ligação de biotina, que podem ser  
eficientemente produzidas em *E. coli*, é muito procurado.  
Além disso, a expressão em *E. coli* também proporciona a  
possibilidade de gerar proteínas de fusão recombinantes  
contendo a proteína de ligação de biotina, para várias  
10 aplicações.

Portanto, existe a necessidade na arte de proteínas de  
ligação à biotina e de proteínas de fusão contendo  
proteínas de ligação de biotina, que podem ser expressadas  
em forma solúvel em elevados rendimentos em *E. coli*.

## 15 SUMÁRIO

Um dos objetivos da presente descrição é fornecer uma  
proteína recombinante de ligação de biotina, que pode ser  
expressadas em forma solúvel em elevados rendimentos em *E.*  
*coli*. Portanto, a presente descrição fornece proteínas de  
20 ligação à biotina e composições compreendendo as mesmas. Em  
algumas formas de realização, a proteína recombinante de  
ligação de biotina compreende uma sequência de sinal de *E.*  
*coli* fusionada com o terminal N de uma sequência de  
aminoácidos compreendendo aminoácidos 45-179

(FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLT  
 GRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQG  
 QDTFQYVPTTENKSLKLD, SEQ ID NO: 1) de Rhizavidina de tipo  
 selvagem (rhavi). Em algumas formas de realização, a  
 5 sequência de sinal de *E. coli* é MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID  
 No: 2). A sequência de sinal pode ser fusionada com a  
 sequência compreendendo aminoácidos 45-179 de rhavi tipo  
 selvagem por um ligador de peptídeo flexível.

Aqui também é provido um método de expressar uma  
 10 proteína de ligação à biotina em forma solúvel com um  
 rendimento elevado em *E. coli*. Em algumas formas de  
 realização, o método compreendendo expressar uma proteína  
 de ligação à biotina em *E. coli*, em que a sequência de  
 sinal nativo da proteína de ligação à biotina foi  
 15 substituída por uma sequência de sinal de *E. coli*. Em  
 algumas formas de realização, a sequência de sinal é  
 MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID No: 2)

Em ainda outro aspecto, a invenção fornece proteínas  
 de fusão de ligação de biotina, compreendendo um domínio de  
 20 ligação de biotina e uma proteína ou um peptídeo.

Em outro aspecto, é aqui fornecida uma proteína de  
 ligação à biotina lipídada. Como aqui usado, o termo  
 "proteína de ligação à biotina lipídada" refere-se a uma  
 proteína de ligação à biotina que é covalentemente ligada a



um lipídeo. As proteínas de ligação à biotina lipídada são ligandos ou agonistas de receptor de tipo Toll 2. Portanto, também são aqui providos métodos para indução de uma resposta imune no indivíduo. O método compreende a administração ao indivíduo de uma composição compreendendo uma proteína de ligação à biotina lipídada.

Aqui é também provido um método de expressar uma proteína de ligação à biotina lipídada em *E. coli*. Em algumas formas de realização, o método compreende a expressão de uma proteína de ligação à biotina lipídada em *E. coli*, em que a sequência de sinal nativa da proteína de ligação à biotina foi substituída por uma sequência de sinal de *E. coli* contendo um motivo de lipidação. Em algumas formas de realização, a sequência de sinal é MKKVAAFVALSLLMAGC (SEQ ID No: 3)

Em ainda outro aspecto, é aqui provido um derivado não hemolítica de alfa-hemolisina de *Staphylococcal aureus* (Hla). O derivado de Hla aqui descrito pode estar na forma de uma proteína de fusão, em que a proteína de fusão compreende o domínio derivado de Hla e um domínio de ligação de biotina. Em algumas formas de realização deste aspecto, o domínio de ligação de biotina é uma proteína de ligação à biotina aqui descrita.

Como as proteínas de ligação à biotina lipídada, as

variantes de Hla ou suas proteínas de fusão com proteínas de ligação à biotina aqui descritas são também ligandos ou agonistas de receptores do tipo Toll ou outros receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Portanto, aqui também  
5 são providos métodos para a indução de uma resposta imune no indivíduo. Em algumas formas de realização, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma composição compreendendo um variantes Hla não hemolíticas ou suas proteínas de fusão com a proteína de ligação à  
10 biotina aqui descrita.

Em ainda outro aspecto, provê-se aqui uma composição imunogênica ou uma composição de vacina compreendendo uma proteína de ligação de biotina, uma proteína de ligação à biotina lipídada, uma proteína de fusão de ligação de  
15 biotina, compreendendo um domínio de ligação de biotina e de uma proteína antigênica ou peptídeo. Em algumas formas de realização deste aspecto, a proteína antigênica é um derivado não hemolítica de Hla aqui descrito.

Provê-se aqui também um método de vacinação de um  
20 indivíduo, por exemplo, um mamífero, por exemplo, um humano, com as composições imunogênicas, como aqui descrito, o método compreendendo a administração de uma composição de vacina, como aqui descrito, para o indivíduo.

## BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

**Figura 1** é uma representação esquemática de uma proteína de ligação à biotina modificada de acordo com uma forma de realização aqui descrita. A figura 1 descreve SEQ ID NOS: 56 e 14, respectivamente, em ordem de aparecimento.

**Figura 2** é um SDS-PAGE de uma proteína de ligação à biotina recombinante purificada aqui descrita.

**Figura 3** é uma representação esquemática de uma proteína de fusão compreendendo uma proteína de ligação à biotina e um antígeno X. A figura 3 descreve SEQ ID NOS: 56, 22 e 57, respectivamente, em ordem de aparecimento.

**Figura 4** é um SDS-PAGE exemplar de proteínas de fusão de rhizavidina purificadas.

**Figura 5** é uma representação esquemática de proteína de ligação à biotina lipídada de acordo com uma forma de realização aqui descrita. A figura 5 descreve SEQ ID NOS: 58 e 14, respectivamente, em ordem de aparecimento.

**Figura 6** é um SDS-PAGE de uma proteína de ligação à biotina lipídada aqui descrita.

**Figura 7** é um gráfico de barras mostrando a atividade de TLR2 dependente de dose da proteína de ligação à biotina lipídada.

**Figura 8** é uma representação esquemática de alfa-hemolisina (Hla) de *S. aureus* WT recombinante ou mutante e

suas proteínas de fusão de rhizavidina aqui descritas. No Hla não hemolítica, mutações pontuais foram feitas como a seguir: (i) resíduo 205 W a A, (ii) resíduo 213 W a A, ou (iii) resíduos 209-211 a partir de DRD para AAA. A figura 8 descreve SEQ ID NOS: 57, 56, 22 e 57, respectivamente, em ordem de aparecimento.

**Figura 9** é um SDS-PAGE de Hla de tipo selvagem purificado ou variantes não hemolíticas do mesmo.

**Figura 10** é SDS-PAGE de proteínas de fusão de ligação de biotina purificadas de Hla de tipo selvagem ou variantes não hemolíticas das mesmas.

**Figura 11** é um gráfico de linha mostrando atividade hemolítica de Hla WT e variantes não hemolíticas da mesma.

**Figura 12** é um gráfico de linhas mostrando a atividade hemolítica de Hla tipo selvagem, variantes não hemolíticas de Hla, e proteínas de fusão de ligação de biotina de Hla de tipo selvagem e variantes não hemolíticas da mesma.

**Figura 13** é um gráfico de barras mostrando que a estimulação dos macrófagos com proteína de fusão de ligação de biotina (rhavi-Hla209) induz várias citocinas pró-inflamatórias.

**Figura 14** é um gráfico de barras mostrando que o complexo sistema apresentando antígenos múltiplos (MAPS) contendo rhizavidina lipídada ou rhavi-Hla209 induz

respostas de células T mais fortes para os antígenos.

**DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO  
EXEMPLIFICATIVAS**

Deve ser entendido que esta invenção não está limitada  
5 à composição, metodologia, protocolos e reagentes  
particulares, etc, aqui descritos e, assim, estes podem  
variar. A terminologia aqui usada é para o propósito de  
descrever apenas formas de realização particulares, e não  
se destina a limitar o âmbito da presente invenção, que é  
10 definido unicamente pelas reivindicações.

Sem desejar ficar limitado por uma teoria, a baixa  
expressão de uma proteína de ligação à biotina na arte pode  
ser devida à duplicação ruim causada pela ligação  
dissulfeto em cada monômero da proteína de ligação à  
15 biotina que não formam, ou formam em níveis muito baixos,  
no citoplasma de *E. coli*. Agora, os inventores descobriram  
que a correta duplicação pode ser conseguida por transporte  
no espaço periplasmático de *E. coli*. Assim, duplicação  
correta das proteínas de ligação à biotina recombinantes  
20 pode ser melhorada substituindo a sequência de sinal nativa  
completa de uma proteína de ligação à biotina com uma  
sequência de sinal de secreção de *E. coli*. Sem desejar  
estar limitado por uma teoria, isto facilita a translocação  
de proteína recombinante para o espaço periplasmático das

células de *E. coli*. A translocação da proteína recombinante para o espaço periplásmico de *E. coli*, então, pode fornecer a ligação de dissulfeto funcionalmente importante na proteína de ligação à biotina (por exemplo, em Rhizavidina) e a proteína pode duplicar corretamente em uma forma solúvel e em elevados rendimentos.

Em um aspecto, provê-se aqui uma proteína de ligação de biotina, que pode ser expressada em uma forma solúvel e de alto rendimento em *E. coli*. Como aqui usado, o termo "proteína de ligação de biotina" refere-se a uma proteína, que se liga não covalentemente à biotina ou um análogo ou derivado da mesma. Rendimento elevado significa que a proteína pode ser expressada de uma forma solúvel em *E. coli* em uma quantidade de cerca 10 mg/L, 11 mg/L, 12 mg/L, 13 mg/L, 14 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L, 40 mg/L, 45 mg/L, 50 mg/L ou mais.

Em algumas formas de realização, a proteína de ligação à biotina pode ser uma proteína recombinante. A sequência de codificação para a proteína de ligação à biotina pode ser otimizada usando os códons de expressão de *E. coli*, a fim de evitar qualquer dificuldade durante a expressão em *E. coli* devido aos códons raros presentes no gene original.

Em geral, a proteína de ligação à biotina compreende um domínio de ligação de biotina. Como aqui usado, um

"domínio de ligação de biotina" refere-se a uma sequência de polipeptídeo que se liga à biotina. Embora uma proteína de ligação à biotina completa possa ser usada como um domínio de ligação de biotina, apenas a porção de ligação de biotina da proteína pode ser usada. Em algumas formas de realização, o domínio de ligação de biotina é de Rhizavidina.

Em algumas formas de realização, o domínio de ligação de biotina consiste de, ou consiste essencialmente de, sequência de aminoácidos correspondendo aos aminoácidos 45-179 da rhizavidina tipo selvagem. A sequência de aminoácidos de Rhizavidina tipo selvagem é:

MIITSLYATFGTIADGRRTSGGKTMIRTNVAALVFAVATSALAFDASNFKDFSSIASA  
SSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNN  
STENCNSATGWTGYAQVNGNNTTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQQQDTFQYVPTTENKSL  
KD (SEQ ID NO: 4)

Por outras palavras, o domínio de ligação de biotina não compreende (isto é, carece) aminoácidos 1-44 (MIITSLYATFGTIADGRRTSGGKTMIRTNVAALVFAVATSALA, SEQ ID NO: 5) de rhizavidina do tipo selvagem. Em algumas formas de realização, o domínio de ligação de biotina compreende a sequência de aminoácidos

FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTG  
RVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQQQ

DTFQYVPTTENKSLKLD (SEQ ID NO: 1).

Em algumas formas de realização, o domínio de ligação de biotina compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 50% de identidade, pelo menos 55% de identidade, 5 pelo menos 60% de identidade, pelo menos 65% de identidade, pelo menos 70% de identidade, pelo menos 75% de identidade, pelo menos 80% de identidade, preferivelmente pelo menos 85% de identidade, pelo menos 90% de identidade, pelo menos 95% de identidade, pelo menos 96% de identidade, pelo menos 10 97% de identidade, pelo menos 98% de identidade, ou pelo menos 99% de identidade, e mais preferivelmente, pelo menos 99,3% de identidade com SEQ ID NO: 1).

Enquanto, Helppolainen et al. (Biochem J., 2007, 405: 397-405) descrevem a remoção de apenas os primeiros 24 15 resíduos de rhizavidina de comprimento completo, os inventores descobriram que os primeiros 44 resíduos de rhizavidina comprimento completo são desnecessários para a estrutura do núcleo e função de rhizavidina. Além disso, inesperadamente, os aminoácidos 25-44 20 (MIRTNAVAALVFAVATSALA, SEQ ID NO: 6) da rhizavidina de comprimento total reduzem a solubilidade e secreção de rhizavidina expressada em *E. coli* como substituição dos primeiros 44 resíduos de rhizavidina comprimento completo com um peptídeo de sinal de *E. coli* levaram a um aumento na



solubilidade e secreção em *E. coli* de proteínas de biotina aqui descritas.

Na proteína de ligação à biotina aqui descrita, o domínio de ligação de biotina pode ser estendida sobre o N- ou C-terminal por um ou mais aminoácidos, com a condição de que o N-terminal do domínio de ligação de biotina não compreende uma sequência de aminoácidos correspondente a uma sequência de aminoácidos 1-44 do rhizavidina de tipo selvagem. Os inventores descobriram que a truncagem dos primeiros 44 aminoácidos do N-terminal da rhizavidina de tipo selvagem pode aumentar drasticamente a expressão da proteína de ligação à biotina em forma solúvel em *E. coli*. Assim, a proteína de ligação à biotina aqui descrita pode compreender a sequência  $X^1$ - $X^2$ - $X^3$ , em que  $X^2$  é um peptídeo tendo a sequência de aminoácidos correspondendo aos aminoácidos 45-179 da rhizavidina de tipo selvagem e  $X^1$  e  $X^3$  estão independentemente ausentes ou um peptídeo de 1 a cerca de 100 aminoácidos, com a condição de que o N-terminal de  $X^1$  não compreende uma sequência de aminoácidos correspondendo ao N-terminal de aminoácidos 1-44 da rhizavidina de tipo selvagem.

Em algumas formas de realização, as proteínas de ligação à biotina podem compreender um peptídeo de sinal conjugado com o N-terminal da proteína de ligação de

biotina, isto é, X<sup>1</sup> pode compreender um peptídeo de sinal. O peptídeo de sinal é também chamado um peptídeo líder no N-terminal, que pode ou não pode ser clivado após a translocação através da membrana. Peptídeos de  
 5 secreção/sinais são descritos em maiores detalhes abaixo. Em algumas formas de realização, a sequência de sinal é MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID NO: 2), MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRA (SEQ ID NO: 7), MKKVAAFVALSLLMAGC (SEQ ID NO: 3), ou um derivado ou porção funcional das mesmas.

10 O peptídeo de sinal pode ser ligado ao N-terminal do domínio de ligação de biotina, quer diretamente (por exemplo, através de uma ligação) ou indiretamente (por exemplo, por um ligador). Em algumas formas de realização, o peptídeo de sinal pode ser ligado ao N-terminal do  
 15 domínio de ligação de biotina via um ligador de peptídeo. A sequência do ligador de peptídeo pode ser de qualquer comprimento. Por exemplo, a sequência de ligador de peptídeo pode ser um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, catorze, quinze  
 20 ou mais aminoácidos de comprimento. Em algumas formas de realização, o ligador de peptídeo tem quatro aminoácidos de comprimento.

A sequência de ligador de peptídeo pode compreender qualquer sequência de aminoácidos. Por exemplo, o ligador

de peptídeo pode compreender uma sequência de aminoácidos que pode ser clivada por uma peptidase de sinal. Em algumas formas de realização, o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos AQDP (SEQ ID NO: 8) ou VSDP (SEQ ID NO: 9).

Na proteína de ligação de biotina, o domínio de ligação de biotina pode ser conjugado em seu C-término a um peptídeo de 1-100 aminoácidos. Tais peptídeos do C-término pode ser usado para as etiquetas de purificação, ligadores para outros domínios, e similares.

Em algumas formas de realização, a proteína de ligação à biotina é composta no seu N- ou C-términos uma ou mais (por exemplo, uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais) etiquetas de purificação. Exemplos de etiquetas de purificação incluem, mas não estão limitados a uma etiqueta de histidina, uma etiqueta c-my, uma etiqueta Halo, uma etiqueta Flag, e semelhantes. Em algumas formas de realização, a proteína de ligação à biotina compreende em seu C-término uma etiqueta histidina, por exemplo, (His)<sub>6</sub> (SEQ ID NO. 10).

Uma etiqueta de purificação pode ser conjugada com a proteína de ligação à biotina via um ligador de peptídeo para aumentar a probabilidade de que a etiqueta seja exposta para o exterior. O comprimento do ligador pode ser

de pelo menos um (por exemplo, um, dois, três, quatro, cinco e seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, catorze, ou quinze) aminoácidos. O peptídeo ligador pode compreender qualquer sequência de aminoácidos, sem  
 5 limitações. Em algumas formas de realização, o peptídeo ligador compreende a sequência de aminoácidos VDKLAAALE (SEQ ID NO: 11) ou GGGGSSSVDKLAAALE (SEQ ID NO: 12).

Em algumas formas de realização, a proteína de ligação à biotina inclui em seu C-término a sequência de  
 10 aminoácidos VDKLAAALEHHHHH (SEQ ID NO: 13) ou GGGGSSSVDKLAAALEHHHHH (SEQ ID NO: 14).

Em algumas formas de realização, a proteína de ligação à biotina compreende a sequência de aminoácidos:  
 MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGN  
 15 VSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNN  
 TEIVTSWNLAYEGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLKDGSGSSSVDKLAAALEHHH  
 HHH (SEQ ID NO: 15).

Em comparação com as proteínas de ligação à biotina conhecidas que formam tetrâmeros, a proteína de ligação à  
 20 biotina aqui descrita forma um dímero. Sem desejar estar limitado por uma teoria, a formação de um dímero pode melhorar ainda mais a expressão da proteína de ligação à biotina aqui descrita como uma proteína solúvel em *E. coli*.

Embora as proteínas de ligação à biotina sejam

conhecidos na arte, a proteína de ligação à biotina aqui descrita compreende diferenças significativas de avidina e proteínas de tipo de tipo avidina atualmente conhecido na arte. Primeiro, as avidinas atualmente conhecidas são muito difíceis de expressar as proteínas solúveis em *E. coli*. Contudo, como os inventores demonstraram, a proteína de ligação à biotina aqui descrita pode ser expressada como uma proteína solúvel em *E. coli*, com elevado rendimento.

As proteínas de ligação à biotina aqui descritas podem ser obtidas em uma forma solúvel em elevados rendimentos, por exemplo, acima de 30 µg por litro de cultura, por expressão em *E. coli*. Assim, as proteínas de ligação à biotina aqui descritas são mais solúveis do que as descritas na técnica e refletem diferenças subjacentes. Sem querer estar limitado por uma teoria, a diferença em solubilidade pode ser atribuída às diferentes físicas e/ou químicas e/ou estruturais subjacentes entre as proteínas de ligação à biotina aqui descritas e de outras proteínas de ligação à biotina conhecidas na arte.

Em segundo lugar, a proteína de ligação à biotina aqui descrita compreende um domínio de ligação de biotina, que consiste de aminoácidos 45-179 de rhizavidina de tipo selvagem. Embora rhizavidina de tipo selvagem e uma porção parcialmente truncada da mesma seja conhecida na arte, não

existe qualquer ensinamento ou sugestão na técnica de que uma proteína de ligação à biotina compreendendo a sequência de aminoácidos dos aminoácidos 45-179 de Rhizavidina tipo selvagem e tendo uma sequência de sinal de *E. coli* poderia  
5 conduzir a uma proteína solúvel que poderia ser obtida com um rendimento elevado em *E. coli*. De acordo com Helppolainen et al. (Biochem J., 2007, 405: 397-405), os aminoácidos 25-44 da rhizavidina de tipo selvagem compreendem uma sequência de sinal putativa. No entanto,  
10 como aqui se discute, os inventores descobriram e demonstraram que a substituição da sequência de sinal putativa com uma sequência de sinal de *E. coli* leva a um aumento em forma solúvel da expressão de proteína de ligação à biotina em *E. coli*.

15 Em terceiro lugar, a proteína de ligação à biotina descrita compreende um peptídeo de sequência de aminoácidos GGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH (SEQ ID NO: 14). Este peptídeo no C-término fornece uma etiqueta de histidina para a purificação e um local para a inserção de outros domínios,  
20 por exemplo, domínios antigênicos, na proteína da biotina. Além disso, apesar de Helppolainen et al. (Biochem J., 2007, 405: 397-405) descreverem a expressão de rhizavidina em *E. coli*, não há nenhum ensinamento ou sugestão em Helppolainen et al. para a conjugação de um peptídeo

adicional para o C-término do domínio de ligação de biotina da Rhizavidina.

Em quarto lugar, rhizavidina tem uma homologia de sequência menor do que a da avidina de ovo (22,4% de identidade de sequência e 35,0% de similaridade) em 5 comparação com outras proteínas de tipo avidina. Assim, a proteína de ligação à biotina aqui descrita é diferente de avidina e de outras proteínas de tipo avidina.

Em quinto lugar, a proteína de ligação à biotina aqui 10 descrita tem um baixo ponto isoelétrico (pI) em comparação com a avidina e outras moléculas de tipo avidina. O ponto isoelétrico da rhizavidina de tipo selvagem é 4.0 (Helppolainen et al., Biochem J., 2007, 405: 397-405). O ponto isoelétrico de outras proteínas de ligação à biotina 15 conhecidas é geralmente superior a 6,1 (ver Helppolainen et al., Biochem J., 2007, 405: 397-405). Em comparação, o pI da proteína de ligação à biotina aqui descrita é de 5,4. O pI ácido da proteína de ligação aqui descrita, leva à ligação não específica reduzida. Um problema no uso de 20 peptídeos atualmente conhecidos de avidina e de tipo avidina é a ligação não específica dos mesmos. Os peptídeos de avidina e de tipo avidina atualmente conhecidos podem ligar não especificamente não a não somente as células, mas também aos DNAs, proteínas, e materiais biológicos, como as

membranas. Por exemplo, na detecção de um material usando a ligação de avidina-biotina, avidina não se liga especificamente a materiais diferentes do material objeto a ser detectado para aumentar o fundo. Uma razão para a  
5 ligação não-específica elevada de avidina inclui seu elevado ponto isoelétrico. A avidina é uma proteína fortemente básica, com um ponto isoelétrico muito elevado de 10 ou mais, e é carregada positivamente, como um todo. Deste modo, acredita-se que a avidina se liga facilmente  
10 aos materiais biológicos, que são carregadas negativamente em muitos casos. Assim, o pI baixo da proteína de ligação à biotina aqui descrita é vantajoso sobre os peptídeos de avidina e de tipo avidina atualmente conhecidos.

Em sexto lugar, o tamanho da proteína de ligação à  
15 biotina aqui descrita é relativamente pequeno em comparação com avidina e proteínas de tipo de tipo avidina atualmente conhecidas. A proteína de ligação à biotina é inferior a 28 kDa (tamanho de dímero). No entanto, a maioria das proteínas avidina e de tipo avidina atualmente conhecidas  
20 têm tamanhos maiores do que 60kDa (tamanho tetramero). Rhizavidina de tipo selvagem é referida para tendo cerca de 29 kDa (tamanho dímero) de tamanho. O pequeno tamanho da proteína de ligação à biotina pode ser usado para aumentar a carga de conjugação da ligação entre as moléculas de



interesse. Por exemplo, a proteína de ligação à biotina pode ser usada para conjugar molécula de primeira de interesse com uma segunda molécula de interesse. Uma das moléculas de interesse pode ser ligada a uma ou mais  
5 moléculas de biotina ou de tipo biotina e a segunda molécula pode ser ligada, conjugada ou fusionada com a proteína de ligação de biotina. Dado o pequeno tamanho da proteína-biotina descrita aqui, as moléculas de biotina ou de tipo biotina podem ser espaçadas mais perto juntas de  
10 modo a permitir a ligação mais relativa ao caso da segunda molécula ser uma molécula maior de avidina ou de tipo avidina atualmente conhecidas.

Em sétimo lugar, a proteína de ligação à biotina aqui descrito é um dímero. Formando um dímero pode melhorar  
15 ainda mais a expressão da proteína de ligação à biotina aqui descrita como uma proteína solúvel em *E. coli*. Além disso, porque a proteína de ligação à biotina forma um dímero, em vez de tetrâmero, como todas as outras proteínas de tipo avidina conhecidas, 1) a complexidade estrutural  
20 dos antígenos de fusão é reduzida; 2) a dificuldade de expressar proteínas de fusão de proteína de ligação à biotina recombinantes é similarmente reduzida, 3) o impedimento estereoquímico de manipulações de fusões de proteínas de ligação à biotina é minimizado, o que é

vantajoso para outras manipulações com, por exemplo, mas não limitado a, biotina, miméticos de biotina ou derivados de biotina, e 4) solubilidade de fusões de proteína de ligação à biotina é altamente acentuada. Assim, demonstrando diferenças subjacentes entre as proteínas de ligação à biotina aqui descritas e as conhecidas na arte.

Em oitavo lugar, a proteína de ligação à biotina aqui descrita reduz o risco de uma composição imunogênica compreendendo a mesma que induzir uma reação alérgica relacionada com ovo em um indivíduo. Além disso, o anticorpo para o domínio de ligação de biotina aqui descrito não apresenta reatividade cruzada aparente para avidina de ovo (e vice-versa).

Além disso, uma proteína de ligação à biotina é aqui descrita podendo ter propriedades melhoradas, tais como uma redução na ligação não específica, ou uma melhoria na ligação de biotina, enquanto retendo as características de rhizavidina de tipo selvagem. O uso da proteína de ligação à biotina aqui descrita para detecção, por exemplo, no imunoensaio ou teste de hibridação de ácido nucléico, para a medição de um análito usando ligação de avidina-biotina pode reduzir o fundo, aumentando a sensibilidade, e mantendo a propriedade de ligação com biotina em condições severas.

Este estudo demonstra claramente as vantagens e diferenças das proteínas de ligação à biotina aqui descritas sobre as proteínas avidina e de tipo avidina. Assim, as proteínas de ligação à biotina aqui descritas têm  
5 um potencial como uma ferramenta poderosa e versátil em uma ampla faixa de aplicações, utilizando tecnologia avidina-biotina.

Sem limitações, uma proteína de ligação à biotina pode ser usada em qualquer metodologia, composição ou sistema  
10 requerendo o uso de um sistema avidina-biotina. Como um versado sabe bem, o sistema avidina-biotina pode ser usado para vários métodos de laboratório, tais como bioconjugação; detecção molécula alvo; isolamento de molécula alvo, purificação ou enriquecimento de uma  
15 amostra; detecção de proteína; detecção de ácido nucléico, isolamento, purificação ou enriquecimento de proteína; isolamento, purificação ou enriquecimento de ácido nucléico; ELISA; citometria de fluxo, e similares.

Portanto, os usos exemplares para as proteínas de  
20 ligação à biotina recombinantes aqui descritas incluem, mas não estão limitados a, bioconjugação; detecção de molécula alvo; isolamento, purificação ou enriquecimento de molécula alvo a partir de uma amostra; detecção de proteína; detecção de ácido nucléico, isolamento, purificação ou

enriquecimento de proteína; isolamento, purificação ou enriquecimento de ácido nucléico; ELISA; citometria de fluxo, e similares.

Em algumas formas de realização, a proteína de ligação à biotina aqui descrita pode ser usada como parte do par de afinidade no sistema apresentando antígenos múltiplos (MAPS), como descrito no pedido provisório US No. 61/48.934, depositado em 11 de maio de 2012; No. 61/608.168, depositado em 8 de março de, 2012; e No. 61/609.974, depositado em 13 de março de 2012, e pedido PCT no. PCT/US12/37412, depositado em 11 de maio de 2012, sendo o conteúdo de todos aqui incorporado por referência na sua totalidade. MAPS também é descrito com mais detalhes aqui a seguir. Sem querer estar limitado por uma teoria, o uso de uma proteína de ligação à biotina descrita aqui reduz o risco de o MAPS induzir uma reação alérgica relacionada com ovo em um indivíduo. Além disso, anticorpo para Rhizavidina modificada recombinante não tem reatividade cruzada aparente para avidina de ovo (e vice-versa).

#### Proteína de ligação à biotina lipídada

Em outro aspecto, é aqui fornecida uma proteína de ligação à biotina lipídada. Como aqui usado, o termo "proteína de ligação à biotina lipídada" refere-se a uma proteína de ligação de biotina, que é conjugada

covalentemente com um lipídeo. As frações de lipídeos podem ser um lipídeo diacila ou triacila.

A proteína de ligação à biotina lipídada pode ser obtida usando uma sequência de lipidação. Como aqui usado, o termo "sequência de lipidação" refere-se a uma sequência de aminoácidos que facilita a lipidação em uma bactéria, por exemplo, *E. coli*, de um polipeptídeo carregando a sequência de lipidação. A sequência de lipidação pode estar presente no N-terminal ou no C-terminal da proteína. A sequência de lipidação pode ser ligada à proteína de ligação à biotina recombinante para formar uma proteína de fusão, que está na forma lipídada, quando expressada em *E. coli* por tecnologia recombinante convencional. Em algumas formas de realização, uma sequência de lipidação está localizada no N-terminal da proteína de ligação de biotina.

Qualquer sequência de lipidação conhecida de um versado na arte pode ser usada. Em algumas formas de realização, a sequência de lipidação é MKKVAAFVALSLLMAGC (SEQ ID NO: 3) ou um derivado ou porção funcional da mesma. Outras sequências de lipidação exemplares incluem, mas não estão limitadas a, MNSKKLCCICVLFSLLAGCAS (SEQ ID NO: 16), MRYSKLTMLIPCALLLSAC (SEQ ID NO: 17), MFVTSKKMTAAVLAITLAMSLSAC (SEQ ID NO: 18), MIKRVLVVSMVGLSLVGC (SEQ ID NO: 19), e derivados ou partes

funcionais das mesmas.

Em algumas formas de realização, a sequência de lipidação pode ser fusionada com a proteína de ligação à biotina via um ligador de peptídeo, em que o ligador de peptídeo liga a sequência de lipidação com a proteína de  
5 ligação de biotina.

Em algumas formas de realização, o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos VSDP (SEQ ID NO: 9).

Em uma forma de realização, a proteína de lipídeo de  
10 ligação de biotina compreende a sequência de aminoácidos  
MKKVAAFVALSLLMAGCVSDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVS  
GQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNTE  
IVTSWNLAYEGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLKLD (SEQ ID NO: 20).

As proteínas de ligação à biotina lipidadas são  
15 ligandos para receptores do tipo Toll (TLRs). Como tal, as  
proteínas de ligação à biotina lipidadas aqui descritas  
podem ser usadas como ligandos de TLR. Por exemplo, a  
proteína de ligação à biotina lipitada pode ser usada em  
composições para induzir a estimulação de TLR2. Isto pode  
20 ser útil para induzir imunogenicidade para outros antígenos  
/ patógenos. Assim, as lipoproteínas de ligação à biotina  
podem ser usadas em composições imunogênicas como um fator  
de co-estimulação ou adjuvante para um antígeno.

Como aqui usado, o termo "receptor de tipo Toll"

pretende referir-se em geral a qualquer um dos receptores do tipo Toll de quaisquer espécies de organismos. Um TLR pode ser de qualquer espécie de mamífero. TLRs foram identificados em várias espécies de mamíferos, incluindo, 5 mas não limitadas a, por exemplo, humanos, porquinhos-da-índia, e camundongos. Um TLR específico pode ser identificado com referência adicional às espécies de origem (por exemplo, humano, murino, etc...), um receptor particular (por exemplo, TLR2, TLR3, TLR9, etc...), ou 10 ambos. Em algumas formas de realização, a proteína de ligação à biotina lipídada é um ligando por TLR2.

Receptores de tipo Toll (TLRs) são uma família de proteínas de transmembrana codificadas germinativas que facilitam o reconhecimento do patógeno e ativação do 15 sistema imune inato. Receptores de tipo Toll (TLRs) são receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), e são expressados por células do sistema imune inato, incluindo macrófagos, células dendríticas e células NK. Exemplos de ligandos conhecidos para TLRs incluem bactérias gram 20 positivas (TLR-2), endotoxina bacteriana (TLR-4), proteína flagelina (TLR-5), DNA bacteriano (TLR-9), RNA de cadeia dupla e de poly I: C (TLR-3), e levedura (TLR-2). Outros ligandos que ligam um receptor de reconhecimento de padrão de endocítico, um receptor removedor ou um receptor de

ligação de manose também podem ser contemplados pela presente invenção. TLRs encaixam ligandos derivados de patógenos conservados e subsequentemente ativam a via de transdução de sinal TLR/IL-1R para induzir uma variedade de genes efetores. Receptores de tipo Toll (TLRs) representam um importante grupo de PRRs que podem sentir padrões moleculares associados a micróbios ou patógenos. Eles são amplamente expressados no sangue, baço, pulmão, músculo e intestinos por muitos tipos de células, notavelmente as células dendríticas, (DCs), mas também macrófagos, células epiteliais e linfócitos.

Considerando que alguns TLRs localizados na superfície da célula são específicos para proteínas e lipídeos microbianos, outros associados com compartimentos endossomais no interior das células são específicos para ácidos nucleicos. Ligação de TLRs por seus ligandos específicos resulta em alterações conformacionais nos receptores, levando à transdução de sinal a jusante que envolve primariamente as vias dependentes de MyD88 e TRIF. Exceto para TLR3, todos os outros TLRs pode sinalizar através da via MyD88 para induzir citocinas pró-inflamatórias que envolvem a ativação de cascatas de proteína-quinase intracelulares, incluindo IB quinase (IKK), NF- $\kappa$ B, e proteína quinase regulada no sinal



extracelular (ERK), c- Jun N-terminal quinase (JNK) e proteínas quinases de ativação mitogênio p38 (MAPKs). A via TRIF, independente de MyD88, é usada por ambos TLR3 e TLR4 e media a indução de interferons tipo I.

5        As lipoproteínas de ligação à biotina recombinantes aqui descritas têm imunogenicidade acentuada. Sem desejar estar limitado por uma teoria, as porções de lipídeos nos N-terminais das lipoproteínas ou lipopeptídeos contribuem para a atividade adjuvante. Portanto, formas de realização  
10        adicionais fornecem composições imunogênicas ou vacinas para induzir uma resposta imune, compreendendo a lipoproteína de ligação à biotina isolada, ou um vetor apropriado para a expressão *in vivo* dos mesmos, ou ambos, e um veículo apropriado, bem como a métodos para elicitar uma  
15        resposta imune ou resposta protetora, compreendendo a administração a um hospedeiro da lipoproteína de ligação à biotina isolada recombinante, o vetor expressando a lipoproteína de ligação à biotina recombinante, ou uma composição contendo a lipoproteína recombinante ou vetor,  
20        em uma quantidade suficiente para elicitar a resposta.

      Uma composição imunológica ou imunogênica compreendendo a lipoproteína de ligação à biotina elícita uma resposta imunológica - local ou sistêmica. A resposta pode, mas não precisa, ser protetora. Deve ser notado que,

como aqui usado, os termos "composição imunológica" e "composição imunogênica" incluem uma "composição de vacina" (como os dois primeiros termos podem ser composições protetoras). Sem limitações, uma proteína de ligação à biotina lipídada aqui descrita pode ser usada como um antígeno, adjuvante, ou co-estimulador em uma composição de vacina imunológica, imunogênica. Além disso, uma vez que a proteína de ligação à biotina lipídada compreende um domínio de ligação de biotina, a proteína lipídada pode ser montada na estrutura dorsal do polímero do MAPS. Portanto, são também fornecidos aqui métodos de indução de uma resposta imunológica em um mamífero hospedeiro. O método compreende a administração ao hospedeiro de uma composição de vacina imunogênica, imunológica compreendendo uma proteína de ligação à biotina lipídada aqui descrita e um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável.

Em algumas formas de realização, a proteína de ligação à biotina lipídada é uma proteína de fusão compreendendo uma proteína de ligação à biotina lipídada e uma proteína ou peptídeo.

#### Hla não hemolítica

Hemolisinas são exotoxinas produzidas por bactérias que causam a lise das células vermelhas do sangue. Embora altamente imunogênicas, o seu uso em vacinas é limitado

porque elas causam a lise das células vermelhas do sangue. Consequentemente, em outro aspecto, aqui são providas variantes de alfa-hemolisina de *staphylococcus aureus* (Hla), seu construto de fusão com a proteína de ligação à biotina e seus usos. Estas variantes, aqui designadas como "mHla", têm atividade substancialmente não hemolítica, isto é, tem uma atividade hemolítica sensivelmente baixa. Como aqui usada, a frase "substancialmente não hemolítica" significa a incapacidade para lisar as células vermelhas do sangue com títulos equivalentes de Hla de tipo selvagem. O termo "Hla de tipo selvagem" é conferido à definição comum, associada com tal frase, ou seja, Hla que é naturalmente secretada por uma fonte bacteriana capaz. "Hla de tipo selvagem", por definição, não inclui, por exemplo, produtos de fusão de Hla derivados através de técnicas de DNA recombinante. Em algumas formas de realização, a atividade hemolítica de mHla é de pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% menores do que os títulos equivalente de Hla de tipo selvagem. Em algumas formas de realização, mHla não tem atividade

hemolítica detectável. Os inventores também descobriram que a atividade hemolítica de mHla pode ser reduzida ainda mais, ligando o mHla com uma proteína de ligação de biotina. Assim, a presente descrição também descreve

5 proteínas de fusão compreendendo uma proteína mHla e uma proteína de ligação de biotina.

Como aqui provido, Hla não hemolítica pode ser criada em que resíduo W205 ou W213 é substituído por alanina (A) ou o tripeptídeo DRD209-211 é substituído por um peptídeo

10 tri-alanina (AAA) em Hla tipo selvagem. A proteína Hla mutada pode ser expressada e purificada em um sistema de expressão de *E. coli*. Os mutantes podem ser feitos por mutação de pontos usando mutagênese de mudança rápida. Por exemplo, a sequência de nucleotídeos de um ácido nucléico

15 codificando Hla tipo selvagem pode ser mudada para substituir um dado aminoácido em Hla de tipo selvagem para outro aminoácido.

Em algumas formas de realização, a mHla é uma proteína de fusão compreendendo a mHla e uma proteína de ligação de

20 biotina. Em algumas formas de realização, a proteína de fusão mHla de ligação de biotina compreende a sequência de aminoácidos

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGS  
 TMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTG RVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATG  
 WTGYAQVNGNNT EIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLKDG GGGSSSA

DSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGT  
 IAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTYG  
 FNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQN  
 WGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRK  
 5 ASKQQTNIIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN

(SEQ ID NO: 21).

Os variantes de Hla aqui descritos são ligandos para os receptores do tipo Toll (TLRs). Como tal, as variantes de Hla aqui descritas podem ser usadas como ligandos de  
 10 TLR. Por exemplo, as variantes de Hla podem ser usadas em composições para induzir a estimulação de TLR2. Isto pode ser útil para induzir imunogenicidade para outros antígenos/patógenos. Assim, as variantes de Hla aqui descritas podem ser usadas em composições imunogênicas como  
 15 um fator de co-estimulação ou adjuvante para um antígeno. Além disso, quando a mHla é fusionada com uma proteína de ligação de biotina, a proteína de fusão pode ser conjugada com a estrutura dorsal do polímero do MAPS.

Em algumas formas de realização, a mHla pode ser usada  
 20 como um fator co-estimulatório em uma composição imunogênica ou vacina.

Além disso, uma vez que a mHla induz uma resposta imune no indivíduo, a mHla pode ser usada como uma composição imunogênica ou vacina ou para vacinar um

indivíduo contra *S. aureus*.

A mHla aqui descrita têm imunogenicidade acentuada. Portanto, formas de realização adicionais fornecem composições imunogênicas ou vacinas para induzir uma  
5 resposta imunológica, compreendendo a mHla, ou um vetor apropriado para a expressão *in vivo* da mesma, ou ambos, e um veículo apropriado, bem como a métodos para induzir uma resposta imunológica ou de proteção compreendendo a administração a um hospedeiro da mHla isolada, o vetor  
10 expressando a mHla, ou uma composição contendo a mHla ou vetor, em uma quantidade suficiente para elicitar a resposta.

Uma composição imunológica ou imunogênica compreendendo a mHla pode elicitar uma resposta imunológica  
15 - local ou sistêmica. A resposta pode, mas não precisa, ser protetora. Deste modo, um mutante não hemolítica de Hla aqui descrito pode ser como um antígeno, adjuvante, ou co-estimulador de uma composição imunológica, imunogênica, ou vacina.

20 Além disso, são também aqui fornecidos métodos para induzir uma resposta imunológica em um mamífero hospedeiro. O método compreende a administração ao hospedeiro de uma composição imunogênica, imunológica ou vacina compreendendo um mutante não hemolítica de Hla aqui descrito e um veículo

ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Em outro aspecto, são aqui providas proteínas de fusão compreendendo uma proteína de ligação à biotina aqui descrita ligada a uma proteína antigênica ou peptídeo.

5 Estas proteínas de fusão também são referidas também como proteínas de fusão de ligação de biotina e como proteínas de fusão do antígeno aqui. A proteína de ligação à biotina e a proteína antigênica ou peptídeo podem ser ligadas em qualquer configuração, por exemplo, proteína de ligação à  
10 biotina pode no N-terminal e no peptídeo antigênico no C-terminal da proteína de fusão, ou vice-versa.

Em algumas formas de realização, a proteína de ligação à biotina e a proteína antigênica ou peptídeo são ligados uns aos outros via um ligador de peptídeo. Sem limitações,  
15 o ligador de peptídeo pode compreender qualquer sequência de aminoácidos e pode ser de qualquer comprimento. Por exemplo, a sequência de ligador de peptídeo pode ter um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, catorze, quinze ou mais aminoácidos de  
20 comprimento. Em algumas formas de realização, o ligador de peptídeo ligando o domínio de antígeno para o domínio de ligação de biotina é de oito aminoácidos de comprimento.

Em algumas formas de realização, o ligador de peptídeo ligando o domínio de antígeno para o domínio de ligação de

biotina tem a sequência de aminoácidos GGGGSSSS (SEQ ID NO: 22).

Em algumas formas de realização, a proteína antigênica é uma Hla não-hemolítica descrito aqui.

5 Em algumas formas de realização, a proteína de Hla não hemolítica é uma proteína de fusão compreendendo uma proteína de ligação à biotina e uma Hla não hemolítica descrita aqui.

10 Em algumas formas de realização, a proteína de Hla não hemolítica é uma proteína de fusão compreendendo uma proteína de ligação à biotina lipídada e uma Hla não hemolítica descrita aqui.

#### Composições imunogênicas

15 Em outro aspecto, são aqui providas composições imunogênicas compreendendo um proteína de fusão de antígeno, uma ligação de biotina lipídada, ou uma variante não hemolítica da Hla aqui descrita. Além disso, também são aqui fornecidas composições imunogênicas e composições de vacina compreendendo um complexo imunogênico, que  
20 compreende pelo menos, uma proteína de fusão de antígeno, ou proteínas de fusão do antígeno múltiplas, fixadas a um andaime de polímero para uso na elicitação de uma resposta imune a cada um dos antígenos fixados ao polímero, e, opcionalmente, ao próprio polímero, quando administrado a



um indivíduo. Sem querer estar limitado por uma teoria, a composição imunogênica aqui descrita estimula uma resposta imune humoral e celular: isto pode gerar anticorpos e as respostas Th1/Th17 a antígenos de proteínas múltiplos usando um construto imunogênico de MAPS único. Uma combinação de imunidade de células B e T para o organismo representa uma estratégia de vacina ótima contra muitas doenças, incluindo infecção invasiva associada com doenças pneumocócicas e transporte nasofaríngeal. Em algumas formas de realização, a composição imunogênica é uma vacina ou está incluída em uma vacina.

Portanto, as formas de realização aqui fornecem uma composição imunogênica e métodos utilizáveis para criar uma resposta imune em um indivíduo, a qual pode ser usada sozinha ou em conjunto ou em mistura com, essencialmente, quaisquer abordagens de vacinas existentes.

Em algumas formas de realização, uma composição imunogênica, como aqui descrita, compreende pelo menos 2 antígenos, ou pelo menos 3 antígenos, ou, pelo menos, 5 antígenos, ou entre 2-10 antígenos, ou entre 10-15 antígenos, ou entre 15-20 antígenos, ou entre 20-50 antígenos, ou entre 50 100 antígenos, ou mais de 100 antígenos, inclusive. Em algumas formas de realização, em que uma composição imunogênica, como aqui descrita,

compreende pelo menos 2 antígenos, os antígenos podem ser o mesmo antígeno ou pelo menos 3 antígenos diferentes. Em algumas formas de realização, os antígenos podem ser do mesmo ou de diferentes patógenos, ou podem ser epítomos diferentes ou de partes da mesma proteína antigênica, ou pode ser o mesmo antígeno que é específico para diferentes sorotipos ou variações sazonais do mesmo patógeno (por exemplo, vírus de influenza A, B, e C).

Em algumas formas de realização, uma composição imunogênica, como aqui descrito, compreende um antígeno a partir de um organismo patogênico ou um tecido anormal. Em algumas formas de realização, o antígeno é um antígeno tumoral. Em algumas formas de realização, um antígeno pode ser, pelo menos, um antígeno selecionado dentre antígenos de patógenos ou parasitas, tais como os antígenos de *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* ou *M. tetanus*, *Bacillus anthracis*, HIV, antígenos de influenza sazonal ou epidêmica (como H1N1 ou H5N1), *Bordetella coqueluche*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitides* ou *N. gonorrhoeae*, HPV, *Chlamydia trachomatis*, HSV ou outros vírus de herpes, ou *Plasmodia* sp. Estes antígenos podem incluir peptídeos, proteínas, glicoproteínas, ou polissacarídeos. Em algumas formas de realização, o antígeno é um toxóide ou porção de uma toxina.

Em algumas formas de realização, uma composição imunogênica, como aqui descrito, compreende um polissacarídeo antigênico, por exemplo, como o antígeno Vi (polissacarídeo capsular de *Salmonella typhi*),  
5 polissacarídeos capsulares pneumocócicos, polissacarídeo da parede celular pneumocócica, polissacarídeo capsular de Hib (*Haemophilus influenzae* tipo B), polissacarídeos capsulares meningocócicos, e outros polissacarídeos capsulares ou de  
10 parede celular bacterianos, ou quaisquer combinações dos mesmos. O polissacarídeo pode ter um componente de proteína, por exemplo, uma glicoproteína, tais como as de vírus.

Em algumas formas de realização, uma composição imunogênica, como aqui descrito, compreende ainda pelo  
15 menos um fator de co-estimulação associado com o polímero ou polissacarídeo, em que o fator de co-estimulação pode ser associado diretamente ou indiretamente. Por exemplo, em algumas formas de realização, um fator co-estimulação pode ser fixado covalentemente ao polímero. Por exemplo, em  
20 algumas formas de realização, um fator de co-estimulação pode ser covalentemente fixado à molécula de primeira afinidade, que é então reticulado com o polímero. Por exemplo, em algumas formas de realização, um elemento de co-estimulação pode ser fixado a uma molécula de afinidade

complementar, que se associa com uma molécula de primeira afinidade para ligar o fator co-estimulatório para o polímero. Em algumas formas de realização, um fator de co-estimulação é um adjuvante. Em formas de realização alternativas, um fator co-estimulatório pode ser qualquer um conhecido do versado na arte, e inclui qualquer combinação, por exemplo, sem limitação, agonistas do receptor de tipo Toll (agonistas para TLR2, 3, 4, 5, 7 8, 9, etc), agonistas de NOD, ou agonistas de inflamassoma.

Em algumas formas de realização, o fator co-estimulatório pode ser uma proteína de ligação à biotina lipídada ou uma variante não hemolítica de alfa-hemolisina ou a proteína de fusão de mHla com proteína de ligação à biotina aqui descrita.

Outro aspecto da presente invenção relaciona-se com o uso da composição imunogênica, como aqui descrito, para ser administrada a um indivíduo para elicitar uma resposta imune no indivíduo. Em algumas formas de realização, a resposta imune é uma resposta de anticorpos/célula B, uma resposta de células T CD4<sup>+</sup> (incluindo Th1, Th2 e Th17) e/ou uma resposta de células T CD8<sup>+</sup>. Em algumas formas de realização, pelo menos, um adjuvante é administrado em conjunto com a composição imunogênica.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um

método para induzir uma resposta imune em um indivíduo a pelo menos um antígeno, compreendendo a administração ao indivíduo da composição imunogênica, como aqui descrito.

5 Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método de vacinação de um animal, por exemplo, um pássaro, um mamífero ou um humano, contra pelo menos um antígeno, compreendendo a administração de uma composição de vacina compreendendo a composição imunogênica, como aqui descrito.

10 Em todos os aspectos, como aqui mostrado, um animal ou de indivíduo pode ser um humano. Em algumas formas de realização, o indivíduo pode ser um animal de criação ou não-doméstico, ou um animal doméstico. Em algumas formas de realização, uma composição de vacina que compreende a composição imunogênica como aqui descrita pode ser  
15 administrada por via subcutânea, intranasal, bucal, sublingual, vaginal, retal, intradérmica, intraperitoneal ou intramuscular.

Em todos os aspectos, como aqui mostrado, uma resposta imune é uma resposta de anticorpo/célula B, uma resposta de  
20 células T CD4<sup>+</sup> (incluindo respostas de Th1, Th2 e Th17) ou uma resposta de células T CD8<sup>+</sup> contra o(s) antígeno de proteína/peptídeo. Em algumas formas de realização, uma resposta imune é uma resposta de anticorpo/células B contra o polímero, por exemplo, um polissacarídeo pneumocócico. Em

algumas formas de realização, pelo menos, um adjuvante é administrado em conjunto com a composição imunogênica.

Outro aspecto da presente invenção refere-se ao uso da composição imunogênica, como aqui descrito, para uso em um diagnóstico para exposição a um patógeno ou agente imunogênico.

Sistema apresentando antígenos múltiplos

Também é aqui fornecido um sistema imunogênico apresentando antígenos múltiplos (MAPS), utilizável para a produção de composições imunogênicas, tais como os que são utilizáveis em vacinas. Em particular, a presente invenção refere-se a composições compreendendo um complexo imunogênico compreendendo, pelo menos, um tipo de polímero, por exemplo, um polissacarídeo, que pode, opcionalmente, ser antigênico; pelo menos uma proteína ou peptídeo antigênico, e, pelo menos, uma par de moléculas de afinidade complementar compreendendo (i) uma molécula de primeira afinidade que se associa com o polímero, e (ii) uma molécula de afinidade complementar que se associa com a proteína ou peptídeo; de tal modo que as moléculas de primeira e afinidade complementar servem como uma ligação indireta entre o polímero com a proteína ou peptídeo antigênico. Deste modo, o polímero pode fixar, pelo menos, 1, ou, pelo menos, 2, ou uma pluralidade dos mesmos ou de

diferentes antígenos de proteína ou peptídeo. Em algumas formas de realização, o polímero é antigênico, por exemplo, o polímero é um polissacarídeo capsular pneumocócico. Em algumas realizações, os antígenos de proteína ou peptídeo são antígenos de proteínas ou peptídeos recombinantes.

As composições imunogênicas como aqui descritas podem elicitar ambas as respostas humoral e celular para um ou antígenos múltiplos ao mesmo tempo. As composições imunogênicas fornecem uma resposta de memória de longa duração, potencialmente protegendo um indivíduo de uma infecção futura. Isto permite obter única composição imunogênica que cria um título elevado de anticorpos anti-polissacarídeos funcionais, e é semelhante ou se compara favoravelmente com o nível de anticorpos induzidos pela vacina conjugada convencional. Além disso, não existe qualquer restrição à proteína suporte específica, e várias proteínas de antígeno podem ser usadas no construto de MAPS para gerar uma resposta de anticorpos anti-polissacarídeos robusta.

Além disso, a resposta de anticorpos e as respostas Th17/Th1 fortes são específicas para antígenos múltiplos de proteína apresentados através da composição de MAPS. Isto representa uma grande vantagem, como um meio para elicitar duas formas de imunidade com um construto. Além de uma

resposta imune mais convencional a um polissacarídeo antigênico conjugado com um suporte de proteína, a presente invenção proporciona uma resposta de células T e, mais especificamente, respostas de Th17 e Th1 a proteínas injetadas sistemicamente. Além disso, a presente composição imunogênica pode incorporar ligandos sobre a estrutura dorsal do polímero. Isto proporciona um potencial para acentuar as resposta de células B ou de células T específicas por modificação da relação de proteína/polímero, tamanho do complexo, ou por incorporação de fator co-estimulatório específico, tal como os ligandos de TLR2/4, etc, na composição.

Em comparação com a tecnologia de conjugação típica, que envolve o tratamento severo de proteínas, os presentes métodos evitam o risco de desnaturação de outra modificação do antígeno de peptídeo. Isto proporciona uma vantagem substancial da preservação da antigenicidade de proteínas incluídas e aumenta a probabilidade de que a própria proteína irá servir como um antígeno (em vez de apenas como um suporte). Do mesmo modo, os atuais métodos evitam a desnecessária modificação/dano da estrutura dorsal do polissacarídeo, porque não há nenhuma reticulação química pesada: a biotinylation pode ser controlada com precisão para reagir com grupos funcionais específicos do



polissacarídeo, e o nível de biotinilação pode ser facilmente ajustado. Isto é vantajoso para evitar o processo típico de conjugação, que resulta em dano para as cadeias laterais críticas ou epítomos, os quais podem  
5 causar uma imunogenicidade e proteção reduzidas.

A presente montagem baseada em afinidade oferece uma preparação fácil e altamente flexível da composição imunogênica. Ela é altamente específica e estável, e que pode permanecer no frio durante meses e reter sua potência.

10 O processo de montagem é simples o suficiente para garantir alta reprodutibilidade, existem apenas algumas etapas necessárias, o que reduz o risco de variação de lote para lote, de grande vantagem industrial. A montagem de MAPS é altamente eficiente (acima de 95%), mesmo em baixas  
15 concentrações de proteína e de polissacarídeo (tal como 0,1 mg/ml), o que é uma grande vantagem, porque as ineficiências na fabricação de conjugados (tipicamente eficiências estão na faixa de <50%) representam um grande obstáculo e motivo para os altos custos das vacinas. Para  
20 formulação: é fácil ajustar a composição e as propriedades físicas do produto final. A razão de proteína: polímero no complexo é ajustável; com biotinilação moderada de polímero, proteína: polímero podem ser de 10:1 (peso/peso) ou mais e, inversamente, a razão pode ser 1:10 ou menos, se

tal for o interesse baseado em metas imunológicas. Adicionalmente, o tamanho da composição MAPS imunogênica pode ser ajustado pela escolha do tamanho do polímero. Os métodos de fabricar os MAPS possibilitam uma facilidade na  
5 combinação de proteínas e polímeros com pequena modificação. A multivalência possível do produto final, através da carga antígenos de proteínas múltiplos, a partir dos mesmos ou de diferentes patógenos (por exemplo, pneumococos e tuberculose), em construto imunogênico único,  
10 fornece uma composição que pode ser usada para diminuir o número de vacinas necessárias para imunizar um indivíduo contra mais de uma doença. Além disso, a composição de MAPS é altamente estável; se tornando dissociada apenas mediante ebulição e mantendo a imunogenicidade mesmo depois de  
15 vários meses a 4°C. A imunogenicidade do complexo de MAPS pode ser limitada pela estabilidade do componente de proteína ou peptídeo antigênico, cuja estabilidade pode ser estendida através da inclusão no complexo de MAPS. Os antígenos específicos aqui usados apresentaram estabilidade  
20 em temperatura ambiente e depois de pelo menos um ciclo de congelamento-descongelamento. Isto proporciona uma vantagem importante sobre as vacinas atuais que ficam comprometidos se a "cadeia de frio" não for mantida cuidadosamente.

Deste modo, um aspecto da presente invenção refere-se

a uma composição imunogênica compreendendo um polímero, pelo menos um antígeno de proteína ou peptídeo, e pelo menos um par de moléculas de afinidade complementar, em que o par de moléculas de afinidade complementar compreende uma  
5 molécula de primeira afinidade que se associa com o polímero e uma molécula de afinidade complementar que se associa com o antígeno de proteína ou peptídeo, de modo que, quando a molécula de primeira afinidade se associa com a molécula de afinidade complementar, ela liga  
10 indiretamente o antígeno ao polímero.

Em algumas formas de realização, a molécula de primeira afinidade é reticulada para o polímero com um reagente de reticulação, por exemplo, um reagente de reticulação selecionado dentre CDAP (tetrafluoroborato de  
15 1-ciano-4-dimetilaminopiridínio), EDC (cloridrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida), cianoboro-hidreto de sódio; brometo de cianogênio, ou bicarbonato de amônio/ácido iodoacético. Em algumas formas de realização, a molécula de primeira afinidade é reticulada para grupos  
20 funcionais carboxila, hidroxila, amino, fenoxila, hemiacetal, mercapto do polímero. Em algumas formas de realização, a molécula de primeira afinidade é ligada covalentemente ao polímero.

Em algumas formas de realização, a molécula de

primeira afinidade é a biotina ou um seu derivado, ou uma molécula com uma estrutura ou propriedade física semelhante como biotina, por exemplo, uma amina-PEG3-biotina ((+)-biotinilação-3-6, 9-trixaundecanodiamina) ou seu derivado.

5        Em algumas formas de realização, o antígeno de proteína ou peptídeo da composição imunogênica é uma proteína de fusão compreendendo a proteína ou peptídeo antigênico fusionado com a molécula de ligação de afinidade complementar. A fusão pode ser um construto genético, isto  
10      é, um peptídeo ou proteína de fusão recombinante. Em algumas formas de realização, um antígeno pode ser covalentemente fixado a uma proteína de fusão com a molécula de afinidade complementar. Em formas de realização alternativas, o antígeno é fixado não covalentemente à  
15      molécula de afinidade complementar.

      Em algumas formas de realização, a molécula de afinidade complementar é uma proteína de ligação à biotina ou um seu derivado ou uma porção funcional da mesma. Em algumas formas de realização, uma molécula de afinidade  
20      complementar é uma proteína, de tipo avidina ou um seu derivado ou uma porção funcional da mesma, por exemplo, mas não limitada a, rhizavidina ou um seu derivado. Em algumas formas de realização, uma molécula de afinidade complementar é avidina ou estreptavidina ou um derivado ou

porção funcional da mesma.

Em algumas formas de realização, um peptídeo de sinal de secreção está localizado no N-terminal da proteína de tipo avidina. Qualquer sequência de sinal conhecida dos  
5 versados na arte na técnica pode ser usada, e, em algumas formas de realização, a sequência de sinal é MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID NO: 2) ou um derivado ou porção funcional da mesma. Em algumas formas de realização, o antígeno pode ser fusionado a uma molécula de afinidade  
10 complementar através de um peptídeo ligador flexível, em que o peptídeo ligador flexível fixa o antígeno para a molécula de afinidade complementar.

Em algumas formas de realização, o componente de polímero do imunogênio compreende um polímero derivado de  
15 um organismo vivo, por exemplo, um polissacarídeo. Em algumas formas de realização, um polímero pode ser purificado e isolado a partir de uma fonte natural, ou seja, pode ser sintetizado como com uma composição/estrutura natural, ou pode ser um polímero  
20 sintético (por exemplo, com uma composição/estrutura artificial). Em algumas realizações, um polímero é derivado de um organismo selecionado do grupo que consiste em: bactérias, arqueobactérias, ou células eucarióticas, como fungos, insetos, plantas, ou quimeras dos mesmos. Em

algumas formas de realização, o polímero é um polissacarídeo derivado de uma bactéria patogênica. Em formas específicas, o polissacarídeo é um polissacarídeo capsular pneumocócico, um polissacarídeo da parede celular pneumocócico, ou um polissacarídeo de *Salmonella typhi* Vi.

Em algumas formas de realização, um polímero da composição imunogênica, como aqui descrito, é um polímero de cadeia ramificada, por exemplo, um polissacarídeo ramificado, ou, alternativamente, pode ser um polímero de cadeia linear, por exemplo, um polímero de cadeia única, por exemplo, polissacarídeo. Em algumas formas de realização, o polímero é um polissacarídeo, por exemplo, dextrano ou um derivado do mesmo. Em algumas formas de realização, um polímero, por exemplo, polissacarídeo de dextrano pode ter um peso molecular médio de 425kD-500kDa, inclusive, ou em algumas formas de realização, maior do que 500kDa. Em algumas formas de realização, um polímero, por exemplo, polissacarídeo de dextrano pode ter um peso molecular médio de 60kD-90kDa, inclusive, ou em algumas formas de realização, inferior a 70 kDa. O polímero de dextrano pode ser derivado de uma bactéria, tal como *Leuconostoc mesenteroides*.

Em algumas formas de realização, uma composição imunogênica, como aqui descrita compreende pelo menos 2

antígenos, ou pelo menos 3 antígenos, ou, pelo menos, 5 antígenos, ou entre 2-10 antígenos, ou entre 10-15 antígenos, ou entre 15-20 antígenos, ou entre 20-50 antígenos, ou entre 50-100 antígenos, ou mais de 100 antígenos, inclusive. Em algumas formas de realização, em que uma composição imunogênica, como aqui descrita compreende pelo menos 2 antígenos, os antígenos podem ser o mesmo antígeno ou pelo menos 2 antígenos diferentes. Em algumas formas de realização, os antígenos podem ser do mesmo ou de diferentes patógenos, ou podem ser diferentes epítomos ou de partes da mesma proteína antigênica, ou podem ser o mesmo antígeno que é específico para diferentes sorotipos ou variações sazonais do mesmo patógeno (por exemplo, vírus de influenza A, B, e C).

Em algumas formas de realização, uma composição imunogênica, como aqui descrito, compreende um antígeno a partir de um organismo patogênico ou de um tecido anormal. Em algumas formas de realização, o antígeno é um antígeno tumoral. Em algumas formas de realização, um antígeno pode ser, pelo menos, um antígeno selecionado dentre antígenos de patógenos ou parasitas, tais como os antígenos de *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* ou *M. tetanus*, *Bacillus anthracis*, HIV, antígenos da gripe sazonal ou epidêmicas (como H1N1 ou H5N1), *Bordetella*

coqueluche, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitides* ou *N. gonorrhoeae*, HPV, *Chlamydia trachomatis*, HSV ou outros vírus de herpes, ou *Plasmodia* sp. Estes antígenos podem incluir peptídeos, proteínas, glicoproteínas, ou polissacarídeos. Em algumas formas de realização, o antígeno é um toxóide ou porção de uma toxina.

Em algumas formas de realização, uma composição imunogênica, como aqui descrito, compreende um polissacarídeo antigênico, por exemplo, tal como o antígeno Vi (polissacarídeo capsular de *Salmonella typhi*), polissacarídeos capsulares pneumocócicos, polissacarídeos de parede celular pneumocócicos, polissacarídeo capsular Hib (*Haemophilus influenzae* tipo B), polissacarídeo capsular meningocócico, polissacarídeo de *Bacillus anthracis* (o agente causador de antraz), e outros polissacarídeos capsulares ou de rede celular bacterianos, ou quaisquer combinações dos mesmos. O polissacarídeo pode ter um componente de proteína, por exemplo, uma glicoproteína, como aquelas a partir de vírus.

Em algumas formas de realização, uma composição imunogênica, como aqui descrito, compreende ainda pelo menos um fator de co-estimulação associado com o polímero ou polissacarídeo, em que o fator de co-estimulação pode ser associado diretamente ou indiretamente. Por exemplo, em



algumas formas de realização, um fator co-estimulação pode ser fixado covalentemente ao polímero. Por exemplo, em algumas formas de realização, um elemento de co-estimulação pode ser covalentemente fixado à molécula de primeira afinidade, o qual é então reticulado com o polímero. Por exemplo, em algumas formas de realização, um elemento de co-estimulação pode ser fixado a uma molécula de afinidade complementar, que se associa com uma molécula de primeira afinidade para ligar o fator de co-estimulação ao polímero.

Em algumas formas de realização, um fator co-estimulação é um adjuvante. Em formas de realização alternativas, um fator co-estimulatório pode ser qualquer um conhecido do versado na arte, e inclui qualquer combinação, por exemplo, sem limitação, agonistas do receptor de tipo Toll (agonistas de TLR2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, etc), agonistas de NOD, ou agonistas de inflamassoma.

Outro aspecto da presente invenção relaciona-se com o uso da composição imunogênica, como aqui descrito, para ser administrada a um indivíduo para induzir uma resposta imune no indivíduo. Em algumas formas de realização, a resposta imune é uma resposta de anticorpo/células B, uma resposta de células T CD4<sup>+</sup> (incluindo Th1, Th2 e Th17) e/ou uma resposta de células T CD8<sup>+</sup>. Em algumas formas de realização, pelo menos, um adjuvante é administrado em

conjunto com a composição imunogênica.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para induzir uma resposta imune em um indivíduo a pelo menos um antígeno, compreendendo a administração ao  
5 indivíduo da composição imunogênica, como aqui descrito.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método de vacinação de um animal, por exemplo, um pássaro, um mamífero ou um humano, contra pelo menos um antígeno, compreendendo a administração de uma composição de vacina  
10 que compreende a composição imunogênica, como aqui descrito.

Em todos os aspectos, como aqui mostrado, um animal ou um indivíduo pode ser um humano. Em algumas formas de realização, o indivíduo pode ser um animal de criação  
15 agrícola ou não doméstico, ou um animal doméstico. Em algumas formas de realização, uma composição de vacina que compreende a composição imunogênica como aqui descrita pode ser administrada por via subcutânea, intranasal, bucal, sublingual, vaginal, retal, intradérmica, intraperitoneal,  
20 intramuscular, ou adesivo para imunização transcutânea.

Em todos os aspectos, como aqui mostrado, uma resposta imune é uma resposta da anticorpo/célula B, uma resposta das células T CD4<sup>+</sup> (incluindo respostas Th1, Th2 e Th17) ou uma resposta de células T CD8<sup>+</sup> contra o(s) antígeno(s) de

proteína/peptídeo. Em algumas formas de realização, uma resposta imune é uma resposta de anticorpo/célula B contra o polímero, por exemplo, um polissacarídeo pneumocócico. Em algumas formas de realização, pelo menos, um adjuvante é administrado em conjunto com a composição imunogênica.

Outro aspecto da presente invenção relaciona-se com o uso da composição imunogênica, como aqui descrito, para uso em um diagnóstico para exposição a um patógeno ou agente imunogênico.

É aqui também fornecido um método de vacinação de um indivíduo, por exemplo, um mamífero, por exemplo, um humano, com as composições imunogênicas, como aqui descrito, o método compreendendo a administração de uma composição de vacina, como aqui descrito, para o indivíduo.

Geralmente, as composições imunogênicas e composições compreendendo um complexo imunogênico podem compreender pelo menos um antígeno, ou antígenos múltiplos, fixados a um andaime de polímero para uso na elicitação de uma resposta imune a cada um dos antígenos fixados ao polímero, e opcionalmente ao próprio polímero, quando administrado a um indivíduo. Este sistema apresentando antígenos múltiplos (MAPS) estimula uma resposta imune humoral e celular: ele pode gerar anticorpos anti-polissacarídeo e as respostas de célula- B/Th1/Th17 para antígenos de proteínas múltiplos

usando um único construto imunogênico MAPS. Uma combinação de imunidade de células B e T no organismo pode representar uma estratégia de vacina ótima contra muitas doenças, incluindo a infecção invasiva associada com a doença pneumocócica e transporte nasofaríngeal. Em algumas realizações, a composição imunogênica é uma vacina ou é incluída em uma vacina.

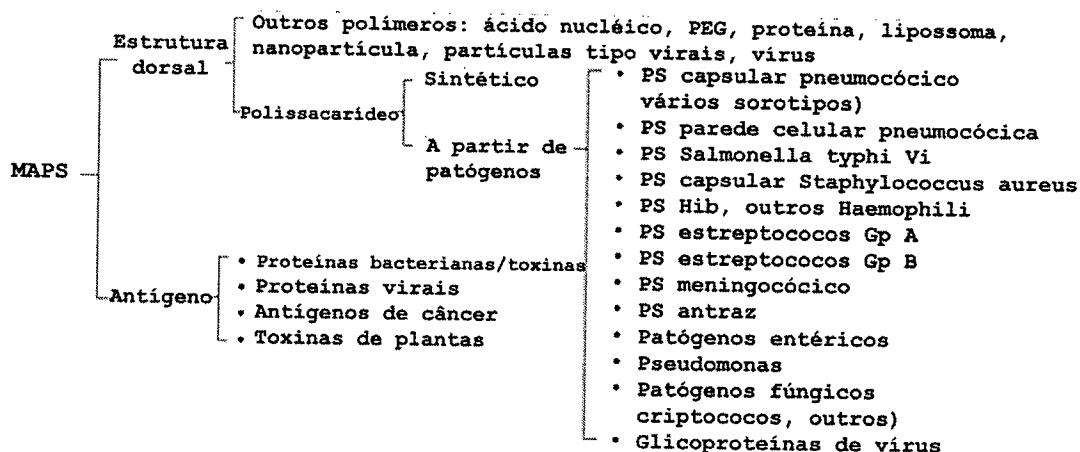
Deste modo, um aspecto da presente invenção refere-se a uma composição imunogênica (sistema apresentando antígenos múltiplos, ou MAPS) compreendendo pelo menos um polímero, por exemplo, um polissacarídeo, pelo menos, um antígeno de proteína ou peptídeo, e pelo menos uma par de moléculas de afinidade complementar compreendendo (i) uma molécula de primeira afinidade associada com o polímero, e (ii) uma molécula de afinidade complementar associada com o antígeno, que serve para fixar indiretamente o antígeno para o polímero (por exemplo, a molécula de primeira afinidade se associa com a molécula de afinidade complementar para ligar o antígeno ao polímero). Assim, como o polímero pode ser usado como um andaime para fixar, pelo menos, 1, ou, pelo menos, 2, ou mais de um (por exemplo, uma pluralidade) dos mesmos ou diferentes antígenos. As composições imunogênicas, como aqui descrito, podem ser usadas para elicitar tanto a imunidade humoral

como celular para antígenos múltiplos ao mesmo tempo.

Consequentemente, as formas de realização aqui fornecem uma composição imunogênica e métodos utilizáveis para criar uma resposta imune em um indivíduo, que podem ser usados sozinhos ou em conjunto ou em mistura com, essencialmente, quaisquer abordagens de vacinas existentes.

O MAPS é uma composição flexível e versátil que pode ser projetada e fabricada de forma a elicitar um alvo particular, de largo espectro, ou uma variedade de alvos antigênicos. A Tabela 1 apresenta um guia simples de exemplo prevendo a flexibilidade de formas de realização de MAPS:

Tabela 1. Versatilidade da plataforma MAPS



### Polímeros

Um componente de MAP é constituído de uma "estrutura dorsal", tipicamente um polímero. O polímero pode ser

antigênico ou não antigênico. Ele pode ser feito de uma ampla variedade de substâncias, como aqui descrito, com a ressalva de que o polímero serve como um meio de apresentação ao(s) antígeno(s) associado(s) para o sistema

5 imune de uma forma imunogênica. Em algumas formas de realização, o polímero é um polímero sintético. Em algumas formas de realização, o polímero é um polímero de ocorrência natural, por exemplo, um derivado de polissacarídeo ou purificado a partir de células

10 bacterianas. Em algumas formas de realização, o polissacarídeo é derivado ou purificado a partir de células eucarióticas, por exemplo, células de plantas, fungos, ou insetos. Em ainda outras formas de realização, o polímero é derivado de células de mamífero, tais como células

15 infectadas por vírus ou células de câncer. Em geral, estes polímeros são bem conhecidos na arte e são englobados para uso nos métodos e composições, como aqui descrito.

Em algumas formas de realização, um polímero é um polissacarídeo selecionado dentre qualquer um dos

20 seguintes, dextrano, polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*, polissacarídeo capsular pneumocócico, polissacarídeo da parede celular pneumocócico (CWPS), polissacarídeo meningocócico, polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b, ou qualquer outro polissacarídeo de origem viral,

procariótica ou eucariótica.

Em algumas formas de realização, o polissacarídeo consiste em, ou compreende uma porção de açúcar antigênico. Por exemplo, em algumas formas de realização, um  
5 polissacarídeo para uso nos métodos e composições imunogênicas, como aqui descrito, é um polissacarídeo Vi de *Salmonella typhi*. O polissacarídeo capsular Vi foi desenvolvido contra infecções entéricas bacterianas, tais como a febre tifóide. Robbins et al., 150 J. Infect. Dis.  
10 436 (1984); Levine et al., 7 Baillieres Clin. Gastroenterol. 501 (1993). Vi é um polímero de ácido  $\alpha$  1  $\rightarrow$  4-galacturônico, com uma N-acetila na posição C-2 e O-acetilação variável em C-3. A virulência de *S. typhi* se correlaciona com a expressão desta molécula. Sharma et al.,  
15 PNAS 101 17492 (2004). A vacina de polissacarídeo Vi para *S. typhi* tem várias vantagens: Os efeitos colaterais são raros e suaves, uma dose única produz imunogenicidade consistente e eficaz. Polissacarídeo Vi pode ser padronizado de forma segura por meio de métodos físico-  
20 químicos verificados para outras vacinas de polissacarídeos, Vi é estável em temperatura ambiente e que pode ser administrado em simultâneo com outras vacinas, sem afetar a imunogenicidade e tolerabilidade. Azze et al., 21 Vaccine 2758 (2003).

Assim, o polissacarídeo Vi de *S. typhi* pode ser reticulado a uma molécula de primeira afinidade, como aqui descrito, para a fixação de, pelo menos, um antígeno para o polissacarídeo. Em algumas formas de realização, o antígeno  
5 pode ser do mesmo ou de outro organismo, de tal modo que a composição imunogênica resultante confere, pelo menos, algum nível de imunidade contra um patógeno, ou dois patógenos diferentes: se o antígeno confere proteção contra o pneumococo, uma composição imunogênica, onde o andaime do  
10 polímero é um polissacarídeo Vi pode criar uma resposta imunogênica contra ambos *S. typhi* e pneumococos. Outros exemplos incluem a combinação de açúcares a partir de bactérias encapsuladas (como meningococos, *S. aureus*, pneumococos, Hib, etc) e os antígenos de tuberculose, para  
15 proporcionar uma composição imunogênica que cria uma resposta imune contra dois patógenos diferentes.

Outras porções de polissacarídeos (PS) que podem ser usadas na presente invenção, em alternativa a dextrano, polissacarídeos da parede celular bacterianos (CWPS), etc,  
20 incluem antígenos de carboidratos de cânceres.

Além disso, em relação a polissacarídeos de pneumococos, o polissacarídeo pode ser derivado a partir de qualquer um dos mais de 93 sorotipos de pneumococos que foram identificadas até agora, por exemplo, incluindo, mas



não se limitando aos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, e 33F. Sorotipos adicionais podem ser identificados e incluídos na presente composição imunogênica, como aqui descrito. Mais de um polissacarídeo pneumocócico pode ser incluído como a estrutura dorsal do polímero das presentes composições imunogênicas ou em uma vacina compreendendo as presentes composições de MAPS.

O polissacarídeo pode também ser derivado da invenção, a composição imunogênica compreendendo polissacarídeos capsulares de *N. meningitidis* de, pelo menos, um, dois, três ou quatro dos sorogrupos A, C, W, W135, ou Y.

Outra forma de realização compreende o Tipo 5, Tipo 8, ou qualquer um dos polissacarídeos ou oligossacarídeos de *Staphylococcus aureus*.

Em algumas formas de realização, o polímero é polímero quimérico compreendendo mais do que um tipo de polímero. Por exemplo, um polímero da composição imunogênica, como aqui descrito, pode compreender uma porção de polímero A, e a porção restante do polímero B. Não existe um limite para a quantidade de diferentes tipos de polímeros que podem ser usados em uma única entidade de estrutura dorsal de MAPS. Em algumas formas de realização, em que o polímero é um polímero ramificado, a cadeia de polímero pode ser um

polímero, e as ramificações podem ser, pelo menos, 1 ou, pelo menos, 2 ou, pelo menos, 3 ou mais polímeros diferentes.

Em algumas formas de realização, o polímero é um polímero ramificado. Em algumas formas de realização, o polímero é um polímero de cadeia única.

Em algumas formas de realização, o polímero é um polissacarídeo compreendendo pelo menos 10 unidades de repetição de carboidratos, ou pelo menos 20, ou pelo menos 50, ou pelo menos 75, ou pelo menos 100, ou pelo menos 150, ou pelo menos 200, ou pelo menos 250, ou pelo menos 300, ou pelo menos 350, ou pelo menos 400, ou pelo menos 450, ou pelo menos 500, ou mais do que 500 unidades de repetição, inclusive.

Em um aspecto da invenção, o polissacarídeo (PS) pode ter uma massa molecular de  $<500\text{kDa}$  ou  $> 500\text{kDa}$ . Em outro aspecto da invenção, o PS tem uma massa molecular de  $<70\text{ kDa}$ .

Em algumas formas de realização, um polímero é um polímero de peso molecular grande, por exemplo, um polímero pode ter um peso molecular médio de entre cerca de 425-500kDa, inclusive, por exemplo, pelo menos 300kDa, ou, pelo menos, 350kDa, ou pelo 400kDa menos, ou, pelo menos, 425kDa, ou, pelo menos, 450kDa, ou, pelo menos, 500kDa ou

mais do que 500kDa, inclusive, mas tipicamente menos do que 500kDa.

Em algumas formas de realização, um polímero pode ser um polímero de pequeno peso molecular, por exemplo, um polímero pode ter um peso molecular médio de entre cerca de 5 60kDa a cerca de 90 kDa, por exemplo, pelo menos 50 kDa, ou, pelo menos, 60kDa, ou a pelo menos 70 kDa, ou, pelo menos, 80 kDa, ou, pelo menos, 90 kDa, ou, pelo menos, 100 kDa, ou superior a 100 kDa, inclusive, mas geralmente menos 10 do que cerca de 120kDa.

Em algumas formas de realização, o polímero é coletado e purificado a partir de uma fonte natural, e em outras formas de realização, o polímero é sintético. Métodos para a produção de polímeros sintéticos, incluindo 15 polissacarídeos sintéticos, são conhecidos por versados na arte e estão englobados nas composições e métodos como aqui descrito.

Apenas alguns dos polímeros de polissacarídeos, que podem servir como uma estrutura dorsal de um ou mais tipos 20 de antígenos ou antígenos são exemplificados na Tabela 2: Tabela 2. Exemplo de estrutura dorsal de MAPS de polímero de polissacarídeo e antígenos de exemplo associados

Polissacarídeo	Antígenos de proteína	
	Número de antígenos	Origens de antígenos

Dextrano	D90 (60-90KD)	dois	pneumococo
	D150 (150 KD)	três	pneumococo
	D270 (270 KD)	três	pneumococo
	D500 (425-575 KD)	Dois, três, seis	pneumococo
Polissacarídeo capsular pneumocócico	Sorotipo 1	Um, dois, três, cinco	pneumococo, tuberculose, estafilococo
	Sorotipo 3	cinco	pneumococo, tuberculose
	Sorotipo 5	um; dois; três; cinco	pneumococo, tuberculose
	Sorotipo 6B	dois	pneumococo
	Sorotipo 7	três	pneumococo
	Sorotipo 14	um; dois; três; cinco	pneumococo, tuberculose
	Sorotipo 19	três	pneumococo
polissacarídeo de parede celular pneumocócico		cinco	pneumococo
Polissacarídeo Vi de <i>S. typhi</i>		cinco	pneumococo

Polímeros adicionais que podem ser usados nas composições da MAPS imunogênicas aqui descritas incluem os polímeros à base de polietileno glicol, poli (orto ésteres), suportes de Poliacril, PLGA, polietilenimina (PEI), poliamidoamina (PAMAM), dendrímeros, polímeros de éster  $\beta$ -amino, polifosfoéster (PPE), lipossomas, polimerosomas, ácidos nucleicos, oligonucleotídeos fosforotioados, quitosana, seda, micelas poliméricas, polímeros de proteínas, partículas de vírus, partículas de tipo vírus (VLPs-partículas) ou outras micro-partículas. Ver, por exemplo, El-Sayed et al., *Smart Polymer Carriers for Enhanced Intracellular Delivery of Therapeutic Molecules*, 5 Exp. Op. Biol. Therapy, 23 (2005). Polímeros biocompatíveis, desenvolvidos para distribuição de ácido

nucléico podem ser adaptados para uso como uma estrutura dorsal aqui. Ver, por exemplo, BIOCOMPATIBLE POL. NUCL. ACID. DELIV. (Domb et al., eds., John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, 2011.

5 Por exemplo, VLPs se assemelham a vírus, mas não são infecciosos, porque não contém qualquer material genético viral. A expressão, incluindo a expressão recombinante de proteínas estruturais virais, tais como componentes do envelope ou capsídeos, pode resultar na auto-montagem de  
10 VLPs. VLPs foram produzidos a partir de componentes de uma ampla variedade de famílias de vírus, incluindo Parvoviridae (por exemplo, vírus adeno-associado), Retroviridae (por exemplo, HIV), e Flaviviridae (por exemplo, vírus de hepatite B ou C). VLPs podem ser  
15 produzidos em uma variedade de sistemas de cultura de células de incluindo linhagens celulares de mamíferos, linhagens celulares de inseto, leveduras e células de plantas. VLPs recombinantes são particularmente vantajosos porque o componente viral pode ser fusionado a antígenos  
20 recombinantes, como aqui descrito.

### Antígenos

As proteínas de fusão e composições imunogênicas, como aqui descrito, podem compreender qualquer antígeno que elícita uma resposta imune em um indivíduo. Em algumas

formas de realização, pelo menos, um ou mais antígenos estão associados com o polímero da composição. Em algumas formas de realização, pelo menos 2, ou pelo menos 3, ou pelo menos 5, ou pelo menos 10, ou pelo menos 15, ou pelo menos 20, ou pelo menos 50, ou pelo menos 100, ou mais do que 100 antígenos podem ser associados com o polímero, como aqui descrito. Em algumas formas de realização, em que a composição imunogênica compreende mais do que um antígeno, os antígenos podem ser o mesmo antígeno, ou podem ser uma variedade de diferentes antígenos associados com o polímero. Em algumas formas de realização, em que a composição imunogênica compreende mais do que um antígeno, os antígenos podem ser antígenos do mesmo patógeno, ou de diferentes patógenos, ou, alternativamente, podem ser antígenos diferentes do mesmo patógeno, ou antígenos similares a partir de diferentes sorotipos de patógenos.

Um antígeno para uso em proteínas de fusão composições imunogênicas e métodos aqui descritos pode ser qualquer antígeno, incluindo, mas não se limitando a peptídeos patogênicos, toxinas, toxóides, subunidades dos mesmos, ou suas combinações (por exemplo, toxina da cólera, toxóide de tétano).

Em algumas formas de realização, um antígeno, que pode ser fusionado com a molécula de afinidade complementar,

pode ser qualquer antígeno associado com uma doença infecciosa, ou câncer ou doença imune. Em algumas formas de realização, um antígeno pode ser um antígeno expressado por qualquer um de uma variedade de agentes infecciosos, incluindo vírus, bactéria, fungo ou parasita.

Em algumas formas de realização, um antígeno é derivado (por exemplo, obtido) a partir de um organismo patogênico. Em algumas formas de realização, o antígeno é um antígeno do câncer ou tumor, por exemplo, um antígeno derivado de um tumor ou célula de câncer.

Em algumas formas de realização, um antígeno derivado de um organismo patogênico é um antígeno associado a uma doença infecciosa, ele pode ser derivado de qualquer um de uma variedade de agentes infecciosos, incluindo vírus, bactéria, fungo ou parasita.

Em algumas formas de realização, um antígeno alvo é qualquer antígeno associado com uma patologia, por exemplo, uma doença infecciosa ou patógeno, ou câncer ou uma doença imune, tal como uma doença auto-imune. Em algumas formas de realização, um antígeno pode ser expressado por qualquer um dentre uma variedade de agentes infecciosos, incluindo vírus, bactéria, fungo ou parasita. Um antígeno alvo para uso nos métodos e composições, como aqui divulgados, também pode incluir, por exemplo, peptídeos patogênicos, toxinas,

toxóides, subunidades dos mesmos, ou suas combinações (por exemplo, toxina da cólera, toxóide do tétano).

Exemplos não limitativos de vírus infecciosos incluem:

*Retroviridae*; *Picornaviridae* (por exemplo, vírus de pólio, vírus da hepatite A; enterovírus, vírus coxsackie, rinovírus, echovírus humanos); *Calciviridae* (tais como as cepas que causam gastroenterite); *Togaviridae* (por exemplo, vírus da encefalite equina, vírus da rubéola); *Flaviridae* (por exemplo, vírus da dengue, vírus da encefalite, vírus da febre amarela); *Coronaviridae* (por exemplo, coronaviruses); *Rhabdoviridae* (por exemplo, vírus da estomatite vesicular, vírus da raiva); *Filoviridae* (por exemplo, vírus ebola); *Paramyxoviridae* (por exemplo, vírus da parainfluenza, vírus da caxumba, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório); *Orthomyxoviridae* (por exemplo, vírus da gripe); *Bunyaviridae* (por exemplo, vírus Hantaan, vírus bunga, flebovírus e vírus Nairo); *Arenaviridae* (vírus da febre hemorrágica); *Reoviridae* (por exemplo, reovírus, orbivírus, e rotavírus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (vírus da hepatite B); *Parvoviridae* (parvovírus); *Papovaviridae* (vírus do papiloma, vírus polioma); *Adenoviridae* (a maioria dos adenovírus); *Herpesviridae* (vírus do herpes simplex (HSV) 1 e HSV-2, vírus da varicela zoster, citomegalovírus (CMV), vírus da



doença de Marek, vírus do herpes); *Poxviridae* (vírus da  
varíola, vírus da vacina, vírus da varíola); e *Iridoviridae*  
(como o vírus da peste suína africana), e vírus não  
classificados (por exemplo, os agentes etiológicos de  
5 encefalopatias espongiformes, o agente da hepatite delta  
(provavelmente um satélite defeituoso de vírus da hepatite  
B), os agentes de hepatite não-A, não-B (classe 1 =  
transmitido internamente; classe 2 = transmitido  
parenteralmente (isto é, Hepatite C); vírus Norwalk e  
10 relacionados, e astrovírus). As composições e métodos aqui  
descritos são contemplados para uso no tratamento de  
infecções com estes agentes virais.

Exemplos de infecções fúngicas que podem ser tratadas  
pela inclusão de antígenos nas presentes formas de  
15 realização incluem aspergilose, candidíase (causada por  
*Candida albicans*); criptococose (causada por *Cryptococcus*);  
e histoplasmose. Assim, exemplos de fungos infecciosos  
incluem, mas não estão limitados a, *Cryptococcus*  
*neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*,  
20 *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida*  
*albicans*. Os componentes destes organismos podem ser  
incluídos como antígenos nos MAPS aqui descritos.

Em um aspecto da invenção, um antígeno é derivado de  
um micróbio infeccioso como *Bordetella pertussis*,  
*coqueluche*,

*Brucella*, *Enterococci* sp., *Neisseria meningitidis*,  
*Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella*, *Haemophilus* tipável ou não  
tipável, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*,  
*Citrobacter*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*,  
5 *Clostridia*, *Bacteroides*, *Chlamydiaceae*, *Vibrio cholera*,  
*Mycoplasma*, *Treponemes*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella*  
*pneumophila*, *Mycobacteria* sps (tais como *M. tuberculosis*,  
*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. graxonae*, *M.*  
*leprae*), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*,  
10 *Streptococcus pyogenes* (Estreptococo Grupo A),  
*Streptococcus agalactiae* (Estreptococo Grupo B),  
*Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*,  
*Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps. anaeróbico),  
*Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patogênico,  
15 *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus*  
*anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium*  
sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*,  
*Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella*  
*pneumoniae*, *Leptospira* sps., *Pasturella multocida*,  
20 *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus*  
*moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, e  
*Actinomyces israeli*. As composições e métodos aqui  
descritos são contemplados para uso no tratamento ou  
prevenção de infecções contra estes agentes bacterianas.

Patógenos parasitas adicionais a partir do qual os antígenos podem ser derivados incluem, por exemplo: *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii*, *Rickettsia*, e *Helminths*.

5        Em outro aspecto da invenção, um antígeno é uma proteína PsaA pneumocócica truncada, serina/treonina proteína quinase pneumocócica toxóide de pneumolisina (StkP), unidade de repetição de serina /treonina proteína quinase pneumocócica (StkPR), proteína PcsB pneumocócica, 10 alfa hemolisina estafilocócica, mtb proteína ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*, antígeno do núcleo da parede celular de *M. tuberculosis*, polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos CT144, CT242 ou CT812 de *Chlamydia*, DNA girase subunidade B de *Chlamydia*, síntese de sulfito / bifosfato 15 fosfatase de *Chlamydia*, FtsY de proteína divisão celular de *Chlamydia*, metionil-tRNA sintetase de *Chlamydia*, DNA helicase de *Chlamydia* (uvrD), ATP subunidade sintase I (atpI) de *Chlamydia* ou hidrolase dependente de metais de *Chlamydia*.

20        Uma forma de realização da presente invenção fornece uma composição imunogênica alvo-marcando o patógeno *Myocobacterium tuberculosis* (TB), um parasita intracelular bacteriano. Um exemplo de um antígeno de TB é TbH9 (também conhecido como Mtb 39A). Outros antígenos de TB incluem,

mas não estão limitados a, DPV (também conhecido como Mtb8.4), 381, Mtb41, Mtb40, Mtb32A, Mtb64, Mtb83, Mtb9.9A, Mtb9.8, Mtb16, Mtb72f, Mtb59f, Mtb88f, Mtb71f, Mtb46f e Mtb31f, em que "f" indica que é uma fusão de duas ou mais proteínas.

Como mencionado acima, um antígeno pode ser derivado a partir de uma espécie de *Chlamydia* para uso nas composições imunogênicas da presente invenção. *Chlamydiaceae* (consistindo de *Chlamydiae* e *Chlamydophila*) são as bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias. As infecções provocadas por *Chlamydia trachomatis* estão entre as infecções bacterianas sexualmente transmissíveis mais prevalentes e, talvez, 89 milhões de novos casos de infecções genitais por *Chlamydia* ocorrem a cada ano. A *Chlamydia* da presente invenção inclui, por exemplo, *C. trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *C. muridarum*, *C. suis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila pecorum*, e *C. pneumoniae*. Os modelos animais de infecção por clamídia têm estabelecido que as células T desempenham um papel crítico tanto na depuração da infecção inicial como na proteção de re-infecção de hospedeiros suscetíveis. Assim, as composições imunogênicas, como aqui descrito, podem ser usadas para fornecer o valor determinado por

elicitaco das respostas imunes celulares contra a infecção clamidiana.

Mais especificamente, os antígenos *Chlamydia* teis na presente invenção incluem DNA girase subunidade B, síntese  
5 de sulfito/ bifosfato fosfatase, proteína de divisão celular FtsY, metionil-tRNA sintetase, DNA helicase (uvrD); ATP sintase subunidade I (atpI) ou uma hidrolase dependente de metal (pedido de patente U.S. Pub. No. 20090028891). Antígenos de *Chlamydia trachomatis* adicionais incluem  
10 polipeptídeo CT144, um peptídeo com resíduos de aminoácidos 67-86 de CT144, um peptídeo com resíduos de aminoácidos 77-96 de CT144, proteína CT242, um peptídeo tendo aminoácidos 109-117 de CT242, um peptídeo tendo aminoácidos 112-120 de CT242 polipeptídeo, proteína CT812 (do gene *pmpD*), um  
15 peptídeo com resíduos de aminoácidos 103-111 da proteína CT812; e vários outros peptídeos antigênicos a partir de *C. trachomatis*: NVTQDLTSSTAKLECTQDLI (SEQ ID NO:29), AKLECTQDLIAQGKLIVTNP (SEQ ID NO:30), SNLKRMQKI (SEQ ID NO:31), AALYSTEDL (SEQ ID NO:32), FQEKDADTL (SEQ ID NO:33),  
20 QSVNELVYV (SEQ ID NO:34), LEFASCSSL (SEQ ID NO:35), SQAEGQYRL (SEQ ID NO:36), GQSVNELVY (SEQ ID NO:37), e QAVLLLDQI (SEQ ID NO:38). Ver WO 2009/020553. Adicionalmente, antígenos de *Chlamydia pneumoniae* incluindo os homólogos dos polipeptídeos anteriores (ver Patente US

No. 6.919.187), podem ser usados como antígenos nas composições imunogênicas e métodos como aqui descritos.

Antígenos fúngicos podem ser derivados de espécies de *Candida* e outras leveduras, ou outros fungos (*Aspergillus*, outros fungos ambientais). Em relação a outros parasitas, malária, bem como vermes e amebas podem fornecer o antígeno antigênico para uso nas composições imunogênicas e métodos como aqui descrito.

Em algumas formas de realização, em que o antígeno se destina a gerar um imunogênio anti-influenza, as glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) são, geralmente, os antígenos de escolha. Ambas as nucleoproteínas (NP) polipeptídeo e matriz (M) são proteínas virais internas e, portanto, não geralmente considerados no projeto de vacinas para imunidade com base em anticorpos. Vacinas contra influenza são usadas rotineiramente em seres humanos, e incluem as vacinas derivadas de vírus de influenza completo inativado, vírus de influenza atenuado vivo, ou materiais purificados e inativados a partir de cepas virais. Por exemplo, uma vacina contra influenza tradicional pode ser fabricada usando três cepas potencialmente ameaçadoras do vírus da gripe. Essas cepas são tipicamente cultivadas em ovos de galinha fertilizados, o que exige um processamento extenso,

incluindo a inoculação e incubação de ovos, a colheita de ovos, purificação e inativação do vírus, processamento e reunião do vírus ou componentes virais para a formulação da vacina final, e a colocação asséptica em recipientes  
5 apropriados. Tipicamente, este ciclo de produção à base de ovos leva mais de 70 semanas. No evento de uma epidemia de gripe, a disponibilidade de uma vacina potente e segura é uma grande preocupação. Além disso, há riscos associados com as impurezas em ovos, tais como os antibióticos e  
10 contaminantes, que impactam negativamente a esterilidade da vacina. Além disso, as vacinas de gripe derivadas de ovos são contra-indicadas para pessoas com alergias graves a proteínas do ovo e pessoas com histórico de síndrome de Guillain-Barré. A presente invenção proporciona uma  
15 alternativa para as vacinas contra a gripe à base de ovos, não somente evitando as sequelas relacionadas com ovos, mas fornecendo uma plataforma para o uso de antígenos de influenza múltiplos em uma plataforma altamente controlada.

Em algumas formas de realização, um antígeno para uso  
20 em composições imunogênicas como aqui divulgadas pode também incluir os usados em guerra biológica, tal como ricina, que pode provocar uma resposta CMI.

Adicionalmente, a presente invenção também fornece composições imunogênicas compreendendo antígenos que criam

uma resposta imune contra câncer. Nestes conjugados, um antígeno é um antígeno expressado por um câncer ou tumor, ou derivado de um tumor. Em algumas formas de realização, estes antígenos são referidos aqui como um "antígeno de  
5 câncer" e são tipicamente uma proteína expressada predominantemente sobre as células de câncer, de tal modo que o conjugado elícita tanto uma imunidade humoral potente como celular potente para esta proteína. Um grande número de antígenos associados ao câncer foram identificados,  
10 alguns dos quais estão sendo agora usados para fazer vacinas experimentais para o tratamento de câncer e são, portanto, adequados para o uso nas presentes formas de realização. Antígenos associados com mais do que um tipo de câncer incluem antígeno carcinoembrionário (CEA); antígenos  
15 do câncer/ testículo, como NY-ESO-1; mucina-1 (MUC1), tais como Sialyl Tn (STN); gangliosídeos, tais como GM3 e GD2; proteína p53 e proteína HER2/neu (também conhecida como ERBB2). Antígenos singulares para um tipo específico de câncer incluem uma forma mutante do receptor do fator de  
20 crescimento epidérmico, chamado EGFRvIII, antígenos de diferenciação de melanócitos/melanoma, tais como tirosinase, MART1, gp100, a linhagem relacionada com o grupo câncer/ testículo com o do (MAGE) e antígenos relacionados com tirosinase; antígeno específico da



próstata; antígenos associados com leucemia (LAAs), tais como a proteína de fusão BCR -ABL, proteína de tumor de Wilms e proteinase-3, e anticorpos idiótipo (Id). Ver, por exemplo, Mitchell, 3 Curr. Opin. Investig. Drugs 150 (2002); Dao & Scheinberg, 21 Best Pract. Res. Clin. Haematol. 391 (2008).

Outra abordagem na geração de uma resposta imune contra câncer emprega antígenos a partir de microorganismos que causam ou contribuem para o desenvolvimento de câncer. Estas vacinas têm sido usadas contra cânceres, incluindo carcinoma hepatocelular (vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, *Opisthorchis viverrin*), linfoma e carcinoma nasofaríngeal (vírus Epstein-Barr), câncer colorretal, câncer de estômago (*Helicobacter pylori*), câncer da bexiga (*Schistosoma hematobium*), leucemia de células T (vírus linfotrófico de células T humanas), câncer do colo do útero (papilomavírus humano), e outros. Até a presente data, foram realizados ensaios clínicos para vacinas alvo-marcando câncer de bexiga, tumores cerebrais, câncer da mama, câncer cervical, câncer do rim, melanoma, mieloma múltiplo, leucemia, câncer de pulmão, câncer pancreático, câncer de próstata e tumores sólidos. Ver Pardoll et al., ABELOFF'S CLIN. ONCOL. (4a. ed., Churchill Livingstone, Philadelphia 2008); Sioud, 360 Methods Mol. Bio. 277

(2007); Pazdur et al., 30 J. Infusion Nursing 30(3):173  
 (2007); Parmiani et al., 178 J. Immunol. 1975 (2007);  
 Lollini et al., 24 Trends Immunol. 62 (2003); Schlom et  
 al., 13 Clin. Cancer Res. 3776 (2007); Banchereau et  
 5 al., 392 Nature 245 (1998); Finn, 358 New Engl. J. Med.  
 2704 (2008); Curigliano et al., 7 Exp. Rev. Anticancer  
 Ther. 1225 (2007). Vírus da doença de Marek, vírus de  
 herpes que causa tumores em aves de criação, tem sido  
 controlados por vacina. Assim, as formas de realização  
 10 presentes englobam composições imunogênicas anti-câncer  
 tanto preventivas como profiláticas e vacinas para  
 tratamento/terapêutica de câncer

Doenças e cânceres proliferativos contemplados incluem  
 cânceres relacionados com AIDS, neuroma acústico, leucemia  
 15 linfocítica aguda, leucemia mielóide aguda, carcinoma  
 adenocístico, câncer adrenocortical, metaplasia mielóide  
 agnoscênica, alopecia, sarcoma de partes moles alveolares,  
 câncer anal, angiossarcoma, astrocitoma, ataxia -  
 telangiectasia, carcinoma basocelular (pele), câncer de  
 20 bexiga, câncer ósseo, câncer de intestino, tumores do  
 cérebro e SNC, câncer de mama, tumores carcinóides, câncer  
 cervical, tumores cerebrais na infância, câncer infantil, a  
 leucemia infantil, sarcoma do tecido mole infantil,  
 condrossarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica

crônica, leucemia mielóide crônica, câncer colorretal, linfoma de células T cutâneo, dermatofibrosarcoma-protuberante, tumor de células pequenas-redondas-desmoplásicas, carcinoma ductal, cânceres do sistema  
5 endócrino, câncer endometrial, ependimoma, câncer de esôfago, sarcoma de Ewing, câncer do ducto biliar extra-hepático, câncer de olho, incluindo, por exemplo, melanoma e retinoblastoma ocular, câncer de trompa de falópio, anemia de Fanconi, fibrossarcoma, câncer de vesícula  
10 biliar, câncer gástrico, cânceres gastrointestinais, tumor gastrointestinal-carcinóide, cânceres do trato geniturinário, tumores de células germinativas, doença gestacional trofoblástica, glioma, câncer ginecológico, malignidades hematológicas, leucemia de células pilosas,  
15 câncer de cabeça e pescoço, câncer hepatocelular, câncer de mama hereditário, doença de Hodgkin, câncer cervical relacionado com o vírus do papiloma humano, mola hidatiforme, câncer de hipofaringe, câncer de células da ilhota, sarcoma de Kaposi, câncer de rim, câncer de  
20 laringe, leiomiossarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, câncer de lábio, lipossarcoma, câncer de pulmão, linfedema, linfoma, linfoma não de Hodgkin, câncer de mama masculino, tumor-de-rim rabdóide maligno, meduloblastoma, melanoma, câncer de células de Merkel, mesotelioma, câncer

metastático, câncer de boca, neoplasia endócrina múltipla, fungóides de micose, síndromes mielodisplásicas, mieloma, distúrbios mieloproliferativos, câncer nasal, câncer de nasofaringe, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatose, síndrome de ruptura de Nijmegen, câncer de pele não-melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de cavidade oral, câncer de orofaringe, osteossarcoma, câncer de ovário de ostomia, câncer de pâncreas, câncer de seios paranasais, câncer de paratireóide, câncer de glândula parótida, câncer de pênis, tumores neuroectodérmicos periféricos, câncer da pituitária, policitemia vera, câncer de próstata, carcinoma de células renais, retinoblastoma, rabdomiossarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, câncer da glândula salivar, sarcoma, Schwannoma, síndrome de Sezary, câncer de pele, câncer de pulmão de células pequenas (SCLC), câncer de intestino delgado, sarcoma dos tecidos moles, tumores da medula espinhal, carcinoma de células escamosas, (pele), câncer de estômago, sarcoma sinovial, câncer testicular, câncer do timo, câncer de tireóide, câncer de célula transicional (bexiga), o câncer de célula transicional (renal pelve/uretra), câncer trofoblástico, câncer uretral, câncer do sistema urinário, sarcoma uterino, câncer de útero, câncer vaginal, câncer de vulva, macroglobulinemia

de Waldenstrom, e tumor de Wilms.

Em algumas formas de realização, um antígeno para uso em composições imunogênicas, como aqui descrito, pode incluir antígenos de doenças auto-imunes, por exemplo, eles  
5 podem ser "auto-antígenos". Doenças auto-imunes contempladas para diagnóstico de acordo com os testes aqui descritos incluem, mas não estão limitados a alopecia areata, espondilite anquilosante, síndrome de antifosfolipídeo, doença de Addison, anemia aplástica,  
10 esclerose múltipla, doença auto-imune da glândula adrenal, anemia hemolítica auto-imune, hepatite auto-imune, ooforite auto-imune e orquite, doença de Behçet, penfigóide bolhoso, cardiomiopatia, dermatite com psilose celíaca, síndrome da fadiga crônica, síndrome desmielinizante inflamatória  
15 crônica (CFIDS), polineuropatia inflamatória crônica, síndrome de Churg- Strauss, penfigóide cicatricial, síndrome de CREST, doença aglutinina fria, doença de Crohn, dermatite herpetiforme, lúpus discóide, crioglobulinemia mista essencial, fibromialgia, glomerulonefrite, doença de  
20 Grave, síndrome de Guillain-Barre, tiroidite de Hashimoto, fibrose pulmonar idiopática, trombocitopenia idiopática púrpura (PTI), nefropatia por IgA, diabetes insulino-dependente (Tipo I), líquen plano, lúpus, doença de Ménière, doença mista do tecido conjuntivo, miastenia

gravis, miocardite, pênfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, policondrite, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiosite e dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoríase, fenômeno de Raynaud, síndrome de Reiter, febre reumática, artrite reumatóide, sarcoidose, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome do homem rígido, arterite de Takayasu, arterite temporal/arterite de células gigantes, colite ulcerativa, uveíte, síndrome de Wegener, vasculite e vitiligo. Em geral, é importante avaliar a capacidade de resposta real ou potencial de CMI em indivíduos tendo, ou suspeitos de ter ou ser suscetíveis a uma doença auto-imune.

Em algumas formas de realização, um antígeno para uso em composições imunogênicas, como aqui descrito, pode ser um antígeno que está associado a uma doença ou situação inflamatória. Exemplos de condições de doenças inflamatórias em que os antígenos podem ser úteis incluem, mas não estão limitados a acne, angina, artrite, pneumonia por aspiração, empiema, gastroenterite, enterocolite necrosante, doença inflamatória pélvica, faringite, pleurite, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crônica, e polineuropatia desmielinizante

inflamatória crônica, entre outros.

Em algumas formas de realização, um antígeno pode ser um antígeno intacto (ou seja, inteiro ou completo), ou uma porção funcional de um antígeno que compreende mais do que um epítopo. Em algumas formas de realização, um antígeno é uma porção funcional de peptídeo de um antígeno. Por "intacto", neste contexto, entende-se que o antígeno é o antígeno de comprimento completo, como esse polipeptídeo de antígeno ocorre na natureza. Isto está em contraste direto com a distribuição de apenas uma pequena porção ou peptídeo do antígeno. A distribuição de um antígeno intacto a uma célula permite ou facilita a elicitação de uma resposta imune a uma ampla faixa de epítomos do antígeno intacto, em vez de apenas um único ou poucos epítomos peptídicos selecionados. Deste modo, os métodos e as composições imunogênicas aqui descritas englobam antígenos intactos associados com o polímero para uma especificidade mais sensível e maior da resposta imune, em comparação com o uso de um antígeno à base de peptídeo de epítopo único.

Alternativamente, em algumas formas de realização, um antígeno intacto pode ser dividido em várias partes, dependendo do tamanho do antígeno inicial. Tipicamente, quando um antígeno inteiro é um polipeptídeo multímero, a proteína completa pode ser dividida em sub-unidades e/ou

domínios em que cada sub-unidade ou domínio do antígeno podem estar associadas com o polímero de acordo com os métodos como aqui descritos. Alternativamente, em algumas formas de realização, um antígeno intacto pode ser dividido em fragmentos funcionais, ou partes, de todo o antígeno, por exemplo, pelo menos dois, ou pelo menos 3, ou pelo menos quatro, ou pelo menos 5, ou pelo menos 6, ou pelo menos sete, ou pelo menos oito, ou pelo menos nove, ou pelo menos 10, ou pelo menos 11, ou pelo menos 12, ou pelo menos 13, ou pelo menos 15, ou pelo menos 20, ou pelo menos 25, ou mais do que 25 partes (por exemplo, partes ou fragmentos), inclusive, e em que cada fragmento funcional individual do antígeno pode ser associado com o polímero de acordo com os métodos como aqui descritos.

A fragmentação ou a divisão de um polipeptídeo de antígeno de comprimento completo pode ser uma divisão igual do polipeptídeo de antígeno de comprimento completo, ou alternativamente, em algumas formas de realização, a fragmentação é assimétrica ou desigual. Como um exemplo não limitativo, em que um antígeno é dividido em dois fragmentos que se sobrepõem, um antígeno pode ser dividido em fragmentos de aproximadamente o mesmo tamanho (igual), ou alternativamente, um fragmento pode ser de cerca de 45% do antígeno completo e o outro fragmento pode ser de cerca



de 65%. Como outros exemplos não limitativos, um antígeno completo pode ser dividido em uma combinação de fragmentos de diferentes tamanhos, por exemplo, em que um antígeno é dividido em dois fragmentos, fragmentos podem ser divididos em cerca de 40% e cerca de 70%, ou cerca de 45% e cerca de 65%, ou cerca de 35% e cerca de 75%, ou cerca de 25% e cerca de 85%, inclusive, do antígeno completo. Qualquer combinação de fragmentos sobrepostos de um antígeno total de comprimento completo é englobado para uso na geração de um painel de polipeptídeos em sobreposição de um antígeno. Como um exemplo ilustrativo apenas, quando um antígeno é dividido em 5 porções, as porções podem ser igualmente divididas (isto é, cada fragmento de sobreposição tem cerca de 21% a 25% de todo o antígeno de comprimento completo) ou desigualmente (por exemplo, um antígeno pode ser divididos em cinco fragmentos em sobreposição seguintes; fragmento 1 de cerca de 25%, o fragmento 2 cerca de 5%, o fragmento 3 de cerca de 35%, o fragmento 4 cerca de 10% e o fragmento 5 de cerca de 25% do tamanho do antígeno de comprimento completo, desde que cada fragmento se sobreponha com pelo menos um outro fragmento).

Tipicamente, um painel de porções de antígeno pode cobrir substancialmente a totalidade do comprimento do polipeptídeo de antígeno completo (ou intacto). Portanto,

em algumas formas de realização, uma composição imunogênica compreende um polímero com muitos fragmentos diferentes, e/ou em sobreposição do mesmo antígeno intacto. Fragmentos de proteína em sobreposição de um antígeno podem ser produzidos muito mais rápido e econômico, e com uma maior estabilidade em comparação com o uso de antígenos de peptídeos sozinhos. Além disso, em algumas formas de realização, os antígenos que são polipeptídeos maiores do que os peptídeos simples são preferidos como conformação é importante para o reconhecimento de epítomos, e os polipeptídeos de antígenos ou fragmentos maiores irão proporcionar um benefício sobre os fragmentos de peptídeos.

Um versado na arte pode dividir um antígeno inteiro em proteínas em sobreposição de um antígeno para criar um painel de polipeptídeos do antígeno. Por meio de um exemplo ilustrativo apenas, o antígeno TB1 específico de TB (CFP também conhecido como filtrado de cultura-10 ou CFP-10) pode ser dividido em, por exemplo, pelo menos dezessete porções para gerar um painel de dezessete polipeptídeos diferentes, cada uma compreendendo um fragmento TB1 de antígeno específico para TB diferente porém em sobreposição (CFP). Proteína de filtrado de cultura (CFP-10) (GenBank AAC83445) é um fragmento de proteína de resíduos de 100 aminoácidos de 10 kDa de *M. tuberculosis*. É também

conhecida como proteína homóloga de antígeno L45 (LHP).

Um antígeno alvo para uso nos métodos e composições aqui descritos pode ser expressado por meios recombinantes, e pode incluir, opcionalmente, uma etiqueta de afinidade ou epítopo para facilitar a purificação, que são métodos bem conhecidos na arte. A síntese química de um oligopeptídeo, seja livre ou conjugado com proteínas suportes, pode ser usada para obter o antígeno da invenção. Oligopeptídeos são considerados um tipo de polipeptídeo. Um antígeno pode ser expressado como uma fusão com uma molécula de afinidade complementar, por exemplo, mas não se limitando a rhizavidina ou um fragmento ou derivado funcional desta. Em alternativa, também é possível preparar o antígeno alvo e, em seguida, conjugá-lo a uma molécula de afinidade complementar, por exemplo, mas não se limitando a rhizavidina ou um fragmento ou derivado funcional do mesmo.

Os polipeptídeos podem também ser sintetizados como estruturas ramificadas, tais como os mostrados nas Patentes US No. 5.229.490 e No. 5.390.111. Polipeptídeos antigênicos incluem, por exemplo, epítopos de células B células T sintéticos ou recombinantes, epítopos de células T universais, e epítopos de células T mistas de um organismo ou doença e epítopos de células B de outras.

Um antígeno pode ser obtido através de meios

recombinantes ou por síntese química de polipeptídeo, bem como antígeno obtido a partir de fontes naturais ou extratos, pode ser purificado por meio de características físicas e químicas do antígeno, tal como por fracionamento ou cromatografia. Estas técnicas são bem conhecidas na arte.

Em algumas formas de realização, um antígeno pode ser solubilizado em água, um solvente tal como metanol, ou um tampão. Os tampões adequados incluem, mas não estão limitados a, solução salina tamponada com fosfato de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  livre (PBS), solução salina normal (NaCl 150 mM em água), e tampão Tris. Antígeno não solúvel em tampão neutro pode ser solubilizado em 10 mM de ácido acético e, em seguida, diluído para o volume desejado com um tampão neutro tal como PBS. No caso de antígeno solúvel somente em pH ácido, acetato-PBS a um pH ácido pode ser usado como um diluente, após solubilização em ácido acético diluído. O glicerol pode ser um solvente não aquoso apropriado para uso nas composições, métodos e kits aqui descritos.

Tipicamente, no projeto de uma vacina de proteína contra um patógeno, uma proteína extracelular ou uma exposta a um meio ambiente em um vírus é muitas vezes o candidato ideal como o componente de antígeno na vacina. Os anticorpos gerados contra a proteína extracelular que

tornam a primeira linha de defesa contra o patogênico durante a infecção. Os anticorpos ligam-se à proteína sobre o patógeno para facilitar a opsonização do anticorpo e marcar o patógeno para ingestão e destruição por um fagócito tal como um macrófago. A opsonização do anticorpo também pode matar o patógeno por citotoxicidade celular dependente de anticorpos. O anticorpo dispara a liberação de produtos de lise a partir das células, como monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células assassinas naturais.

Em uma forma de realização da invenção aqui descrita, os antígenos para uso nas composições, como aqui descritas, incluem todas as proteínas de tipo selvagem, como resíduos de aminoácidos têm as sequências encontradas no vírus que ocorrem naturalmente e que não foram alterados por condições de crescimento seletivas ou métodos de biologia molecular.

Em uma forma de realização, as composições imunogênicas, como aqui descrito, podem compreender antígenos que são proteínas glicosiladas. Em outras palavras, um antígeno de interesse pode ser, cada, uma proteína glicosilada. Em uma forma de realização das composições imunogênicas como aqui descrito, antígenos, ou polipeptídeos de fusão de antígeno são glicosilados O-ligados. Em outra forma de realização, as composições

imunogênicas, antígenos, ou polipeptídeos de fusão de antígeno como aqui descritos são glicosilados N-ligados. Em ainda outra forma de realização das composições imunogênicas, como aqui descrito, antígenos ou fusão de antígeno são glicosilados tanto N-ligados como O-ligados. Em outras formas de realização, outros tipos de glicosilação são possíveis, por exemplo, C-manosilação. A glicosilação de proteínas ocorre predominantemente em células eucarióticas. N-glicosilação é importante para a duplicação de algumas proteínas eucarióticas, provendo um mecanismo de modificação de co-tradução e pós-tradução que modula a estrutura e função da membrana e das proteínas secretadas. A glicosilação é o processo enzimático que liga sacarídeos para produzir glicanos, e fixar os mesmos às proteínas e lipídeos. Em N-glicosilação, glicanos são fixados ao nitrogênio amida da cadeia lateral de asparagina durante a tradução da proteína. Os três principais sacarídeos que formam glicanos são moléculas de glicose, manose, e N-acetilglucosamina. O consenso de N-glicosilação é Asn-Xaa-Ser/Thr, onde Xaa pode ser qualquer um dos aminoácidos conhecidos. A glicosilação O-ligada ocorre em uma fase posterior, durante o processamento de proteínas, provavelmente no aparelho de Golgi. Em glicosilação O-ligada, N-acetil-galatosamina, O-fucose, O-glicose, e/ou N-

acetilglucosamina é adicionada a resíduos de serina ou treonina. Um versado na arte pode usar o *software* de bioinformática, tais como *softwares* de previsão NetNGlyc 1,0 e NetOGlyc da Universidade Técnica da Dinamarca para encontrar os sítios de N- e O-glicosilação em um polipeptídeo da presente invenção. O servidor NetNglyc prevê sítios de N -glicosilação em proteínas, usando redes neurais artificiais, que examinam o contexto da sequência de sequons Asn-Xaa-Ser/Thr. O *software* de Previsão NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 3.1 pode ser acessado no site da ExpASy. Em uma forma de realização, N-glicosilação ocorre no polipeptídeo de antígeno alvo do polipeptídeo de fusão descrito aqui.

#### Pares de molécula de afinidade

Como aqui descrito, em algumas formas de realização, um antígeno é conectado a um polímero através de pares de afinidade complementar. Esta conexão do antígeno para o polímero é mediada pelo polímero sendo conectado a uma molécula de primeira afinidade, que associa uma segunda molécula de afinidade (por exemplo, complementar) , que está fixada ao antígeno. Um par de afinidades complementar de exemplo é a proteína de ligação à biotina /biotina.

Exemplos ilustrativos dos pares de afinidade - afinidade complementar incluem, mas sem limitação, as

proteínas de ligação à biotina ou proteínas de tipo avidina que ligam a biotina. Por exemplo, onde a molécula de primeira afinidade de ligação é a biotina (que se associa com o polímero), a molécula de afinidade complementar pode ser uma proteína de ligação à biotina ou uma proteína de tipo avidina ou um seu derivado, por exemplo, mas não limitado a, avidina, rhizavidina ou estreptavidina ou variantes, derivados ou porções funcionais dos mesmos.

Em algumas formas de realização, a molécula de primeira afinidade de ligação é biotina, um derivado de biotina, ou um mimético de biotina, por exemplo, mas não limitado a, amina-PEG3-biotina (((+) biotinilação-3-6, 9-trixaundecanodiamina) ou um derivado ou fragmento funcional da mesma. Um mimético de biotina específico tem um motivo peptídico específico contendo a sequência de  $DX_aAX_bPX_c$  (SEQ ID NO:39), ou  $CDX_aAX_bPX_cCG$  (SEQ ID NO:40), onde  $X_a$  é R ou L,  $X_b$  é S ou T, e  $X_c$  é Y ou W. Estes motivos podem ligar avidina e neutravidina, mas estreptavidina. Ver, por exemplo, Gaj et al., 56 Prot. Express. Purif. 54 (2006).

A ligação da molécula de primeira afinidade para o polímero, e a molécula de afinidade complementar para o antígeno pode ser uma ligação não-covalente, ou um mecanismo químico, por exemplo, ligação covalente, ligação de afinidade, intercalação, ligação de coordenadas e



complexação. Ligação covalente fornece uma ligação muito estável, sendo particularmente bem apropriada para as presentes formas de realização. A ligação covalente pode ser conseguida por condensação direta de cadeias laterais existentes ou pela incorporação de moléculas de ligação de ponte externa.

Por exemplo, em algumas formas de realização, um antígeno pode ser ligado não covalentemente a um dos pares de um par de afixação complementar. Em formas de realização alternativas, um antígeno pode ser ligado de forma covalente ou fusionado com um dos pares de um par de afixação complementar. Os métodos para a geração de proteínas de fusão são bem conhecidos na arte, e são aqui discutidos.

Em outras formas de realização, uma molécula de primeira afinidade de ligação é ligada ao polímero por meio de uma ligação não covalente, ou por uma ligação covalente. Em algumas formas de realização, um reagente de reticulação é usado para ligar covalentemente a molécula de primeira afinidade de ligação para o polímero, como aqui descrito.

Em algumas formas de realização, a molécula de primeira afinidade de ligação se associa com a molécula de afinidade complementar por associação de ligação não covalente, como é conhecido na arte, incluindo, mas não

limitado a, interação eletrostática, hidrogênio ligado, interação hidrofóbica (isto é, forças de van der Waals), interações hidrofílicas, e outras interações não covalentes. Outras interações de ordem superior, com porções intermediárias, também são contempladas.

Em algumas formas de realização, a molécula de afinidade complementar é um polipeptídeo relacionado com avidina. Em formas de realização específicas, a molécula de afinidade complementar é rhizavidina, tais como rhizavidina recombinante. Em particular, a rhizavidina recombinante é uma rhizavidina modificada que pode ser expressada em *E. coli*, com um rendimento elevado. O rendimento típico é de > 30 µg por litro de cultura de *E. coli*. Rhizavidina tem uma homologia de sequência inferior para a avidina de ovo (22,4% de identidade de sequência e 35,0% de similaridade) em comparação com outras proteínas de tipo avidina. O uso da rhizavidina modificada reduz o risco dos MAPS induzirem uma reação alérgica relacionada com ovo em um indivíduo. Além disso, a rhizavidina recombinante modificada não tem reatividade cruzada aparente para avidina de ovo (e vice-versa).

Mais especificamente, algumas formas de realização compreendem uma rhizavidina modificada projetada para a expressão recombinante em *E. coli*. A sequência de

codificação para o gene rhizavidina foi otimizada usando  
códon de expressão de *E. coli*, para evitar qualquer  
dificuldade durante a expressão em *E. coli* devido aos  
códon raros presentes no gene original. Para simplificar o  
5 construto, após uma análise de bioinformática e baseada na  
estrutura, os primeiros 44 resíduos de rhizavidina de  
comprimento completo foram removidos, uma vez que estes  
foram considerados desnecessários para a estrutura e a  
função do núcleo. A duplicação correta da proteína  
10 recombinante foi melhorada pela adição de uma sequência de  
sinal de secreção de *E. coli* para o N- terminal da  
rhizavidina encurtada (45- 179), a fim de facilitar a  
translocação da proteína recombinante no espaço  
periplasmático das células de *E. coli*, onde a ligação  
15 dissulfeto funcionalmente importante em rhizavidina pode se  
formar corretamente. A rhizavidina recombinante modificada  
forma um dímero, em comparação com as proteínas de tipo  
avidina conhecidas que formam tetrâmeros, melhorando ainda  
mais a expressão da fusão rhizavidina recombinante -  
20 antígeno, como uma proteína solúvel em *E. coli*.

Além disso, como discutido em maiores detalhes aqui em  
outro local, para melhorar a expressão e a solubilidade de  
antígenos de fusão em *E. coli*, uma região de ligador  
flexível foi adicionada entre rhizavidina e a proteína do

antígeno. Além disso, com base em análise estrutural e "biotinformatics", diferentes construtos de antígeno foram clonados e expressados: ou um antígeno de comprimento completo, ou o domínio funcional importante, ou e proteínas quimeras foram constituídas com dois antígenos diferentes.

Pares de afinidade adicionais que podem ser utilizáveis nos métodos e composições aqui descritos incluem anticorpo-antígeno, metal/ íon de metal/proteína de ligação de íons, proteína de ligação lipídio/lipídio, proteína de ligação sacarídeo/sacarídeo, proteína de ligação aminoácido/ peptídeo/ aminoácido ou peptídeo, substrato enzimático ou inibidor de enzima, ligando agonista /receptor, ou mimético de biotina. Ao usar pares de afinidade alternativos, meios alternativos de fixação do polímero e antígeno respectivos também podem ser empregados, como reações enzimáticas *in vitro*, em vez da fusão genética. Mais especificamente, par de afinidade antígeno-anticorpo proporciona uma interação muito forte e específica. O antígeno pode ser qualquer epítopo incluindo proteína, peptídeo, ácido nucléico, lipídio, poli/oligossacarídeo, íon, etc. O anticorpo pode ser de qualquer tipo de imunoglobulina, ou a porção de ligação de Ag de uma imunoglobulina, como um fragmento Fab. Com relação a metal/íon metal/proteína de ligação de íons,

exemplos incluem Ni NTA versus proteína etiquetada com histidina, ou Zn versus proteína de ligação de Zn. Com relação à proteína de ligação lipídio/lipídio, os exemplos incluem colesterol versus proteína de ligação de colesterol. Com relação à proteína de ligação sacarídeo/sacarídeo, exemplos incluem maltose versus proteína de ligação de maltose, manose/ glicose/ oligossacarídeo versus lectina. Substratos/inibidores de enzima incluem substratos de uma ampla faixa de substâncias, incluindo proteínas, peptídeos, aminoácidos, lipídios, açúcares, ou íons. O inibidor pode ser o análogo de substrato real, que geralmente pode ligar-se às enzimas mais firmemente e mesmo irreversivelmente. Por exemplo, tripsina versus inibidor de tripsina de soja. O inibidor pode ser molécula natural ou sintética. Com relação a outro ligando /agonista - receptor, ligando pode ser de uma ampla faixa de substâncias, incluindo proteínas, peptídeos, aminoácidos, lipídios, açúcares, íons, agonista pode ser o análogo do ligando real. Exemplos incluem a interação LPS versus TLR4.

#### Reagentes de reticulação:

Muitos agentes de ligação bivalentes ou polivalentes são utilizáveis em copulação de moléculas de proteína a outras moléculas. Por exemplo, agentes de copulação

representativos podem incluir compostos orgânicos como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, disocianatos, glutaraldeídos, diazobenzenos e hexametileno diaminas. Esta listagem não pretende ser exaustiva das  
5 várias classes dos agentes de copulação conhecidos na arte, mas, em vez disso, é exemplar dos agentes de copulação mais comuns. Ver Killen & Lindstrom, 133 J. Immunol. 1335 (1984); Jansen et al., 62 Imm. Rev. 185 (1982); Vitetta et al.

10 Em algumas formas de realização, os reagentes de reticulação descritos na literatura são englobados para uso nos métodos, composições imunogênicas e kits, como aqui descritos. Ver, por exemplo, Ramakrishnan, et al., 44 Cancer Res. 201 (1984) (descreve o uso de MBS (éster de M-  
15 maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida)); Umemoto et al., Patente U.S. No. 5.030.719 (descreve o uso de um derivado de acetil hidrazida halogenada copulado a um anticorpo por via de um ligador de oligopeptídeo). Os ligadores  
20 específicos incluem: (a) EDC (cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propila) carbodiimida; (b) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (c) SPDP hexanoato de (succinimidil-6-[3-(2-piridilditio) propionamida] (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (d) Sulfo-

LC-SPDP hexanoato de (sulfosuccinimidila-6-[3-(2-piridilditio)-propianamida] (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); e (f) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., Cat. #24510) conjugado com EDC.

5        As ligações ou agentes de ligação descritos acima  
contêm componentes que têm atributos diferentes, levando  
assim a conjugados com diferentes propriedades físico-  
químicas. Por exemplo, os ésteres de sulfo-NHS de  
carboxilatos de alquila são mais estáveis do que os ésteres  
10 de sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Ligadores contendo  
NHS-éster são menos solúveis do que os ésteres sulfo-NHS.  
Além disso, o ligador SMPT contém uma ligação dissulfeto  
estereoquimicamente impedida, e pode formar conjugados com  
estabilidade aumentada. Ligações dissulfeto, são, em geral,  
15 menos estáveis do que outras ligações porque a ligação  
dissulfeto pode ser clivada *in vitro*, o que resulta em  
menos conjugado disponível. Sulfo-NHS, em particular, pode  
acentuar a estabilidade das copulações de carbodiimida. As  
copulações de carbodiimida (como EDC), como usadas em  
20 conjunto com sulfo-NHS, formam ésteres que são mais  
resistentes à hidrólise do que a reação de copulação de  
carbodiimida sozinha.

Moléculas de reticulação exemplares para uso nos  
métodos e composições imunogênicas como aqui descritas

incluem, mas não são limitadas às listadas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Reticuladores homobifuncionais exemplares\*

Alvo de reticulação	Grupos reativos de reticulador, Aspectos	Produtos de exemplo
Amina-para-Amina	Ésteres de NHS	DSG; DSS; BS3; TSAT (trifuncional); Bioconjugado Pares de reagentes Toolkit
	Ésteres de NHS, Espaçador de PEG	BS(PEG)5; BS(PEG)9
	Ésteres de NHS, clivável em tiol	DSP; DTSSP
	Ésteres de NHS, clivável em misc.	DST; BSOCOES; EGS; Sulfo-EGS
	Imidoésteres	DMA; DMP; DMS
	Imidoésteres, clivável em tiol	DTBP
	Outros	DFDNB; THPP (trifuncional); Kit Dextrano ativado por aldeído
Sulfidrila-para-Sulfidrila	Maleimidas	BMOE; BMB; BMH; TMEA (trifuncional)
	Maleimidas, Espaçador de PEG	BM(PEG)2; BM(PEG)3
	Maleimidas, clivável	BMDB; DTME
	Piridilditióis (clivável)	DPDPB
	Outros	HBVS (vinilsulfona)
Não seletivo	Aril azidas	BASED (clivável em tiol)
*reagentes de reticulação que tem o mesmo tipo de grupo reativo em ambas extremidades. Reagentes são classificados por quais grupos químicos que eles reticulam (coluna da esquerda) e e sua composição química (coluna do meio). Produtos são listados em ordem de comprimento crescente dentro de cada célula.		

Tabela 4. Reticuladores heterobifuncionais exemplares

5 \*

Alvos de reticulação	Grupos reativos de reticulador, Aspectos	Produtos de exemplo
Amina-para-Sulfidrila	NHS éster/Maleimide	AMAS; BMPS; GMBS e Sulfo-GMBS; MBS e Sulfo-MBS; SMCC e Sulfo-SMCC; EMCS e Sulfo-EMCS; SMPB e Sulfo-SMPB; SMPH; LC-SMCC; Sulfo-KMUS
	NHS éster/Maleimida,	SM(PEG)2; SM(PEG)4;



Alvos de reticulação	Grupos reativos de reticulador, Aspectos	Produtos de exemplo
	Espaçador de PEG	SM(PEG)6; SM(PEG)8; SM(PEG)12; SM(PEG)24
	NHS éster/Piridilditiol, clivável	SPDP; LC-SPDP e Sulfo-LC- SPDP; SMPT; Sulfo-LC-SMPT
	Ésteres de NHS/Haloacetila	SIA; SBAP; SIAB; Sulfo- SIAB
Amina-para- Não seletivo	NHS éster/Aril Azida	NHS-ASA ANB-NOS Sulfo-HSAB Sulfo-NHS-LC-ASA SANPAH e Sulfo-SANPAH
	NHS éster/Aril azida, clivável	Sulfo-SFAD; Sulfo-SAND; Sulfo-SAED
	NHS éster/Diazirina	SDA e Sulfo-SDA; LC-SDA e Sulfo-LC-SDA
	NHS éster/Diazirina, clivável	SDAD e Sulfo-SDAD
Amina-para- Carboxila	Carbodiimida	DCC; EDC
Sulfidrila- para-Não seletivo	Piridilditiol/Aril azida	APDP
Sulfidrila- para- Carboidrato	Maleimida/Hidrazida	BMPH; EMCH; MPBH; KMUH
	Piridilditiol/Hidrazida	BMPH; EMCH; MPBH; KMUH
Carboidrato- to-Não seletivo	Hidrazida/Aril azida	ABH
Hidroxil- para- Sulfidrila	Isocianato/Maleimida	PMPI
Amina-para- DNA	éster NHS /Psoralen	SPB
* reagentes de reticulação que tem os diferentes grupos reativos em ambas extremidades. Reagentes são classificados por quais grupos químicos que eles reticulam (coluna da esquerda) e e sua composição química (coluna do meio). Produtos são listados em ordem de comprimento crescente dentro de cada célula.		

### Fator co-estimulatório

Em algumas formas de realização, a composição imunogênica como aqui descrita compreende pelo menos uma molécula co-estimulatória. Em algumas formas de realização, o fator co-estimulatório é reticulado para o polímero. Em

algumas formas de realização, o fator co-estimulatório é associado ao polímero por um par de afinidade complementar similar a como um antígeno é associado com o polímero. Em algumas formas de realização, em que o par de afinidade complementar que liga o fator co-estimulatório ao polímero é igual, ou um par de afinidade complementar diferente que liga o antígeno ao polímero.

Em algumas formas de realização, pelo menos um, ou pelo menos 2, ou pelo menos 3, ou pelo menos 5, ou pelo menos 10, ou pelo menos 15, ou pelo menos 20, ou pelo menos 50, ou pelo menos 100, ou mais do que cerca de 100, inclusive, fatores co-estimulatórios podem ser associados com o polímero, como aqui descrito. Em algumas formas de realização, os fatores co-estimulatórios podem ser o mesmo fator co-estimulatório, ou eles podem ser de uma variedade de diferentes fatores co-estimulatórios associados com o polímero.

Em algumas formas de realização, o fator co-estimulatório é um ligando/agonista dos receptores do tipo Toll, por exemplo, mas não se limitando a TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, etc Em algumas formas de realização, um fator co-estimulatório é um ligando/agonista NOD, ou um ativador/agonista do inflamassoma. Sem pretender ser limitado pela teoria, o

inflamassoma é um oligômero multiprotéico consistindo em caspase 1, PYCARD, NALP e, às vezes, caspase 5 ou caspase 11 e promove a maturação de citocinas inflamatórias interleucina 1- $\beta$  e interleucina 18.

5        Em algumas formas de realização, um fator co-estimulatório é uma citocina. Em algumas formas de realização, uma citocina é selecionada a partir do grupo consistindo de: GM-CSF; IL-1 $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-10; IL-12; IL-23; IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IFN- $\beta$ ; IFN- $\gamma$ ; MIP-1 $\alpha$ ; MIP-1 $\beta$ ; TGF- $\beta$ ; TNF $\alpha$ , e TNF $\beta$ . Em  
10 algumas formas de realização, o fator co-estimulatório é um adjuvante, o qual pode ser associado com o polímero, como apenas discutido, ou pode ser adicionado à composição de MAPS antes ou concorrente com a administração a um indivíduo. Os adjuvantes são ainda descritos aqui em outro  
15 local.

#### Produção de proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes podem ser convenientemente expressadas e purificadas por um versado na arte, ou usando kits disponíveis comercialmente, por exemplo, Sistema de  
20 Purificação ProBond <sup>™</sup> (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA). Em algumas formas de realização, os antígenos recombinantes podem ser sintetizados e purificados por métodos de purificação de proteínas, usando os sistemas de expressão bacteriana, sistema de expressão de levedura, sistema de

expressão de baculovírus/ células de inseto, sistemas de expressão de células de mamíferos, ou sistemas de plantas ou animais transgênicos, tal como conhecido dos versados na arte.

5           As proteínas, polipeptídeos e polipeptídeos de fusão aqui descritos podem ser todos sintetizados e purificados por proteína e métodos moleculares que são bem conhecidos de um versado na arte. Métodos de biologia molecular e sistemas de expressão de proteína heteróloga recombinante  
10       são usados. Por exemplo, a proteína recombinante pode ser expressada em bactérias, mamíferos, insetos, leveduras, ou células de plantas, ou em plantas transgênicas ou hospedeiros animais.

          Em uma forma de realização, é aqui provido um  
15       polinucleotídeo isolado codificando um polipeptídeo de fusão ou um polipeptídeo não fusão aqui descrito. Técnicas de clonagem de reação de cadeia polimerase convencionais (PCR) podem ser usadas para a construção de uma sequência de codificação quimérica ou de fusão codificando um  
20       polipeptídeo de fusão, como aqui descrito. Uma sequência de codificação pode ser clonada em um vetor de clonagem para fins gerais, tais como vetores pUC19, pBR322, pBLUESCRIPT® (Stratagene, Inc.) ou pCR TOPO® (Invitrogen). O vetor recombinante resultante transportando o ácido nucléico

codificando um polipeptídeo, como aqui descrito, pode, então, ser usado para outras manipulações de biologia molecular, tais como mutagênese sítio-dirigida para criar um polipeptídeo de fusão variante, como aqui descrito, ou  
5 pode ser subclonado em vetores de expressão de proteína ou vetores virais para a síntese de proteína em uma variedade de sistemas de expressão de proteínas usando células hospedeiras selecionadas do grupo constituído por linhagens de células de mamíferos, linhagens de células de insetos,  
10 leveduras, bactérias e células de plantas.

Cada iniciador de PCR deve ter, pelo menos, 15 nucleotídeos que se sobrepõem com seus gabaritos correspondentes na região a ser amplificada. A polimerase usada na amplificação PCR deve ter alta fidelidade, tal  
15 como *PfuULTRA*® polimerase (Stratagene) para reduzir os erros de sequência durante o processo de amplificação por PCR. Para facilidade de ligação de vários fragmentos de PCR separados em conjunto, por exemplo, na construção de um polipeptídeo de fusão, e, subsequentemente, inserindo em um  
20 vetor de clonagem, os iniciadores de PCR também devem ter sítios distintos e únicos de digestão de restrição em suas extremidades de flanco que não se recombinam ao DNA gabarito durante a amplificação por PCR. A escolha dos sítios de digestão de restrição para cada par de

iniciadores específicos deve ser tal que a sequência de DNA codificando o polipeptídeo de fusão está no quadro e irá codificar o polipeptídeo de fusão a partir do princípio até o final sem códons de parada. Ao mesmo tempo, os sítios de  
5 digestão de restrição escolhidos não devem ser encontrados dentro da sequência de DNA de codificação para o polipeptídeo de fusão. A sequência de DNA de codificação para o polipeptídeo pretendido pode ser ligada em um vetor de clonagem pBR322 ou um de seus derivados, para  
10 amplificação, verificação de fidelidade e autenticidade da sequência quimérica de codificação, substituições/ou mutagênese sítio-dirigida específica para mutações de aminoácidos específicas e substituições no polipeptídeo.

Alternativamente, a sequência de DNA codificando para  
15 o polipeptídeo pode ser clonada por PCR em um vetor usando por exemplo, o método de clonagem TOPO® compreendendo vetores de TA assistidos por topoisomerase, tais como pCR®-TOPO, pCR®-Blunt II-TOPO, pENTR/D-TOPO®, e pENTR/SD/D-TOPO®.(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Ambos pENTR/D-  
20 TOPO®, e pENTR/SD/D-TOPO® são vetores de entrada TOPO direcionais que permitem a clonagem da sequência de DNA na orientação 5'→3' para um vetor de expressão GATEWAY®. Clonagem direcional na orientação 5'→3' facilita a inserção unidirecional da sequência de DNA em um vetor de expressão

de proteína de tal modo que o promotor está à montante de  
códon de partida ATG 5' da sequência de DNA codificando o  
polipeptídeo de fusão, permitindo a expressão de proteína  
dirigida pelo promotor. O vetor recombinante carregando a  
5 sequência de DNA codificando para o polipeptídeo de fusão  
pode ser transfectada em e propagada em clonagem geral de  
*E. coli* tais como células XL1Blue, SURE® (STRATAGENE®) e  
TOP-10 (Invitrogen).

Um especialista na arte seria capaz de clonar e ligar  
10 a região de codificação do antígeno de interesse com a  
região de codificação da molécula de afinidade complementar  
para construir uma sequência de codificação quimérica para  
um polipeptídeo de fusão compreendendo o antígeno ou um  
fragmento do mesmo e a molécula de afinidade complementar  
15 de um derivado do mesmo, usando sondas de oligonucleotídeos  
especialmente projetadas e metodologias de reação em cadeia  
polimerase (PCR) que são bem conhecidas na arte. Um versado  
na arte será também capaz de clonar e ligar a sequência de  
codificação quimérica para uma proteína de fusão em um  
20 vetor selecionado, por exemplo, vetor de expressão  
bacteriana, um vetor de expressão de inseto ou vetor de  
expressão de baculovírus. As sequências de codificação de  
antígeno e o polipeptídeo de antígeno alvo ou fragmento do  
mesmo devem ser ligadas em quadro e a sequência de

codificação quimérica deve ser ligada à jusante do promotor, e entre o promotor e o terminador de transcrição. Subsequente a isso, o vetor recombinante é transfectado em *E. coli* de clonagem regular, como XL1 Blue. *E. coli* recombinante abrigando o DNA de vetor de transferência é então selecionado através de resistência a antibióticos para remover qualquer *E. coli* abrigando o DNA plasmídeo não recombinante. *E. coli* transformantes selecionados são cultivados e o DNA vetor recombinante pode ser posteriormente purificado por transfecção em células de *S. frugiperda*.

Em algumas formas de realização, os antígenos, como aqui descrito, podem compreender um peptídeo de sinal para translocação no espaço periplasmático da bactéria. O peptídeo de sinal é também chamado um peptídeo líder no N-término, que pode ou não pode ser clivado após a translocação através da membrana. Um exemplo de um peptídeo de sinal é MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID NO:2),, como aqui descrito. Outra sequência de sinal é MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRA (SEQ ID NO:7). Outros exemplos de peptídeos de sinal podem ser encontrados em SPdb, um banco de dados de peptídeos de sinal, que é encontrado no site da rede mundial "proline.bic.nus.edu.sg/spdb/".

Em algumas formas de realização, onde o antígeno está



fusionado com uma proteína de ligação de biotina, a sequência de sinal pode estar localizada no N-terminal da proteína de ligação de biotina. Em algumas formas de realização, a sequência de sinal é clivada a partir da  
5 proteína de ligação à biotina após translocação no espaço periplásmico de *E. coli*.

Em algumas formas de realização, onde o antígeno está fusionado com uma proteína de afinidade complementar, a sequência de sinal pode estar localizada no N-terminal da  
10 proteína de afinidade complementar. Por exemplo, se um antígeno é fusionado a uma proteína de tipo avidina, a sequência de sinal pode estar localizada no N-terminal da proteína de afinidade complementar. Em algumas formas de realização, a sequência de sinal é clivada a partir da  
15 proteína de afinidade complementar antes da proteína de afinidade complementar se associar com a molécula de primeira afinidade.

Em algumas formas de realização, a um antígeno e/ou proteína de afinidade complementar, como aqui descrito,  
20 falta uma sequência de sinal.

Os polipeptídeos aqui descritos podem ser expressados em uma variedade de células hospedeiras de expressão, por exemplo, bactérias, leveduras, células de mamíferos, células de insetos, células de plantas, células de algas,

tais como *Chlamadomonas*, ou em sistemas de expressão isentos de células. Em algumas formas de realização, o ácido nucléico pode ser subclonado a partir do vetor de clonagem em um vetor de expressão recombinante que é

5 apropriado para a expressão do polipeptídeo de fusão em bactérias, células de mamífero, insetos, levedura, ou planta ou um sistema de expressão isento de células, tais como um sistema de expressão de reticulócitos de coelho. Alguns vetores são projetados para transferir o ácido

10 nucléico codificando para a expressão em células de mamíferos, células de insetos em uma única reação de recombinação. Por exemplo, alguns dos vetores de destinação GATEWAY<sup>®</sup> (Invitrogen) são projetados para a construção de baculovírus, adenovírus, vírus adeno-associados (AAV),

15 retrovírus, e lentivírus que, mediante infecção de suas respectivas células hospedeiras, permitem a expressão heteróloga de polipeptídeos de fusão nas células hospedeiras apropriadas. A transferência de um gene em um vetor de destinação é realizada em apenas duas etapas, de

20 acordo com as instruções do fabricante. Existem vetores de expressão GATEWAY<sup>®</sup> para a expressão de proteínas em células de insetos, células de mamíferos e leveduras. Após transformação e seleção em *E. coli*, o vetor de expressão está pronto para ser usado para a expressão no hospedeiro

apropriado.

Exemplos de outros vetores de expressão e células hospedeiras são o pcDNA3.1 baseado em promotor CMV forte (Invitrogen) e vetores pCIneo (Promega) para expressão em

5 linhagens de células de mamíferos, como CHO, COS, HEK-293, Jurkat, e MCF -7; vetor adenoviral incompetente em replicação vetores pADENO-X™, pAd5F35, pLP-ADENO™-X-CMV (CLONTECH®), pAd/CMV/V5-DEST, vetor pAd-DEST (Invitrogen)

10 para a transferência de genes mediada por adenovírus e expressão em células de mamíferos; vetores retrovirais pLNCX², pLXSN, e pLAPSN para uso com o sistema RETRO-X™ de Clontech para a transferência de genes mediada por retrovírus e expressão em células de mamíferos; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™, e pLenti6.2/V5-GW/lacZ

15 (Invitrogen) para a transferência de genes mediada por lentivírus e expressão em células de mamíferos; vetores de expressão de vírus adenovírus-associado, como vetor pAAV-MCS, pAAV-IRES-hrGFP, e pAAV-RC (Stratagene) para a transferência de genes mediada por vírus adeno-associados,

20 e expressão em células de mamíferos; baculovirus BACpak6 (Clontech) e pFASTBAC™ HT (Invitrogen) para a expressão em linhagens de células de insetos 9 (Sf9), Sf11, Tn-368 e BTI-TN-5B4-1 de *S. frugiperda*; pMT/BiP/V5-His (Invitrogen) para a expressão em células S2 de *Drosophila schneider*;

vetores de expressão *Pichia* pPICZ $\alpha$ , pPICZ, pFLD $\alpha$  e pFLD (Invitrogen) para expressão em *P. pastoris* e vetores pMET $\alpha$  e pMET para expressão em *P. methanolica*; vetores pYES2/GS e pYD1 (Invitrogen) para expressão em levedura *S. cerevisiae*.

5 Os recentes avanços nas proteínas heterólogas de expressão em grande escala em *Chlamydomonas reinhardtii* são descritos. Griesbeck., 34 Mol. Biotechnol. 213 (2006); Fuhrmann, 94 Methods Mol Med. 191 (2006). As sequências de codificação heterólogas estranhas são inseridas no genoma  
10 do núcleo, cloroplasto e mitocôndrias, por recombinação homóloga. O vetor de expressão de cloroplasto p64 transportando o marcador selecionável de cloroplasto o mais versátil aminoglicosídeo adeniltransferase (aadA), que confere resistência a espectinomicina e estreptomicina,  
15 pode ser usado para expressar uma proteína estranha no cloroplasto. O método de pistola de genes biolístico pode ser usado para introduzir o vetor nas algas. Após a sua entrada em cloroplastos, o DNA estranho é liberado a partir das partículas da pistola de genes e se integra no genoma  
20 do cloroplasto através de recombinação homóloga.

Também está incluída na invenção a molécula de afinidade complementar fusionada com um antígeno. Em algumas formas de realização, o construto de fusão pode também compreender, opcionalmente, etiquetas de

purificação, e/ou peptídeos de sinal de secreção. Estas proteínas de fusão podem ser produzidas por qualquer método padrão. Por exemplo, para a produção de uma linhagem celular estável expressando uma proteína de fusão de

5 molécula de afinidade complementar - antígeno, os ácidos nucleicos - antígenos amplificados por PCR podem ser clonados no sítio de restrição de um derivado de um vetor de expressão de mamífero. Por exemplo, KA, que é um derivado de pcDNA3 (Invitrogen) contém um fragmento de DNA

10 codificando uma etiqueta de hemaglutinina do vírus de influenza (HA). Alternativamente, os derivados de vetores codificando outras etiquetas, tal como as etiquetas c- myc ou poli-histidina, podem ser usados. O construto de expressão de fusão antígeno- molécula de afinidade

15 complementar pode ser co-transfectado com um plasmídeo marcador, em uma linhagem de células de mamífero apropriada (por exemplo, células COS, HEK293T, ou NIH-3T3), usando, por exemplo, LIPOFECTAMINE <sup>TM</sup> (Gibco -BRL, Gaithersburg, MD) de acordo com as instruções do fabricante, ou qualquer

20 outra técnica de transfecção apropriada conhecida na arte. Os marcadores de transfecção apropriados incluem, por exemplo, plasmídeos de expressão de  $\beta$ -galatosidase ou proteína fluorescente verde (GFP) ou qualquer plasmídeo que não contém o mesmo marcador detectável como a proteína de

fusão antígeno - molécula de afinidade complementar. As células expressando a proteína de fusão podem ser classificadas e ainda cultivadas, ou a proteína de fusão antígeno - molécula de afinidade complementar pode ser purificada. Em algumas formas de realização, proteína de fusão antígeno - molécula de afinidade complementar é amplificada com um peptídeo de sinal. Em formas de realização alternativas, um cDNA codificando a proteína de fusão antígeno - molécula de afinidade complementar pode ser amplificado sem o peptídeo de sinal e subclonado em um vetor (pSecTagHis) tendo um peptídeo de sinal de secreção forte. Em outro exemplo, a proteína de fusão antígeno - molécula de afinidade complementar pode ter uma etiqueta fosfatase alcalina (AP), ou uma etiqueta histadina (His) para purificação. Qualquer método conhecido dos versados na arte para a purificação de proteína do antígeno e/ou proteína de fusão antígeno - molécula de afinidade complementar é englobado para uso nos métodos da invenção.

Em algumas formas de realização, qualquer um dos polipeptídeos aqui descritos é produzido por expressão a partir de um vetor de baculovírus recombinante. Em outra forma de realização, qualquer um dos polipeptídeos aqui descritos é expressado por uma célula de inseto. Em ainda outra forma de realização, qualquer um dos polipeptídeos

aqui descritos é isolado a partir de uma célula de inseto. Existem vários benefícios da expressão de proteínas com baculovírus em células de insetos, incluindo níveis elevados de expressão, a facilidade de aumento de escala, a  
5 produção de proteínas com modificações pós-tradução, e crescimento celular simplificado. Células de insetos não exigem CO<sub>2</sub> para crescimento e podem ser facilmente adaptadas para cultura em suspensão de alta densidade para a expressão em larga escala. Muitas das vias de  
10 modificações pós-tradução presentes nos sistemas de mamíferos são também utilizadas em células de inseto, permitindo a produção de proteína recombinante que é antigenicamente, imunogenicamente, e funcionalmente similar à proteína nativa de mamífero.

15 Os baculovírus são vírus de DNA da família *Baculoviridae*. Estes vírus são conhecidos como tendo uma faixa de hospedeiros estreita que é principalmente limitada a espécies de insetos Lepidópteros (borboletas e traças). O baculovírus *Autographa californica* vírus da poliedrose  
20 nuclear (AcNPV), que se tornou o baculovírus protótipo, replica eficientemente em células de inseto cultivadas susceptíveis. AcNPV tem um genoma de DNA circular fechado de filamento duplo de cerca de 130.000 pares de bases e está bem caracterizado com relação à faixa de hospedeiro,

biologia molecular e genética. O sistema de vetor de expressão de baculovírus (BEVS) é um método seguro e rápido para a produção abundante de proteínas recombinantes em células de insetos e insetos. Os sistemas de expressão de baculovírus são sistemas potentes e versáteis para expressão de proteína recombinante em alto nível em células de insetos. Os níveis de expressão de até 500 mg/l foram relatados usando o sistema de expressão de baculovírus, tornando-o um sistema ideal para a expressão de alto nível.

Os baculovírus recombinantes que expressam genes estranhos são construídos por meio de recombinação homóloga entre o DNA de baculovírus e plasmídeos quiméricos contendo a sequência do gene de interesse. Os vírus recombinantes podem ser detectados em virtude de sua morfologia de placas distintas e purificados em placa até homogeneidade.

As proteínas de fusão recombinantes aqui descritas podem ser produzidas em células de insetos, incluindo, mas não limitadas a, células derivadas da espécie *Lepidopteran S. frugiperda*. Outras células de insetos que podem ser infectadas por baculovírus, tais como as das espécies *Bombyx mori*, *Galleria mellanoma*, *Trichplusia ni*, ou *Lamanthria dispar*, também pode ser usadas como um substrato apropriado para a produção de proteínas recombinantes aqui descritas. A expressão de baculovírus de proteínas



recombinantes é bem conhecida na arte. Ver Patentes U.S. No. 4.745.051; No. 4.879.236; No. 5.179.007; No. 5.516.657; No. 5.571.709; No. 5.759.809. Será entendido pelos versados na arte que o sistema de expressão não é limitado a um sistema de expressão de baculovírus. O que é importante é que o sistema de expressão dirige a N-glicosilação de proteínas recombinantes expressadas. As proteínas recombinantes aqui descritas também podem ser expressadas em outros sistemas de expressão, tais como vírus entomopox (os poxvírus de insetos), vírus da poliedrose citoplásmica (CPV), e transformação de células de inseto com o gene recombinante ou expressão constitutiva de genes. Um bom número de vetores de transferência de baculovírus e as células hospedeiras apropriadamente modificadas correspondentes estão disponíveis comercialmente, por exemplo, pAcGP67, pAcSECG2TA, pVL1392, pVL1393, pAcGHIT, e pAcAB4 por BD Biosciences; pBAC-3, pBAC-6, pBACgus-6, e pBACsurf-1 por NOVAGEN®, e pPolh-FLAG e pPolh-MAT por SIGMA ALDRICH®.

A região entre o promotor e o terminador da transcrição pode ter sítios de digestão de enzimas de restrição múltiplos para facilitar a clonagem da sequência de codificação estranha, neste exemplo, a sequência de DNA codificando para um polipeptídeo de antígeno, e uma

molécula de afinidade complementar. Sequências adicionais podem ser incluídas, por exemplo, peptídeos de sinal e/ou sequências de codificação de etiquetas (*tags*), como etiqueta His, etiqueta MAT, etiqueta FLAG, sequência de reconhecimento para enteroquinase, sinal de secreção de melitina de abelha, beta-galatosidase, glutathione S-transferase (GST) etiqueta à montante de MCS para facilitar a secreção, identificação, inserção correta, seleção positiva de vírus recombinante, e/ou purificação da proteína recombinante.

Em algumas formas de realização, a proteína de fusão pode compreender uma sequência de sinal N-terminal, como aqui descrito. Em algumas formas de realização, a sequência de sinal é fixada ao N-terminal da molécula de afinidade complementar como aqui descrito.

Em algumas formas de realização, um polipeptídeo de fusão, como aqui descrito, tem um peptídeo espaçador, por exemplo, um espaçador de 14 resíduos (GSPGISGGGGGILE) (SEQ ID NO:41) separando o antígeno da molécula de afinidade complementar. A sequência de codificação de tal espaçador curto pode ser construída por anelamento de um par complementar de iniciadores. Um versado na arte pode projetar e sintetizar oligonucleotídeos, que irão codificar para o espaçador selecionado. Peptídeos espaçadores devem

geralmente ter resíduos de aminoácidos não polares, como glicina e prolina.

As técnicas padrões conhecidas dos versados na arte podem ser usadas para introduzir mutações (para criar substituições de aminoácidos em uma sequência antígeno polipeptídeo do polipeptídeo de fusão descrito aqui, por exemplo, no antígeno na sequência de nucleotídeos codificando o polipeptídeo de fusão aqui descrito, incluindo, por exemplo, mutagênese sítio-dirigida e mutagênese mediada por PCR. Preferivelmente, o polipeptídeo de fusão variante tem menos de 50 substituições de aminoácidos, menos de 40 substituições de aminoácidos, menos de 30 substituições de aminoácidos, menos de 25 substituições de aminoácidos, menos de 20 substituições de aminoácidos, menos de 15 substituições de aminoácidos, menos de 10 substituições de aminoácidos, menos de 5 substituições de aminoácidos, menos de 4 substituições de aminoácidos, menos de 3 substituições de aminoácidos, ou menos de 2 substituições de aminoácidos, inclusive, com relação aos polipeptídeos de fusão aqui descritos.

Algumas mutações silentes ou de sentido errado neutras também podem ser feitas na sequência de codificação de DNA que não mudam a sequência de aminoácidos codificada, ou a capacidade de promover a distribuição transmembrana. Estes

tipos de mutações são utilizáveis para otimizar o uso de códons, ou para melhorar a expressão e produção da proteína recombinante.

5 Mutagênese sítio-dirigida específica de uma sequência de codificação para o polipeptídeo de fusão em um vetor pode ser usada para criar mutações e substituições de aminoácidos específicas. A mutagênese sítio- dirigida pode ser realizada usando, por exemplo, o kit de mutagênese sítio- dirigida QUICKCHANGE® de Stratagene de acordo com as  
10 instruções do fabricante.

Em uma forma de realização, são aqui descritos os vetores de expressão compreendendo a sequência de DNA codificando para os polipeptídeos aqui descritos para a expressão e purificação do polipeptídeo recombinante  
15 produzido a partir de um sistema de expressão de proteínas usando células hospedeiras selecionadas a partir de, por exemplo, bactérias, células de mamíferos, insetos, leveduras, ou plantas. O vetor de expressão deve ter os necessários elementos reguladores 5' a montante e 3' a  
20 jusante, como sequências de promotor, reconhecimento de ribossomo e caixa TATA e sequência de terminação de transcrição 3' UTR AAUAAA para a transcrição e tradução do gene eficiente em sua célula hospedeira respectiva. O vetor de expressão é, preferivelmente, um vetor com o promotor de

transcrição selecionado dentre um grupo consistindo de promotor de CMV (citomegalovirus), promotor de RSV (vírus do sarcoma de Rous), promotor de  $\beta$ -actina, promotor de VS40 (vírus 40 de símio) e promotor de creatina quinase muscular, e o terminador da transcrição selecionado dentre um grupo consistindo de SV40 poli (A) e terminador BGH, mais preferencialmente, um vetor de expressão tendo a sequência de promotor/acentuador prematuro de citomegalovírus e a sequência líder/íntron tripartido de adenovírus e contendo a origem de replicação e sequência poli (A) de SV40. O vetor de expressão pode ter as regiões codificantes adicionais, tais como as codificando, por exemplo, 6X-histidina (SEQ ID NO: 10), V5, tioredoxina, glutational -S-transferase, c-Myc, VSV-G, HSV, FLAG, peptídeo de ligação a maltose, peptídeo de ligação a metais, sinais HA e de "secreção" (melitina de abelha, [[ $\square$ ]]  $\alpha$ -fator, PHO, Bip), que podem ser incorporados no polipeptídeo de fusão expressado. Além disso, pode haver sítios de digestão de enzimas incorporados após estas regiões de codificação para facilitar sua remoção enzimática, se não forem necessários. Estes ácidos nucleicos complementares são úteis para a detecção de expressão do polipeptídeo de fusão, para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade, solubilidade

aumentada da proteína recombinante no citoplasma do hospedeiro, e/ou para a secreção do polipeptídeo de fusão expressado em meio de cultura ou esferoplasto das células de levedura. A expressão do polipeptídeo de fusão pode ser constitutiva nas células hospedeiras, ou pode ser induzida, por exemplo, com sulfato de cobre, açúcares, como galatose, metanol, metilamina, tiamina, tetraciclina, infecção com baculovírus, e IPTG (isopropil-beta-D-tiogalatopiranosídeo), um análogo sintético estável de latose.

Em outra forma de realização, o vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo aqui descrito é um vetor viral, como um adenovírus, vírus adeno-associado (AAV), retrovírus, e vetores lentivirais, entre outros. Os vírus recombinantes fornecem um sistema versátil para estudos de expressão de genes e aplicações terapêuticas.

Em algumas formas de realização, os polipeptídeos de fusão aqui descritos são expressados a partir de infecções virais de células de mamíferos. Os vetores virais podem ser, por exemplo, adenovírus, vírus adeno-associado (AAV), retrovírus, e lentivírus. Um sistema simplificado para gerar adenovírus recombinantes é apresentado por He et al., 95 PNAS 2509 (1998). O gene de interesse é primeiro clonado em um vetor *shuttle*, por exemplo, pAdTrack-CMV. O plasmídeo

resultante é linearizado por digestão com endonuclease de restrição *PmeI*, e subsequentemente co-transformado em *E. coli*. Células BJ5183 com um plasmídeo de estrutura dorsal adenoviral, por exemplo. *pADEASY-1* de sistema vetor adenoviral *ADEASY™* de Stratagene. vetores de adenovírus recombinantes são selecionados para resistência à canamicina, e recombinação confirmada por análises de restrição de endonuclease. Finalmente, o plasmídeo recombinante linearizado é transfectado em linhagens de células de acondicionamento de adenovírus, por exemplo, células HEK 293 (células de rim embrionárias humanas transformadas com E1) ou 911 (células de retina embrionárias humanas transformadas com E1). Fallaux, et al. 7 Human Gene Ther. 215 (1996). Adenovírus recombinante são gerados dentro das células HEK 293.

Lentivírus recombinante tem a vantagem de distribuição e expressão de polipeptídeos de fusão nas células de mamíferos de divisão e não divisão. O lentivírus com base em HIV-1 pode eficazmente transduzir uma faixa de hospedeiros mais ampla do que os sistemas retrovirais baseados em vírus de leucemia Moloney (MoMLV). Preparação do lentivírus recombinante pode ser obtida usando, por exemplo, os vetores *pLenti4/V5-DEST™*, *pLenti6/V5-DEST™* ou *pLenti* juntos com sistemas de expressão lentivirais

VIRAPOWERTM de Invitrogen, Inc.

Vetores do vírus adeno-associado recombinante (rAAV) são aplicáveis a uma grande variedade de células hospedeiras, incluindo várias linhagens de células humanas e não-humanas ou tecidos diferentes. rAAVs são capazes de transduzir uma vasta faixa de tipos de células e a transdução não é dependente da divisão celular do hospedeiro ativo. Os títulos elevados, > 10<sup>8</sup> partículas virais/ml, são facilmente obtidos no sobrenadante e 10<sup>11</sup>-10<sup>12</sup> partículas virais/ml, com uma maior concentração. O transgene é integrado no genoma do hospedeiro de modo que a expressão é de longo prazo e estável.

Preparação em larga escala de vetores AAV é feita por uma co-transfecção de três plasmídeos de uma linhagem celular de embalagem: vetor AAV carregando o ácido nucléico codificado, vetor AAV RC contendo genes AAV rep e cap, e plasmídeo ajudante adenovírus pDF6, em placas de 50 x 150 mm de 293 células confluentes. As células são coletadas três dias após a transfecção, e os vírus são liberados através de três ciclos de congelamento-descongelamento ou por sonicação.

Os vetores de AAV podem ser purificados por meio de dois métodos diferentes, dependendo do sorotipo do vetor. O vetor AAV2 é purificado pelo método de purificação de



coluna de fluxo por gravidade de etapa única, com base em sua afinidade para heparina. Auricchio et. al., 12 Human Gene Ther. 71 (2001); Summerford & Samulski, 72 J. Virol. 1438 (1998); Summerford & Samulski, 5 Nat. Med. 587 (1999). Os vetores AAV2/1 e AAV2/5 são correntemente purificados por três gradientes de CsCl sequenciais.

Sem desejar estar ligado à teoria, quando as proteínas são expressadas por uma célula, incluindo uma célula bacteriana, as proteínas são alvo-marcadas para uma parte particular na célula ou secretadas a partir da célula. Assim, a alvo-marcação de proteínas ou classificação de proteínas é o mecanismo pelo qual uma célula transporta as proteínas para as posições apropriadas na célula ou fora dela. A classificação dos alvos pode ser no espaço interior de um organelo, qualquer uma das várias membranas interiores, membrana exterior das células, ou o seu exterior via secreção. Este processo de distribuição é realizado com base em informações contidas na própria proteína. Classificação correta é fundamental para a célula; erros podem levar a doenças.

Com algumas exceções, as bactérias não possuem organelas ligadas à membrana como encontrado em eucariotos, mas elas podem montar proteínas sobre vários tipos de inclusões, tais como vesículas de gás e grânulos de

armazenamento. Também, dependendo das espécies de bactérias, bactérias podem ter uma única membrana plasmática (bactérias Gram-positivas), ou tanto uma membrana interior (plasma) como uma membrana de parede celular exterior, com um espaço aquoso entre as duas chamado periplasma (bactérias Gram -negativas). As proteínas podem ser secretadas no ambiente, de acordo com a existência ou não de uma membrana externa. O mecanismo básico na membrana do plasma é similar ao eucariótico. Além disso, as bactérias podem alvo-marcas as proteínas em ou através da membrana exterior. Sistemas de secreção de proteínas através da membrana externa bacteriana podem ser bastante complexos e desempenham papéis chaves na patogênese. Estes sistemas podem ser descritos como secreção de tipo I, secreção de tipo II, etc.

Na maioria das bactérias Gram-positivas, algumas proteínas são alvo-marcadas para exportação através da membrana plasmática e subsequente ligação covalente para a parede da célula bacteriana. Uma enzima especializada, sortase, cliva a proteína alvo em um sítio de reconhecimento característico próximo da proteína C-terminal, tais como um motivo LPXTG (SEQ ID NO: 42) (onde X pode ser qualquer aminoácido), então, transfere a proteína sobre a parede da célula. Um sistema análogo a

sortase/LPXTG ("LPXTG" descrito como SEQ ID NO: 42), tendo o motivo PEP-CTERM (SEQ ID NO: 43), denominado exosortase/PEP-CTERM ("PEP" descrito como SEQ ID NO: 43), é proposto para existir em uma ampla faixa de bactérias Gram-

5 negativas.

Proteínas com sinais de alvo-marcação N- terminal apropriados são sintetizadas no citoplasma e, então, dirigidas para uma via de transporte de proteínas específica. Durante, ou imediatamente após a sua

10 translocação através da membrana citoplasmática, a proteína é processada e duplicada na sua forma ativa. Em seguida, a proteína translocada é retida no lado periplasmático da célula ou liberada no ambiente. Uma vez que os peptídeos de sinal que alvo-marcam as proteínas para a membrana são

15 determinantes chaves para a especificidade da via de transporte, estes peptídeos de sinal são classificados de acordo com a via de transporte para as quais eles dirigem as proteínas. Classificação do peptídeo de sinal é baseada no tipo de peptidase de sinal (SPase) que é responsável

20 pela remoção do peptídeo de sinal. A maioria das proteínas exportadas são exportados a partir do citoplasma através da "via secretora (Sec) " geral. Fatores de virulência mais conhecidos (por exemplo, exotoxinas de *Staphylococcus aureus*, antígeno protetor de *Bacillus anthracis*,

listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*) que são secretados por patógenos gram-positivos têm um peptídeo de sinal N-terminal típico que iria levá-los para a via Sec. As proteínas que são secretadas por esta via são translocadas através da membrana citoplásmica em um estado não duplicado. O processamento subsequente e duplicação destas proteínas ocorre no ambiente da parede celular no lado trans da membrana. Em adição ao sistema Sec, algumas bactérias gram-positivas também contem o sistema Tat que é capaz de translocar as proteínas duplicadas através da membrana. As bactérias patogênicas podem conter certos sistemas de exportação especiais que estão especificamente envolvidos no transporte de apenas algumas proteínas. Por exemplo, vários agrupamentos de genes foram identificados em microbactérias que codificam proteínas que são secretadas para o ambiente através de vias específicas (ESAT 6) e são importantes para a patogênese micobacteriana. Os transportadores de cassete de ligação de ATP específicos (ABC) dirigem a exportação e processamento de pequenos peptídeos antibacterianos chamados bacteriocinas. Genes para endolisinas que são responsáveis pelo início de lise bacteriana estão muitas vezes localizados perto de genes que codificam para proteínas de tipo holina, sugerindo que estas holinas são responsáveis

por exportação de endolisina para a parede celular.  
Wooldridge, BACT. SECRETED PROTS: SECRETORY MECHS. & ROLE IN  
PATHOGEN. (Caister Academic Press, 2009)

Em algumas formas de realização, a sequência de sinal  
5 utilizável na presente invenção é uma sequência de sinal  
OmpA, no entanto, qualquer sequência de sinal comumente  
conhecida por versados na arte, que permite o transporte e  
secreção de agentes antimicrobianos fora da célula  
infectada de bacteriófago é englobada para uso na presente  
10 invenção.

Sequências de sinal que dirigem a secreção de  
proteínas a partir de células bacterianas são bem  
conhecidas na arte, por exemplo, como descrito no pedido de  
patente internacional WO 2005/071088. Por exemplo, pode-se  
15 usar alguns dos exemplos não limitativos de peptídeos de  
sinal representados na Tabela 5, que podem ser fixados ao  
terminal amino ou terminal carboxila do peptídeo  
antimicrobiano (Amp) ou polipeptídeo antimicrobiano a ser  
expressado pelo bacteriófago engenheirado pelo agente  
20 antimicrobiano, por exemplo, bacteriófago engenheirado por  
AMP. A fixação pode ser através de fusão ou composição  
quimera com o antígeno selecionado ou proteína de fusão  
antígeno- molécula de afinidade complementar, resultando na  
secreção de bactéria infectada com o bacteriófago

engenheirado pelo agente antimicrobiano, por exemplo, bacteriófago engenheirado por AMP.

Tabela 5: Peptídeos de sinal exemplares para dirigir a secreção de uma proteína ou antígeno de peptídeo ou proteína de fusão antígeno- molécula de afinidade complementar de uma célula bacteriana

Via de secreção	Sequência de aminoácido de peptídeo de sinal (NH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> )	Gene	Gênero/espécie
secA1	MKKIMLVITLILVSPIAQQTEAKD (SEQ ID NO: 44)	Hly (LLO)	<i>Listeria monocytogenes</i>
	MKKKIISAILMSTVILSAAAPLSGVYADT (SEQ ID NO: 45)	Usp45	<i>Lactococcus lactis</i>
	MKKRKVLIPLMALSTILVSSTGNLEVIQAEV (SEQ ID NO: 46)	Pag (antígeno protetor)	<i>Bacillus anthracis</i>
secA2	MNMKKATIAATAGIAVTAFAPTIASAST (SEQ ID NO: 47)	Iap (proteína associada em invasão p60)	<i>Listeria monocytogenes</i>
	MQKTRKERILEALQEEKKNKSKKFKTGATIAGVTAIATSITVPGIEVIVSADE (SEQ ID NO: 48)	NamA Imo2691 (autolisina)	<i>Listeria monocytogenes</i>
	MKKLKMASCALVAGLMFSGLTNPFAED (SEQ ID NO: 49)	*BA_0281 (família NLP/P60 )	<i>Bacillus anthracis</i>
	MAKKFNYKLPSMVALTLVGSAVTAHQVQAAE (SEQ ID NO: 50)	* atl (autolisina)	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tat	MTDKKSENQTEKTETKENKGMTRREMLKLSAVAGTGIAVGATGLGTILNVVDQVDKALT (SEQ ID NO: 51)	Imo0367	<i>Listeria monocytogenes</i>
	MAYDSRFDEWVQKLKEESFQNNTFDRRKFIQAGAGKIAGLGLGLTIAQSVGAFG (SEQ ID NO: 52 )	PhoD (fosfatase alcalina)	<i>Bacillus subtilis</i>

Os polipeptídeos aqui descritos, por exemplo, os antígenos ou proteína de fusão antígeno- molécula de afinidade complementar podem ser expressados e purificados por uma variedade de métodos conhecidos de um versado na arte, por exemplo, os polipeptídeos de fusão aqui descritos podem ser purificados a partir de qualquer sistema de

expressão adequado. Polipeptídeos de fusão podem ser purificados até uma pureza substancial por técnicas convencionais, incluindo precipitação seletiva com substâncias tais como sulfato de amônio; cromatografia em  
5 coluna, métodos de imunopurificação, e outros; que são bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Scopes, PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES & PRACTICE (1982); Patente US 4.673.641.

Um número de procedimentos pode ser empregado quando proteínas recombinantes são purificadas. Por exemplo,  
10 proteínas tendo propriedades de adesão molecular estabelecidas podem ser reversivelmente fusionadas com a proteína de escolha. Com o ligando apropriado, a proteína pode ser seletivamente adsorvida para uma coluna de purificação e, então, liberada da coluna em uma forma  
15 relativamente pura. A proteína fusionada é, então, removida por atividade enzimática. Finalmente, a proteína de escolha pode ser purificada usando colunas de afinidade ou imunoafinidade.

Após a proteína ser expressada em células hospedeiras,  
20 as células hospedeiras podem ser lisadas para liberar a proteína expressada para purificação. Métodos de lisar as várias células hospedeiras são realizados em "Sample Preparation-Tools for Protein Research" EMD Bioscience e em Current Protocols in Protein Sciences (CPPS). Um exemplo de

método de purificação é a cromatografia de afinidade, tais como o cromatografia de afinidade metal-íon usando resinas de afinidade de níquel, cobalto, ou zinco para polipeptídeos de fusão etiquetados com histidina. Métodos de purificar as proteínas recombinantes etiquetadas com histidina são descritos por Clontech usando a sua resina de cobalto TALON® e por NOVAGEN® em seu manual de sistema de pET, 10ª edição. Outra estratégia de purificação preferida é a cromatografia de imuno-afinidade, por exemplo, resina conjugada a anticorpo anti-myc pode ser usada para purificar por afinidade polipeptídeos de fusão etiquetados com myc. Quando as sequências de reconhecimento de proteases adequadas estão presentes, os polipeptídeos de fusão podem ser clivados a partir da etiqueta de histidina ou myc, liberando o polipeptídeo de fusão da resina de afinidade enquanto as etiquetas histidina e etiquetas myc são deixadas fixadas à resina de afinidade.

Técnicas de separação padrão para a purificação de proteínas recombinante e de ocorrência natural são bem conhecidas na arte, por exemplo, fracionamento por solubilidade, filtração em gel por exclusão de tamanho, e várias cromatografias em coluna.

*Fracionamento em solubilidade:* Muitas vezes como etapa inicial, em particular se a mistura de proteínas é



complexa, um fracionamento inicial de sal pode separar muitas das proteínas da célula hospedeira indesejáveis (ou proteínas derivadas do meio de cultura de células) da proteína de interesse. O sal preferido é o sulfato de amônio. Sulfato de amônio precipita as proteínas reduzindo eficazmente a quantidade de água na mistura de proteínas. As proteínas precipitam então com base na sua solubilidade. Quanto mais hidrofóbica é uma proteína, mais provavelmente ela irá precipitar em baixas concentrações de sulfato de amônio. Um protocolo típico inclui adicionar sulfato de amônio saturado a uma solução de proteína de modo a que a concentração de sulfato de amônio resultante esteja entre 20-30%. Esta concentração irá precipitar as mais hidrofóbicas das proteínas. O precipitado é então descartado (a menos que a proteína de interesse seja hidrofóbica) e sulfato de amônio é adicionado ao sobrenadante a uma concentração conhecida, para precipitar a proteína de interesse. O precipitado é então solubilizado em tampão e o excesso de sal removido se necessário, quer através de diálise ou de diafiltração. Outros métodos que se baseiam na solubilidade de proteínas, tais como precipitação com etanol frio, são bem conhecidos dos versados na arte e podem ser usados para fracionar misturas de proteínas complexas.

*Filtração por exclusão de tamanho:* O peso molecular da proteína de escolha pode ser usado para isolar a mesma de proteínas de maior e menor tamanho usando ultrafiltração através de membranas de diferentes tamanhos de poro (por exemplo, membranas AMICON® ou MILLIPORE®). Como uma primeira etapa, a mistura de proteínas é ultrafiltrada através de uma membrana com um tamanho de poro que tem um peso molecular de corte menor do que o peso molecular da proteína de interesse. O produto retido da ultrafiltração é então ultrafiltrado contra uma membrana com um corte molecular maior do que o peso molecular da proteína de interesse. A proteína recombinante irá passar através da membrana para o filtrado. O filtrado pode ser então cromatografado, como descrito a seguir.

*Cromatografia em coluna:* A proteína de escolha também pode ser separada de outras proteínas com base no seu tamanho, carga de superfície líquida, hidrofobicidade e afinidade para ligandos. Além disso, os anticorpos produzidos contra as proteínas recombinantes ou que ocorrem naturalmente podem ser conjugados a matrizes de coluna e proteínas imunopurificadas. Todos estes métodos são bem conhecidos na arte. Será evidente para um especialista que as técnicas cromatográficas pode ser realizadas em qualquer escala e usando equipamento de fabricantes diferentes (por

exemplo, Pharmacia Biotech). Por exemplo, um polipeptídeo do antígeno pode ser purificado usando uma coluna de afinidade de heptâmero PA63. Singh et al., 269, J. Biol. Chem. 29039 (1994).

5        Em algumas formas de realização, uma combinação de etapas de purificação compreendendo, por exemplo: (a) cromatografia de troca iônica, (b) cromatografia em hidroxapatita, (c) cromatografia de interação hidrofóbica, e (d) cromatografia de exclusão de tamanho podem ser usadas  
10      para purificar os polipeptídeos de fusão aqui descritos.

Os sistemas de expressão livre de celulares são também contemplados. Sistemas de expressão livre de celulares oferecem várias vantagens sobre os métodos tradicionais de expressão baseados em células, incluindo a modificação  
15      fácil de condições de reação para favorecer a duplicação de proteínas, sensibilidade diminuída à toxicidade do produto e adequação de estratégias para alto rendimento, como a rápida triagem de expressão ou produção de grande quantidade de proteína com volumes de reação e tempo de  
20      processo reduzidos. O sistema de expressão isento de células pode usar DNA plasmídeo ou linear. Além disso, as melhorias na eficiência da tradução resultaram em rendimentos superiores a um miligrama de proteína por mililitro da mistura de reação. Os sistemas de expressão

isentos de células disponíveis comercialmente incluem sistemas de lisado de reticulócitos copulados a TNT (Promega), que usam sistema *in vitro* baseados em reticulócitos de coelho.

5           ***Formulações de uma composição imune e métodos de uso***

Formas de realização específicas da presente invenção provêem o uso das composições imunogênicas, como aqui descrito, para induzir uma resposta imune em um animal. Mais especificamente, as composições elicitam imunidade humoral e celular, e em muitos casos imunidade mucosal. Formas de realização da presente invenção proporcionam uma proteção pelo menos parcial de melhora parcial ou depois da infecção por, em particular, pneumococos. Os pneumococos causam certo número de doenças, tais como a meningite, pneumonia, bacteremia e otite média. Quase um milhão de crianças morrem de doenças pneumocócicas em todo o mundo a cada ano. *S. pneumoniae* foi estudado extensivamente, e, pelo menos, alguns dos genomas sequenciados. Ver, por exemplo, Patente US No. 7.141.418. Embora os anticorpos contra os polissacarídeos capsulares, que definem os sorotipos conhecidos, conferem uma proteção específica do sorotipo, outros mecanismos de proteção de imunidade foram descritos. Ver Malley et al., 88 J. Mol. Med. 135 (2010). Estes outros mecanismos de proteção incluem, mas não estão

limitados a, anticorpos para antígenos não capsulares e respostas de células T para os constituintes pneumocócicos. A aplicação da vacina conjugada proteína-polissacarídeo, PCV7, reduziu significativamente as doenças. Black et al., 24(S2) Vaccine 79 (2006); Hansen et al., 25 Pediatr. Infect. Dis. J. 779 (2006)). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a ausência de outros sorotipos em PCV7 resultou no aparecimento de sorotipos de pneumococos de substituição. Pichichero & Casey, 26(S10) Pediatr. Infect. Dis. J. S12 (2007).

Alguns antígenos pneumocócicos comuns a todos os sorotipos de espécies têm mostrado ter potencial imunoprotetor apesar da encapsulação, por exemplo, as proteínas de superfície PspA, PspC, PsaA e a pneumolisina de citotoxina ou mutantes pneumolisóides (Basset et al., 75 Infect. Immun. 5460 (2007); Briles et al., 18 Vaccine 1707 (2000)); o uso de bibliotecas genômicas e mutacionais identificou várias proteínas comuns de dezenas de espécies adicionais (Hava & Camilli, 45 Mol. Microbiol. 1389 (2002); Wizemann et al., 60 Infect. Immun. 1593 (2001)). Imunidade foi induzida por antígenos individuais em modelos animais (Alexander et al., 62 Infect. Immun. 5683 (1994); Balachandran et al., 70 Infect. Immun. 2526 (2002); Chung et al., 170 J. Immunol. 1958 (2003); Glover et al., 76

Infect. Immun. 2767 (2008); Wu et al., 175 J. Infect. Dis. 839 (1997)), mas nenhuma vacina com base em um antígeno comum foi aprovada para uso humano até a presente data.

5        Em uma forma de realização, é aqui fornecido um método de vacinação de um mamífero, compreendendo a administração da composição imunogênica compreendendo pelo menos um, ou antígenos múltiplos ligados a pelo menos um tipo de andaime de polímero, por exemplo, um polímero de polissacarídeo ou  
10        carboidratos para uso na elicitação de uma resposta imune a um ou mais antígenos fixados ao polímero, quando administrados a um indivíduo. Em algumas formas de realização, a resposta imune é uma resposta imune humoral e/ou celular.

15        Portanto, um aspecto da presente invenção refere-se a métodos para elicitar uma resposta imune em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma composição imunogênica compreendendo pelo menos um tipo de polímero, por exemplo, um polissacarídeo, pelo menos, um  
20        antígeno, e, pelo menos, um par de moléculas de afinidade complementar compreendendo (i) uma molécula de primeira afinidade que se associa com o polímero, por exemplo, um polissacarídeo, e (ii) uma molécula de afinidade complementar que se associa com o antígeno, para fixar o

antígeno ao polímero, por exemplo, um polissacarídeo, (por exemplo, a molécula de primeira afinidade se associa com a molécula de afinidade complementar para ligar o antígeno ao polímero, por exemplo, polissacarídeo).

5           Portanto, um aspecto da presente invenção refere-se a métodos para elicitar uma imunidade humoral e/ou celular a antígenos múltiplos, ao mesmo tempo, por exemplo, quando a composição imunogênica administrada ao indivíduo compreende um polímero compreendendo pelo menos 1, ou pelo menos 2, ou  
10           um mais, por exemplo, uma pluralidade dos mesmos ou diferentes antígenos.

          Um aspecto da presente invenção refere-se a um método de imunização ou vacinação de um indivíduo, por exemplo, um pássaro ou um mamífero, por exemplo, um humano contra um  
15           patógeno compreende a administração de uma composição imune, como aqui descrito, compreendendo pelo menos um antígeno derivado um ou mais patógenos. Em algumas formas de realização, um indivíduo pode ser imunizado contra pelo menos 1, ou pelo menos 2, ou pelo menos 2, ou pelo menos 3,  
20           ou pelo menos 5, ou pelo menos 10, ou pelo menos 15, ou pelo menos cerca de 20, ou pelo menos 50, ou pelo menos cerca de 100, ou de mais de 100 patógenos diferentes ao mesmo tempo, em que o polímero da composição imunogênica como os antígenos diferentes correspondentes fixados.

Em algumas formas de realização, um indivíduo pode ser administrado com várias composições imunogênicas diferentes, como aqui descrito, por exemplo, um indivíduo pode ser administrado com uma composição compreendendo um polímero com um antígeno, ou uma pluralidade de antígenos, por exemplo, os antígenos A, B, C, e D, etc, e também administrado com uma composição compreendendo um polímero compreendendo um antígeno diferente ou um conjunto diferente de antígenos, por exemplo, antígenos W, X, Y, e Z, etc Alternativamente, um indivíduo pode ser administrado com uma composição compreendendo um polímero A com um antígeno, ou uma pluralidade de antígenos, por exemplo, os antígenos A, B, C, e D, etc, e também administrado com uma composição que compreende um polímero B que compreende os mesmos, por exemplo, antígenos A, B, C, e D etc, ou um conjunto diferente de antígenos. Está previsto que a presente invenção fornece métodos para a imunização de um indivíduo com tantos antígenos, como desejado, por exemplo, com uma variedade de diferentes complexos imunogênicos, como aqui descrito, para permitir a imunização com um máximo de 100 ou mais antígenos.

Em uma forma de realização, as composições imunogênicas como aqui descritas compreendem um veículo farmacêuticamente aceitável. Em outra forma de realização,



a composição imunogênica aqui descrita composição é formulada para administração a um pássaro, mamífero, ou humano, como ou em uma vacina. As formulações apropriadas podem ser encontradas em, por exemplo, Remington's  
5 Pharmaceutical Sciences (2006), ou Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms (4<sup>a</sup>. ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1985).

Em uma forma de realização, as composições imunogênicas como aqui descritas compreendem veículos  
10 farmaceuticamente aceitáveis que são inerentemente não tóxicos e não terapêuticos. Exemplos de tais veículos incluem trocadores iônicos, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas do soro, tais como albumina do soro humano, substâncias tampão tais como fosfatos, glicina,  
15 ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicerídeos parciais de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais, ou eletrólitos, tais como sulfato de protamina, hidrogeno-fosfato dissódico, fosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, tri-silicato de magnésio,  
20 polivinilpirrolidona, substâncias à base de celulose, e polietileno glicol. Para todas as administrações, as formas de depósito convencionais são apropriadamente usadas. Tais formas incluem, por exemplo, microcápsulas, nanocápsulas, lipossomas, emplastos, formas para inalação, pulverizações

nasais, comprimidos sublinguais, e preparações de liberação sustentada. Para exemplos de composições de liberação controlada, ver Patentes US 3.773.919, No. 3.887.699, EP 58.481A, EP 158.277A, Patente CA No. 1176565; Sidman et al., 22 Biopolymers 547 (1983); Langer et al., 12 Chem. Tech. 98 (1982). As proteínas irão geralmente ser formuladas a uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml por aplicação por paciente.

Em uma forma de realização, outros ingredientes podem ser adicionados às formulações de vacina, incluindo antioxidantes, por exemplo, ácido ascórbico; polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que cerca de dez resíduos), , por exemplo, poliarginina ou tripeptídeos; proteínas, como albumina do soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, ácido glutâmico, ácido aspártico, ou arginina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo celulose ou seus derivados, glicose, manose, ou dextrinas, agentes quelantes tais como EDTA; e alcoóis de açúcar tais como manitol ou sorbitol.

Em algumas formas de realização, as presentes composições imunogênicas MAPS são administradas com pelo menos um adjuvante. Os adjuvantes são um grupo heterogêneo

de substâncias que acentuam a resposta imune contra um antígeno que é administrado simultaneamente. Em alguns casos, os adjuvantes melhoram a resposta imune de modo que é necessário menos vacina. Adjuvantes servem para levar o antígeno - a substância que estimula a resposta imune protetora específica - em contato com o sistema imune e influenciar o tipo de imunidade produzida, bem como a qualidade da resposta imune (grandeza ou duração). Os adjuvantes também podem diminuir a toxicidade de certos antígenos, e proporcionar solubilidade para alguns componentes da vacina. Quase todos os adjuvantes usados hoje em dia para a melhoria da resposta imune contra os antígenos são partículas ou foram partículas em conjunto com o antígeno. No livro VACCINE DESIGN-SUBUNIT & ADJUVANT APPROACH (Powell & Newman, Eds., Plenum Press, 1995), muitos adjuvantes conhecidos são descritos tanto em relação à sua atividade imunológica como com relação às suas características químicas. O tipo de adjuvantes que não formam partículas são um grupo de substâncias que atuam como substâncias de sinal imunológico e que, em condições normais, consistem das substâncias que são formadas pelo sistema imune como uma consequência da ativação imunológica após administração de sistemas adjuvantes particulados.

Adjuvantes para composições imunogênicas e vacinas são

bem conhecidos na arte. Exemplos incluem, mas não limitados  
 a, monoglicerídeos e ácidos graxos (por exemplo, uma  
 mistura de mono-oleína, ácido oléico, e óleo de soja); sais  
 minerais, por exemplo, hidróxido de alumínio e alumínio ou  
 5 géis de fosfato de cálcio; emulsões de óleo e formulações  
 com base em tensoativos, por exemplo, MF59 (emulsão de  
 óleo-em-água estabilizada em detergente microfluidizado),  
 QS21 (saponina purificada), AS02 [ SBAS2 ] (emulsão de óleo  
 - em - água + MPL + SQ 21), MPL - SE, Montanide ISA - 51 e  
 10 ISA - 720 (emulsão água-em-óleo estabilizada); adjuvantes  
 particulados, por exemplo, virossomas (veículos de  
 lipossomas unilamelares incorporando hemaglutinina de  
 influenza), AS04 ([ SBAS4 ] sal Al com MPL), ISCOMS  
 (complexo estruturado de saponinas e lipídios), co-  
 15 glicolídeo poliláctico (PLG); derivados microbianas  
 (natural e sintético), por exemplo, monofosforil lipídio A  
 (MPL), Detox (estrutura dorsal da parede celular MPL + M.  
 phlei), AGP [ RC- 529 ] (monossacarídeos acilados  
 sintéticos), Detox PC, DC\_Chol (imuno estimuladores  
 20 lipoidais capazes de se auto - organizar em lipossomas),  
 OM- 174 (derivado de lipídio A), motivos CpG  
 (oligonucleotídeos sintéticos contendo motivos CpG  
 imunoestimulatórios), ou outras estruturas de DNA, LT e CT  
 modificados (toxinas bacterianas geneticamente modificadas

para dar efeitos adjuvantes não-tóxicos); imunomoduladores humanos endógenos, por exemplo, hGM - CSF UO - hIL 12 (citocinas que podem ser administradas quer como proteína ou plasmídeo codificado), Immudaptin (matriz em tandem C3d), MoGM CSF, TiterMax -G, CRL -1005, GERBU, TERamide, 5 PSC97B, Adjumer, PG 026, GSK I, GcMAF, B - aletina, MPC - 026, Adjuvax, CpG ODN, Betafectina, Alúme e MF59 e veículos inertes, como partículas de ouro. Adjuvantes adicionais são conhecidos na arte, ver, por exemplo, Patente US 6.890.540; 10 Publicação de Patente US No. 2005;0244420; PCT/SE97/01003.

Em algumas formas de realização um adjuvante é um particulado e pode ter uma característica de ser lentamente biodegradável. Deve ser tomado cuidado para assegurar que o adjuvante não forme metabolitos tóxicos. De preferência, em 15 algumas formas de realização, tais adjuvantes que podem ser matrizes usadas são, principalmente, substâncias se originando de um corpo. Estes incluem polímeros de ácido láctico, ácidos poli-amino (proteínas), carboidratos, lipídios e polímeros biocompatíveis com baixa toxicidade. 20 As combinações destes grupos de substâncias se originando de um corpo ou de combinações de substâncias se originando de um corpo de polímeros biocompatíveis também podem ser usadas. Os lipídios são as substâncias preferidas, uma vez que exibem estruturas que os tornam biodegradáveis, assim

como o fato de que eles são um elemento essencial em todas as membranas biológicas.

Em uma forma de realização, as composições imunogênicas como aqui descritas para administração devem ser estéreis para administração a um indivíduo. A esterilidade é facilmente conseguida por filtração através de membranas de filtração estéril (por exemplo, membranas de 0,2 micron), ou por irradiação gama.

Em algumas formas de realização, as composições imunogênicas aqui descritas ainda compreendem excipientes farmacêuticos, incluindo, mas não limitados a óleos biocompatíveis, as soluções salinas fisiológicas, conservantes, carboidratos, proteínas, aminoácidos, agentes de controle da pressão osmótica, gases carreadores, agentes controladores de pH, solventes orgânicos, agentes hidrofóbicos, inibidores de enzimas, polímeros absorventes de água, tensoativos, promotores da absorção e agentes anti-oxidantes. Exemplos representativos de carboidratos incluem açúcares solúveis em água tais como hidropil celulose, carboximetil celulose, carboxil celulose de sódio, ácido hialurônico, quitosana, alginato, glicose, xilose, galatose, frutose, maltose, sacarose, dextrano, sulfato de condroitina, etc Os exemplos representativos de proteínas incluem albumina, gelatina, etc. Os exemplos

representativos de aminoácidos incluem glicina, alanina, ácido glutâmico, arginina, lisina, e seus sais. Tais excipientes farmacêuticos são bem conhecidos na arte.

Em algumas formas de realização, a composição imunogênica de MAPS é administrada em combinação com outros ingredientes terapêuticos, incluindo, por exemplo,  $\gamma$ -interferon, citocinas, agentes quimioterapêuticos, ou anti-inflamatórios ou agentes anti-virais. Em algumas formas de realização, a composição imunogênica, como aqui descrito, pode ser administrada com uma ou mais moléculas co-estimulatórias e/ou adjuvantes, como aqui mostrado.

Em algumas formas de realização, a composição imunogênica é administrada em uma forma pura ou substancialmente pura, mas pode ser administrada como uma composição farmacêutica, formulação ou preparação. Tal formulação compreende os MAPS aqui descritos em conjunto com veículos aceitáveis de um ou mais veículos farmacêuticamente e, opcionalmente, outros ingredientes terapêuticos. Outros ingredientes terapêuticos incluem compostos que acentuam a apresentação ao antígeno, por exemplo, interferon gama, citocinas, agentes quimioterapêuticos, ou agentes anti-inflamatórios. As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por

métodos bem conhecidos na arte farmacêutica. Por exemplo, Plotkin e Mortimer, *in* VACCINES (2ª. ed., W.B. Saunders Co., 1994) descrevem a vacinação de animais ou humanos para induzir uma resposta imune específica para determinados patógenos, assim como métodos para a preparação de antígenos, determinando uma dose apropriada de antígeno, e testando para a indução de uma resposta imune.

As formulações adequadas para administração intravenosa, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, vaginal, retal, subcutânea, ou intraperitoneal compreendem convenientemente soluções aquosas estéreis do ingrediente ativo com soluções que são preferencialmente isotônicas com o sangue do receptor. Tais formulações podem ser convenientemente preparadas por dissolução do ingrediente ativo sólido em água contendo substâncias fisiologicamente compatíveis tais como cloreto de sódio (por exemplo, 0,1 M-2,0 M), glicina, e semelhantes, e tendo um pH tamponado compatível com condições fisiológicas para produzir uma solução aquosa, e tornando a solução estéril. Estes podem estar presentes em recipientes de doses únicas ou de múltiplas doses, por exemplo, ampolas ou frascos selados.

Suspensões lipossomais podem também ser usadas como veículos farmacêuticamente aceitáveis. Estas podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos pelos



especialistas na arte, por exemplo, como descrito na Patente US 4.522.811.

As formulações para uma administração intranasal são descritas nas Patentes US 5.427.782; No. 5.843.451; 5 No. 6.398.774.

As formulações das composições imunogênicas podem incorporar um estabilizador. Estabilizadores ilustrativos são polietileno glicol, proteínas, sacarídeos, aminoácidos, ácidos inorgânicos, e ácidos orgânicos que podem ser 10 usados, sozinhos ou como misturas. Dois ou mais estabilizadores podem ser usados em soluções aquosas na concentração e/ou valor de pH apropriado. A pressão osmótica específica de tal solução aquosa está geralmente na faixa de 0,1-3,0 osmoses, preferivelmente na faixa de 15 0,80-1,2. O pH da solução aquosa é ajustado para estar dentro da faixa de pH 5,0-9,0, preferivelmente dentro da faixa de pH 6, 8.

Quando as preparações orais são desejadas, as composições imunogênicas podem ser combinadas com veículos 20 típicos, tais como latose, sacarose, amido, estearato de magnésio talco, celulose cristalina, metilcelulose, carboximetilcelulose, glicerina, alginato de sódio ou goma arábica entre outros.

Em algumas formas de realização, as composições

imunogênicas, como aqui descrito, podem ser administradas por via intravenosa, por via intranasal, por via intramuscular, por via subcutânea, intraperitoneal, sublingual, vaginal, retal ou por via oral. Em algumas formas de realização, a via de administração é oral, intranasal, subcutânea, ou intramuscular. Em algumas formas de realização, a via de administração é a administração intranasal.

A vacinação pode ser conduzida por métodos convencionais. Por exemplo, composições imunogênicas podem ser usadas em um diluente apropriado, tal como solução salina ou água ou adjuvantes completos ou incompletos. A composição imunogênica pode ser administrada por qualquer via de administração adequada para induzir uma resposta imune. A composição imunogênica pode ser administrada uma vez ou em intervalos periódicos até que uma resposta imune ser elicitada. As respostas imunes podem ser detectadas por uma variedade de métodos conhecidos dos versados na arte, incluindo, mas não limitados a, a produção de anticorpos, ensaio de citotoxicidade, ensaios de proliferação e ensaios de liberação de citocinas. Por exemplo, amostras de sangue podem ser extraídas do mamífero imunizado, e analisadas quanto à presença de anticorpos contra os antígenos da composição imunogênica por ELISA (ver de Boer et. al., 115

Arch Virol. 147 (1990) e o título desses anticorpos pode ser determinado por métodos conhecidos na arte.

A dose exata a ser usada na formulação também dependerá da via de administração e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico e circunstâncias de cada paciente. Por exemplo, uma faixa de 25 µg-900 µg de proteína total pode ser administrada mensalmente durante três meses.

Finalmente, o médico assistente decidirá a quantidade de composição imunogênica ou composição de vacina a administrar a indivíduos particulares. Tal como acontece com todas as composições imunogênicas ou vacinas, as quantidades imunogenicamente eficazes dos imunogênios devem ser determinadas empiricamente. Os fatores a serem considerados incluem a imunogenicidade, se ou não imunogênio será complexado com ou covalentemente fixado a um adjuvante ou proteína de suporte ou outro carreador, vias de administração e o número de doses imunizantes a serem administradas. Tais fatores são conhecidos na arte de vacinas e está bem dentro da habilidade dos imunologistas fazer estas determinações sem indevida experimentação.

Em uma forma de realização, uma composição imunogênica ou composição de vacina, como aqui descrito, quando administrada aos camundongos, pode provocar uma resposta

imune que impede um sintoma de doença em pelo menos 20% de animais desafiados com 5 LD<sub>50</sub> da composição imunogênica compreendendo antígenos para os quais o sintoma da doença é evitado. Os métodos de vacinação e desafio de um animal imunizado são conhecidos por um versado na arte. Por exemplo, uma alíquota de 10 µg de uma composição imunogênica ou composição de vacina, como aqui descrito, pode ser preparada em 100 µl de PBS e/ou com a adição de adjuvante de Freund incompleto e injetado por via intramuscular, por camundongo por vacinação. Alternativamente, injeções parenteral, intraperitoneal e na almofada plantar podem ser usadas. Volumes de injeções nas almofadas plantares são reduzidos para 50 µl. Os camundongos podem ser imunizados com uma composição imunogênica ou composição de vacina, como aqui descrito, em três ocasiões separadas com intervalos de vários dias, por exemplo, 14 dias entre as mesmas.

A eficácia da vacinação pode ser testada por desafio com o patógeno. Sete dias após a última dose de uma composição imunogênica, os camundongos imunizados são desafiados por via intranasal com um organismo patogênico a partir do qual o antígeno foi derivado. Camundongos anestesiados por éter (10 g a 12 g) podem ser infectados por via intranasal com 50 µl de fluido alantóico diluído em

PBS contendo 5 LD<sub>50</sub> do organismo patogênico. A proteção pode ser medida monitorando a sobrevivência dos animais e o peso corporal, que é avaliado ao longo de um período de observação de 21 dias. Camundongos severamente afetados são sacrificados. Uma LD<sub>50</sub> de A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 é igual a 100-1000 do teste de dose 50 infecciosa de cultura de tecido (TCID<sub>50</sub>).

Em outras formas de realização, os camundongos imunizados podem ser desafiados com uma variedade de diferentes organismos patogênicos, por exemplo, diferentes organismos patogênicos a partir do qual cada um dos antígenos fixados ao polímero são derivados. Por exemplo, uma composição imunogênica compreende cinco antígenos diferentes fixados ao polímero, por exemplo, polissacarídeo, em que cada antígeno é derivado a partir de cinco diferentes organismos patogênicos, os camundongos imunizados podem ser desafiados com cada um dos cinco organismos patogênicos diferentes, ou sequencialmente (em qualquer ordem) ou simultaneamente. Um versado na arte seria capaz de determinar LD<sub>50</sub> para cada organismo patogênico usado para desafiar os camundongos imunizados por meio de métodos conhecidos na arte. Ver, por exemplo, LaBarre & Lowy, 96 J. Virol. Meths. 107 (2001); Golub, 59J. Immunol. 7 (1948).

Kits

A presente invenção também fornece kits para a produção de uma composição imunogênica, como aqui descrito, que é útil para um investigador adaptar uma composição imunogênica com os seus antígenos preferidos, por exemplo, para fins de pesquisa para avaliar o efeito de um antígeno, ou uma combinação de antígenos sobre a resposta imune. Tais kits podem ser preparados a partir de materiais e reagentes prontamente disponíveis. Por exemplo, tais kits podem compreender qualquer um ou mais dos seguintes materiais: um recipiente compreendendo um polímero, por exemplo, um polissacarídeo, reticulado com uma pluralidade de moléculas de primeira afinidade, e um recipiente compreendendo uma molécula de afinidade complementar que se associa com a molécula de primeira afinidade, em que a molécula de afinidade complementar se associa com um antígeno.

Em outra forma de realização, o kit pode compreender um recipiente compreendendo um polímero, por exemplo, um polissacarídeo, um recipiente compreendendo uma pluralidade de moléculas de primeira de afinidade, e um recipiente compreendendo um reagente de reticulação para reticulação das moléculas de primeira afinidade para o polímero.

Em algumas formas de realização, o kit compreende ainda um meio para fixar a molécula de afinidade

complementar para o antígeno, onde o meio pode ser obtido por um reagente de reticulação ou de alguma proteína de fusão intermediária. Em algumas formas de realização, o kit pode compreender pelo menos um fator de co-estimulação, que  
 5 pode ser adicionado ao polímero. Em algumas formas de realização, o kit compreende um reagente de reticulação, por exemplo, mas não limitado a, CDAP (tetrafluoroborato fr 1-ciano-4-dimetilaminopiridínio), EDC (clodridrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida), cianoboro-  
 10 hidreto de sódio; brometo de cianogênio; bicarbonato de amônio/ácido iodoacético para ligar o co-fator para o polímero.

Vários kits e componentes podem ser preparados para uso nos métodos aqui descritos, dependendo do uso a que se  
 15 destina o kit, o antígeno alvo em particular e necessidades do usuário.

A invenção pode ser melhor descrita por qualquer uma das formas de realização nos seguintes parágrafos numerados:

20 1. Uma proteína de ligação à biotina solúvel, compreendendo uma sequência de aminoácidos  
 FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTG  
 RVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQ  
 DTFQYVPTTENKSLKLD (SEQ ID NO: 1) e qualquer um de seus

derivados funcionais.

2. A ligação de biotina do parágrafo 1, em que a proteína de ligação à biotina é produzida na forma solúvel a um nível de pelo menos 10 mg/L de meio de cultura em *E. coli*.

3. A proteína de ligação à biotina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, em que a proteína de ligação à biotina é um dímero.

4. A proteína de ligação à biotina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que a proteína de ligação à biotina compreende uma sequência de sinal bacteriana no N-terminal.

5. A proteína de ligação à biotina do parágrafo 4, em que a sequência de sinal bacteriana é MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID No: 2).

6. A proteína de ligação à biotina de qualquer parágrafo 4 ou 5, em que a sequência de sinal é ligada à proteína de biotina via um ligador de peptídeo.

7. A proteína de ligação à biotina do parágrafo 6, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos AQDP (SEQ ID NO: 8) ou VSDP (SEQ ID NO: 9).

8. A proteína de ligação à biotina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, em que a proteína de ligação à biotina compreende uma etiqueta de purificação no



C-término.

9. A proteína de ligação à biotina do parágrafo 8, em que a etiqueta de purificação é selecionada dentre o grupo consistindo de uma etiqueta histidina, uma etiqueta c-my, uma etiqueta Halo, uma etiqueta Flag, e quaisquer combinações das mesmas.

10. A proteína de ligação à biotina do parágrafo 9, em que a etiqueta histidina compreende a sequência de aminoácidos HHHHHH (SEQ ID NO: 10).

11. A proteína de ligação à biotina de acordo com qualquer uma das reivindicações 8-10, em que a etiqueta de purificação é ligada à proteína de ligação à biotina via um ligador de peptídeo.

12. A proteína de ligação à biotina do parágrafo 11, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos VDKLAAALE (SEQ ID NO: 11) ou GGGGSSSVDKLAAALE (SEQ ID NO: 12).

13. A proteína de ligação à biotina de qualquer parágrafo 1-12, em que a proteína de ligação à biotina compreende a sequência de aminoácidos

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQV  
DSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQ  
VNGNNTIIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDG GGGSSSVDKLAAA  
LEHHHHHH (SEQ ID NO: 15).

14. Uma composição compreendendo uma proteína de ligação à biotina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13.

15. Uma proteína de fusão compreendendo uma proteína de ligação à biotina e de uma proteína ou um peptídeo.

16. A proteína de fusão do parágrafo 15, em que a proteína ou peptídeo é fusionado com a proteína de ligação à biotina via um ligador de peptídeo.

17. A proteína de fusão do parágrafo 15, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos GGGGSSS (SEQ ID NO: 22).

18. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 15-17, em que a proteína ou peptídeo é um antígeno selecionado dentre o grupo consistindo de: antígenos pneumocócicos, antígenos de tuberculose, antígenos do antraz, antígenos de HIV, antígenos da gripe sazonal ou epidêmica, antígenos influenzae, antígenos de coqueluche, antígenos de *Staphylococcus aureus*, antígenos meningocócicos, antígenos de *Haemophilus*, antígenos de HPV, ou combinações dos mesmos.

19. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 15-18, em que o antígeno é uma variante não hemolítica da alfa-hemolisina de *S. aureus*.

20. A fusão do parágrafo 19, em que a variante não

hemolítica de alfa-hemolisina de *S. aureus* compreende uma mutação no resíduo de aminoácidos 205, 213 ou 209-211 da alfa-hemolisina de *S. aureus* tipo selvagem.

21. A proteína de fusão do parágrafo 19, em que a variante não hemolítica de alfa-hemolisina de *S. aureus* compreende uma das seguintes mutações na alfa-hemolisina de *S. aureus* de tipo selvagem: (i) resíduo de 205 W a A, (ii) resíduo de 213 W a A, ou (iii) resíduos 209-211 DRD para AAA.

22. A proteína de fusão do parágrafo 19, em que a variante não hemolítica de alfa-hemolisina de *S. aureus* compreende a sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo de:

W205A

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENG MHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKG  
 TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYP RNSIDTKEYMSTLTY  
 GFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQ  
 NAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDR  
 KASKQQTNI DVIERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN

(SEQ ID NO: 23);

W213A

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENG MHKKVFYSFIDDKNHNKKLLV  
 IRTKG TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYP RNSIDTKEYM  
 STLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFN

NMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV  
 ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEE  
 MTN (SEQ ID NO: 24);

DRD209-211AAA

5       ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLV  
 IRTKGTTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYM  
 STLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFN  
 NMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV  
 ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEE

10      MTN (SEQ ID NO: 25); e

variantes funcionais, porções, e seus derivados.

23. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 15-22, em que a proteína de fusão compreende uma sequência de sinal bacteriana no N-terminal.

15       24. A proteína de fusão do parágrafo 23, em que a sequência de sinal bacteriana é MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID No: 2).

20       25. A proteína de fusão de qualquer um dos parágrafos 23 ou 24, em que a sequência de sinal é ligada à proteína de biotina via um ligador de peptídeo.

26. A proteína de fusão do parágrafo 25, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos AQDP (SEQ ID NO: 8) ou VSDP (SEQ ID NO: 9).

27. A proteína de fusão de qualquer uma das

reivindicações 15-26, em que a proteína de fusão compreende uma etiqueta de purificação no C-término.

28. A proteína de fusão do parágrafo 27, em que a etiqueta de purificação é selecionada dentre o grupo  
5 consistindo de uma etiqueta histidina, uma etiqueta c-my, uma etiqueta Halo, uma etiqueta Flag, e quaisquer combinações das mesmas.

29. A proteína de fusão do parágrafo 27, em que a etiqueta histidina compreende a sequência de aminoácidos  
10 HHHHHH (SEQ ID NO: 10).

30. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 27-29, em que a etiqueta de purificação é ligada à proteína de ligação à biotina via um ligador de peptídeo.

15 31. A proteína de fusão do parágrafo 30, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos VDKLAAALE (SEQ ID NO: 11).

32. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 15-31, em que a proteína de ligação à biotina é uma proteína de ligação à biotina de qualquer uma  
20 das reivindicações 1-13.

33. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 15-32, em que a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo

consistindo de:

W205A

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQV  
 DSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQ  
 5 VNGNNTTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINI  
 KTGTDDIGSNTTVKTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYR  
 VYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTYGFNGNVT  
 GDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDR  
 DSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQT  
 10 NIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALE  
 HHHHHH (SEQ ID NO: 26);

W213A

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQV  
 DSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQ  
 15 VNGNNTTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINI  
 KTGTDDIGSNTTVKTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYR  
 VYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTYGFNGNVT  
 GDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDR  
 DSANPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQT  
 20 NIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALE  
 HHHHHH (SEQ ID NO: 27);

DRD209-211AA

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQV  
 DSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQ

VNGNNT EIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLKDG GGGSSSADSDINI  
 KTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENG MHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYR  
 VYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLT YGFNGNVT  
 GDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAA  
 5 ASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQT  
 NIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLA AALE  
 HHHHHH (SEQ ID NO: 28).

34. Composição compreendendo uma proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 15-33.

10 35. Um proteína de alfa-hemolisina (mHla) mutante, compreendendo uma mutação no resíduo de aminoácido 205, 213 ou 209-211 de alfa-hemolisina de *S. aureus* do tipo selvagem, em que a alfa-hemolisina mutante tem atividade hemolítica mais baixa do que um título equivalente da alfa-hemolisina (Hla) tipo selvagem.  
 15

36. A alfa-hemolisina mutante do parágrafo 35, em que a atividade hemolítica da alfa-hemolisina mutante é, pelo menos, 25% mais baixa do que um título equivalente de Hla tipo selvagem.

20 37. A alfa-hemolisina mutante do parágrafo 35 ou 36, em que a alfa-hemolisina mutante compreende uma das seguintes mutações na alfa-hemolisina de *S. aureus* tipo selvagem: (i) resíduo de 205 W a A, (ii) resíduo de 213 W a A, ou (iii) os resíduos 209-211 DRD a AAA.

38. A alfa-hemolisina mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 13-15, em que a alfa-hemolisina mutante, compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo de:

5 W205A

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKG  
 TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTY  
 GFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQ  
 NAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDR  
 10 KASKQQTNIIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGNTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN  
 (SEQ ID NO: 23);

W213A

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLV  
 IRTKGTTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYM  
 15 STLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFN  
 NMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV  
 ITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGNTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEE  
 MTN (SEQ ID NO: 24);

DRD209-211AAA

20 ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLV  
 IRTKGTTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYM  
 STLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFN  
 NMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV  
 ITMDRKASKQQTNIIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGNTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEE



MTN (SEQ ID NO: 25); e

variantes funcionais, porções, e seus derivados.

39. Uma composição compreendendo uma alfa-hemolisina mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-  
5 38.

40. Uma proteína de fusão compreendendo uma alfa-hemolisina e um domínio de ligação de biotina, em que a proteína de fusão tem uma atividade hemolítica mais baixa do que um título equivalente da alfa-hemolisina tipo selvagem (Hla).  
10

41. A proteína de fusão do parágrafo 18, em que a alfa-hemolisina é uma hemolisina mutante de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-38 ou a alfa-hemolisina consiste da sequência de aminoácidos dos aminoácidos 27-319  
15 de alfa-hemolisina de *S. aureus* tipo selvagem.

42. A proteína de fusão do parágrafo 19, em que o domínio de ligação de biotina consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

43. A proteína de fusão de qualquer uma das  
20 reivindicações 40-42, em que o domínio de ligação de biotina e a alfa-hemolisina mutante são ligados por um ligador de peptídeo.

44. A proteína de fusão do parágrafo 43, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos

GGGGSSS (SEQ ID NO: 22).

45. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 40-44, em que a proteína de fusão compreende uma sequência de sinal bacteriana no N-terminal.

5 46. A proteína de fusão do parágrafo 45, em que a sequência de sinal bacteriana é MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID No: 2).

47. A proteína de fusão de qualquer um dos parágrafos 45 ou 46, em que a sequência de sinal é ligada à proteína  
10 de biotina via um ligador de peptídeo.

48. A proteína de fusão do parágrafo 47, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos AQDP (SEQ ID NO: 8) ou VSDP (SEQ ID NO: 9).

49. A proteína de fusão de qualquer uma das  
15 reivindicações 40-48, em que a proteína de fusão compreende uma etiqueta de purificação no C-término.

50. A proteína de fusão do parágrafo 49, em que a etiqueta de purificação é selecionada dentre o grupo consistindo de uma etiqueta histidina, uma etiqueta c-my,  
20 uma etiqueta Halo, uma etiqueta Flag, e quaisquer combinações das mesmas.

51. A proteína de fusão do parágrafo 50, em que a etiqueta histidina compreende a sequência de aminoácidos HHHHHH (SEQ ID NO: 10).

52. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 49-51, em que a etiqueta de purificação é ligada à proteína de ligação à biotina via um ligador de peptídeo.

5 53. A proteína de fusão do parágrafo 52, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos VDKLAAALE (SEQ ID NO: 11).

10 54. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 40-53, em que o domínio de ligação de biotina é uma proteína de ligação à biotina de qualquer uma das reivindicações 1-13.

15 55. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 40-54, em que a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, e SEQ ID NO: 28.

20 56. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 40-55, em que a atividade hemolítica da proteína de fusão é, pelo menos, 25% mais baixa do que um título equivalente de Hla tipo selvagem.

57. Composição compreendendo uma proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 40-56.

58. Um método induzindo uma resposta imune em um indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de

uma composição de parágrafo 14, 34, 39, ou 57.

59. Um método de vacinação de um mamífero contra pelo menos um patógeno carregando um antígeno, o método compreendendo a administração de uma composição dos parágrafos 14, 34, 39, ou 57.

60. O Método de qualquer uma das reivindicações 58 ou 59, em que o indivíduo é um humano.

61. O método de qualquer uma das reivindicações 58 ou 59, em que o indivíduo é um animal de criação ou não doméstico.

62. O método de qualquer uma das reivindicações 58 ou 59, em que o indivíduo é um animal doméstico.

63. O método de qualquer uma das reivindicações 58 ou 59, em que a administração é através de injeção subcutânea, intranasal, intradérmica ou por injeção intra muscular.

64. O método do parágrafo 58, em que a resposta imune é uma resposta de anticorpo/célula B.

65. O método do parágrafo 58, em que a resposta imune é uma resposta de células T CD4+ , incluindo resposta Th1, Th2, ou Th17.

66. O método do parágrafo 58, em que a resposta imune é uma resposta de células T CD8+.

67. A composição de qualquer uma das reivindicações 14, 34, 39, ou 57 para uso em diagnóstico para exposição a

um patógeno ou ameaça imune.

68. Uma proteína de ligação à biotina lipídada, compreendendo uma sequência de aminoácidos  
FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTG  
5 RVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQ  
DTFQYVPTTENKSLKLD (SEQ ID NO: 1) e qualquer um de seus derivados funcionais.

69. A ligação de biotina lipídada de acordo com o parágrafo 68, em que a proteína de ligação à biotina é  
10 produzida na forma solúvel a um nível de pelo menos 10 mg/L de meio de cultura em *E. coli*.

70. A proteína de ligação à biotina lipídada de qualquer uma das reivindicações 68-69, em que a proteína de ligação à biotina é um dímero.

15 71. A proteína de ligação à biotina lipídada de acordo com qualquer uma das reivindicações 68-70, em que a proteína de ligação à biotina compreende uma sequência de lipidação no N-terminal.

20 72. A proteína de ligação à biotina lipídada de acordo com o parágrafo 71, em que a sequência de lipidação é MKKVAAFVALSLLMAGC (SEQ ID No: 3)

73. A proteína de ligação à biotina lipídada de acordo com qualquer um dos parágrafos 71 ou 72, em que a sequência de lipidação é ligada à proteína de biotina por um ligador

de peptídeo.

74. A proteína de ligação à biotina lipídada de acordo com o parágrafo 73, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos AQDP (SEQ ID NO: 8) ou VSDP (SEQ ID NO: 9).

75. A proteína de ligação à biotina lipídada de acordo com qualquer uma das reivindicações 68-74, em que a proteína de ligação à biotina compreende uma etiqueta de purificação no C-término.

76. A proteína de ligação à biotina lipídada de acordo com o parágrafo 75, em que a etiqueta de purificação é selecionada dentre o grupo consistindo de uma etiqueta histidina, uma etiqueta c-my, uma etiqueta Halo, uma etiqueta Flag, e quaisquer combinações das mesmas.

77. A proteína de ligação à biotina lipídada do parágrafo 76, em que a etiqueta histidina compreende a sequência de aminoácidos HHHHHH (SEQ ID NO: 10).

78. A proteína de ligação à biotina lipídada de qualquer uma das reivindicações 75-77, em que a etiqueta de purificação é ligada à proteína de ligação à biotina via um ligador de peptídeo.

79. A proteína de ligação à biotina lipídada de parágrafo 78, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos VDKLAAALE (SEQ ID NO: 11) ou

GGGGSSSVDKLAAALE (SEQ ID NO: 12).

80. A proteína de ligação à biotina lipídada de qualquer um dos parágrafos 68-79, em que a proteína de ligação à biotina compreende a sequência de aminoácidos

5 MKKVAAFVALSLLMAGCVSDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVS  
GQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNT  
IVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLKLD (SEQ ID NO: 20).

81. Uma composição compreendendo uma proteína de ligação à biotina lipídada de qualquer uma das

10 reivindicações 68-80.

82. Uma proteína de fusão compreendendo uma proteína de ligação à biotina lipídada e uma proteína ou um peptídeo.

83. A proteína de fusão do parágrafo 82, em que a

15 proteína ou peptídeo é fusionado a uma proteína de ligação à biotina lipídada por um ligador de peptídeo.

84. A proteína de fusão do parágrafo 83, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos GGGGSSS (SEQ ID NO: 22).

20 85. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 82-84, em que a proteína ou peptídeo é um antígeno selecionado dentre o grupo consistindo de: antígenos pneumocócicos, antígenos de tuberculose, antígenos do antraz, antígenos de HIV, antígenos da gripe

sazonal ou epidemias, antígenos de influenza, antígenos de coqueluche, antígenos de *Staphylococcus aureus*, antígenos meningocócicos, antígenos de *Haemophilus*, antígenos de HPV, ou combinações dos mesmos.

5           86. A proteína de fusão de qualquer um dos parágrafos 85, em que o antígeno é uma variante não-hemolítica da alfa-hemolisina de *S. aureus*.

          87. A fusão do parágrafo 86, em que a variante não-hemolítica da alfa-hemolisina de *S. aureus* compreende uma  
10 mutação do resíduo de aminoácidos 205, 213 ou 209-211 de alfa-hemolisina de *S. aureus* tipo selvagem.

          88. A proteína de fusão do parágrafo 86, em que a variante não-hemolítica da alfa-hemolisina de *S. aureus* compreende uma das seguintes mutações de alfa-hemolisina de  
15 *S. aureus* tipo selvagem: (i) resíduo 205 W a A; (ii) resíduo 213 W a A; ou (iii) resíduos 209-211 DRD a AAA.

          89. A proteína de fusão do parágrafo 86, em que a variante não-hemolítica da alfa-hemolisina de *S. aureus* compreende a sequência de aminoácidos selecionada dentre o  
20 grupo consistindo de:

W205A

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKG  
TIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTY  
GFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQ



NAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDR  
KASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN  
(SEQ ID NO: 23);

W213A

5       ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKGTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLV  
IRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNSIDTKEYM  
STLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLK YVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFN  
NMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV  
ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEE  
10      MTN (SEQ ID NO: 24);

DRD209-211AAA

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKGTGDLVITYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLV  
IRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNSIDTKEYM  
STLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLK YVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFN  
15      NMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV  
ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEE  
MTN (SEQ ID NO: 25); e

variantes funcionais, porções, e seus derivados.

90. A proteína de fusão de qualquer uma das  
20 reivindicações 82-89, em que a proteína de fusão compreende  
uma sequência de lipidação no N-terminal.

91. A proteína de fusão do parágrafo 90, em que a  
sequência de lipidação é MKKVAAFVALSLLMAGC (SEQ ID No: 3).

92. A proteína de fusão de qualquer um dos parágrafos

90 ou 91, em que a sequência de sinal é ligada à proteína de biotina via um ligador de peptídeo.

93. A proteína de fusão do parágrafo 92, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos  
5 AQDP (SEQ ID NO: 8) ou VSDP (SEQ ID NO: 9).

94. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 82-93, em que a proteína de fusão compreende uma etiqueta de purificação no C-término.

95. A proteína de fusão do parágrafo 94, em que a  
10 etiqueta de purificação é selecionada dentre o grupo consistindo de uma etiqueta histidina, uma etiqueta c-my, uma etiqueta Halo, uma etiqueta Flag, e quaisquer combinações das mesmas.

96. A proteína de fusão do parágrafo 95, em que a  
15 etiqueta histidina compreende a sequência de aminoácidos HHHHHH (SEQ ID NO: 10).

97. A proteína de fusão de qualquer uma das reivindicações 93-96, em que a etiqueta de purificação é ligada à proteína de ligação à biotina via um ligador de  
20 peptídeo.

98. A proteína de fusão do parágrafo 97, em que o ligador de peptídeo compreende a sequência de aminoácidos VDKLAAALE (SEQ ID NO: 11).

99. A proteína de fusão de qualquer uma das

reivindicações 82-98, em que a proteína de ligação à biotina lipídada é uma proteína de ligação à biotina de acordo com qualquer uma das reivindicações 68-80.

100. A proteína de fusão de qualquer uma das  
 5 reivindicações 82-99, em que a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo de

(i) SEQ ID NO: 53

MKKVAAFVALSLLMAGCVSPDFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDS  
 10 FGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVN  
 GNNT EIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKT  
 GTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENG MHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVY  
 SEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYP RNSIDTKEYMSTLT YGFNGNVTGD  
 DTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDS  
 15 WNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI  
 DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKG TNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHH  
 HHHH;

(ii) SEQ ID NO: 54

MKKVAAFVALSLLMAGCVSPDFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDS  
 20 FGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVN  
 GNNT EIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKT  
 GTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENG MHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVY  
 SEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYP RNSIDTKEYMSTLT YGFNGNVTGD  
 DTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDS

ANPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI  
 DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHH  
 HHHH; e

(iii) SEQ ID NO: 55

5 MKKVAAFVALSLLMAGCVSPDFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDS  
 FGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVN  
 GNNTIEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLDGSGSSADSDINIKT  
 GTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVY  
 SEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGD  
 10 DTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAAS  
 WNPVYGNQLFMKTRNGSMKADNAFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNI  
 DVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHH  
 HHHH (SEQ ID NO: 55).

101. Uma composição compreendendo uma proteína de  
 15 ligação à biotina lipídada de acordo com qualquer uma das  
 reivindicações 82-100.

102. Um método induzindo uma resposta imune em um  
 indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de  
 uma composição de parágrafo 81 ou 101.

20 103. Um método de vacinação de um mamífero contra pelo  
 menos um patógeno carregando um antígeno, o método  
 compreendendo a administração de uma composição do  
 parágrafo 81 ou 101.

104. O Método de qualquer uma das reivindicações 102

ou 103, em que o indivíduo é um humano.

105. O método de qualquer uma das reivindicações 102 ou 103, em que o indivíduo é um animal de criação ou não doméstico.

5        106. O método de qualquer uma das reivindicações 102 ou 103, em que o indivíduo é um animal doméstico.

107. O método de qualquer uma das reivindicações 102 ou 103, em que a administração é via injeção subcutânea, intranasal, intradérmica ou injeção intra muscular.

10       108. O método do parágrafo 102, em que a resposta imune é uma resposta de anticorpo/célula B.

109. O método do parágrafo 102, em que a resposta imune é uma resposta de células T CD4<sup>+</sup>, incluindo resposta Th1, Th2, ou Th17.

15       110. O método do parágrafo 102, em que a resposta imune é uma resposta de células T CD8<sup>+</sup>.

111. A composição de qualquer uma das reivindicações 81 ou 101 para uso em um diagnóstico para exposição a um patógeno ou ameaça imune.

20       Algumas definições selecionadas

Por conveniência, certos termos empregados por todo o pedido (incluindo o relatório, exemplos, e reivindicações em anexo) são aqui reunidos. Salvo definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o

mesmo significado como comumente entendido por um versado na arte à qual esta invenção pertence.

Como aqui usado e nas reivindicações, as formas singulares incluem a referência no plural e vice-versa, a menos que o contexto indique claramente o contrário. O termo "ou" é inclusivo a não ser que modificado, por exemplo, por "ou". Exceto nos exemplos de operação, ou onde indicado em contrário, todos os números expressando quantidades de ingredientes ou condições de reação aqui usados devem ser entendidos como modificados em todos os casos pelo termo "cerca de".

O termo "composição imunogênica" aqui usado é definido como uma composição capaz de elicitar uma resposta imune, como um anticorpo ou resposta imune celular, quando administrada a um indivíduo. As composições imunogênicas da presente invenção podem ou não ser imunoprotetoras ou terapêuticas. Quando as composições imunogênicas da presente invenção previnem, melhoram, atenuam ou eliminaram a doença do indivíduo, então a composição imunogênica pode, opcionalmente, ser referida como uma vacina. Como aqui usado, no entanto, o termo composição imunogênica não pretende ser limitado a vacinas.

Como usado aqui, o termo "antígeno" refere-se a qualquer substância que inicia uma resposta imune dirigida

contra a substância. Em algumas formas de realização, um antígeno é um peptídeo ou um polipeptídeo, e em outras formas de realização, ele pode ser qualquer produto químico ou porção, por exemplo, um carboidrato, que elicita uma  
5 resposta imune dirigida contra a substância.

O termo "associa", como aqui usado refere-se à ligação de duas ou mais moléculas por ligações não covalentes ou covalentes. Em algumas formas de realização, onde ligação de duas ou mais moléculas ocorre por uma ligação covalente,  
10 as duas ou mais moléculas podem ser fusionados juntas, ou reticuladas juntas. Em algumas formas de realização, onde a ligação de duas ou mais moléculas ocorre por uma ligação não-covalente, as duas ou mais moléculas podem formar um complexo.

15 O termo "complexo", como aqui usado refere-se a um conjunto de duas ou mais moléculas, conectadas espacialmente por meios diferentes do que uma interação covalente, por exemplo, elas podem ser conectadas através de interações eletrostáticas, hidrogênio ligado ou por  
20 interações hidrofóbicas (isto é, forças de van der Waals).

Como usado aqui, o termo "fusionado" significa que pelo menos uma proteína ou peptídeo está fisicamente associado com uma segunda proteína ou peptídeo. Em algumas formas de realização, a fusão é tipicamente uma ligação

covalente, no entanto, outros tipos de ligações estão englobadas no termo "fusionado" e incluem, por exemplo, ligação através de uma interação eletrostática, ou uma interação hidrofóbica e semelhantes. A ligação covalente  
5 pode englobar ligação como uma proteína de fusão ou ligação copulada quimicamente, por exemplo, por meio de um dissulfeto ligado formado entre dois resíduos de cisteína.

Como usado aqui, o termo "polipeptídeo de fusão" ou "proteína de fusão" significa uma proteína criada pela  
10 junção de duas ou mais sequências de polipeptídeo juntas. Os polipeptídeos de fusão englobados nesta invenção incluem os produtos de tradução de um construto de gene quimérico, que junta as sequências de DNA codificando um ou mais antígenos, ou fragmentos ou mutantes dos mesmos, com a  
15 sequência de DNA codificando um segundo polipeptídeo para formar um único quadro de leitura aberta. Em outras palavras, um "polipeptídeo de fusão" ou "proteína de fusão" é uma proteína recombinante de duas ou mais proteínas que são unidas por uma ligação de peptídeo. Em algumas formas  
20 de realização, a segunda proteína à qual os antígenos são fusionados a é uma molécula de afinidade complementar que é capaz de interagir com uma molécula de primeira afinidade do par de afinidade complementar.

Os termos "polipeptídeo" e "proteína" podem ser usados



alternadamente para fazer referência a um polímero de  
resíduos de aminoácidos ligados por ligações peptídicas, e  
para os efeitos da invenção reivindicada, têm um  
comprimento mínimo típico de pelo menos 25 aminoácidos. O  
5 termo "polipeptídeo" e "proteína" pode englobar uma  
proteína multimérica, por exemplo, uma proteína contendo  
mais do que um domínio ou subunidade. O termo "peptídeo",  
como aqui usado refere-se a uma sequência de aminoácidos  
ligados a uma ligação de peptídeo contendo menos do que 25  
10 aminoácidos, por exemplo, entre cerca de 4 aminoácidos e 25  
aminoácidos de comprimento. As proteínas e peptídeos podem  
ser compostos por aminoácidos dispostos linearmente por  
ligações peptídicas, quer sejam produzidos biologicamente,  
recombinantemente, ou sinteticamente e se compostos de  
15 aminoácidos de ocorrência natural ou de ocorrência não  
natural, estão incluídos dentro desta definição. Ambas as  
proteínas de comprimento completo e seus fragmentos maiores  
do que 25 aminoácidos estão englobados pela definição de  
proteína. Os termos também incluem os polipeptídeos que têm  
20 modificações co-translacionais (por exemplo, clivagem do  
peptídeo de sinal) e as pós-translacionais do polipeptídeo,  
tais como, por exemplo, a formação de ligação de  
dissulfeto, glicosilação, acetilação, fosforilação,  
lipidação, clivagem proteolítica (por exemplo, clivagem por

metaloproteases), e semelhantes. Além disso, como aqui usado, um "polipeptídeo" refere-se a uma proteína que inclui modificações, tais como deleções, adições e substituições (geralmente de natureza conservativa como  
5 seria conhecido do versado na arte), para a sequência nativa, desde que a proteína mantenha a atividade desejada. Estas modificações podem ser deliberadas, como através de mutagênese sítio-dirigida, ou podem ser acidentais, tal como através de mutações dos hospedeiros que produzem as  
10 proteínas, ou erros devido à amplificação PCR ou outros métodos de DNA recombinante.

O termo "sequência de sinal" significa uma sequência de ácido nucléico que, quando ligado operativamente a uma molécula de ácido nucléico, facilita a secreção do produto  
15 (por exemplo, proteína ou peptídeo) codificado pela molécula de ácido nucléico. Em algumas formas de realização, a sequência de sinal está, preferivelmente, localizada a 5' para a molécula de ácido nucléico.

Como usado aqui, o termo "N-glicosilada" ou "N-glicosilação" refere-se à fixação covalente de uma porção  
20 de açúcar a resíduos de asparagina em um polipeptídeo. Porções de açúcar podem incluir, mas não estão limitados a glicose, manose e N-acetilglucosamina. Modificações dos glicanos são também incluídas, por exemplo, sialização.

Uma "célula apresentando antígenos" ou "APC" é uma célula que expressa as moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e podem apresentar antígeno estranho complexado com MHC sobre sua superfície.

5 Exemplos de células apresentando antígeno são células dendríticas, macrófagos, células B, fibroblastos (pele), células epiteliais do timo, células epiteliais da tiróide, células da glia (cérebro), células beta pancreáticas e células endoteliais vasculares.

10 O termo "porção funcional" ou "fragmento funcional", tal como usado no contexto de uma "porção funcional de um antígeno" refere-se a uma porção do antígeno ou polipeptídeo de antígeno que media o mesmo efeito que a porção do antígeno completo, por exemplo, elícita uma  
15 resposta imune em um indivíduo, ou media uma associação com outra molécula, por exemplo, compreende, pelo menos, um epítopo.

Uma "porção" de um antígeno alvo, como o termo é aqui usado, será de, pelo menos, três aminoácidos de  
20 comprimento, e pode ser, por exemplo, pelo menos 6, pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20 ou, pelo menos, 25 aminoácidos ou mais, inclusive.

Os termos "linfócito T citotóxico" ou "CTL" refere-se

a linfócitos que induzem a apoptose em células alvo-marcadas. CTLs formam conjugados antígeno-específicos com células-alvo através de interação de TCRs com antígeno processado (Ag) nas superfícies da célula-alvo, resultando em apoptose da célula alvo-marcada. Corpos apoptóticos são eliminados por macrófagos. O termo "resposta de CTL" é usado para referir-se a resposta imune primária mediada por células CTL.

O termo "imunidade mediada por células" ou "CMI", como aqui usado refere-se a uma resposta imune que não envolve anticorpos ou complemento mas envolve a ativação de, por exemplo, macrófagos, células assassinas naturais (NK), linfócitos T citotóxicos específicos de antígenos (células T), e a liberação de várias citocinas em resposta a um antígeno alvo. Dito de outra maneira, CMI refere-se a células imunes (tal como as células T e outros linfócitos) que se ligam à superfície de outras células que exibem um antígeno alvo (tais como células apresentando antígenos (APC)) e disparam uma resposta. A resposta pode envolver outros linfócitos e/ou qualquer uma das outras células brancas do sangue (leucócitos) e a liberação de citocinas. A imunidade celular protege o corpo por: (i) ativação de linfócitos T citotóxicos específicos de antígeno (CTLs) que são capazes de destruir as células do corpo exibindo

epítomos de antígeno estranho na sua superfície, tais como as células infectadas com vírus e células com bactérias intracelulares, (2) ativação de macrófagos e células NK, permitindo às mesmas destruir patógenos intracelulares, e  
5 (3) estimular as células para secretar uma variedade de citocinas, que influenciam a função de outras células envolvidos nas respostas imunes adaptativas e respostas imunes inatas.

O termo "célula imune" como aqui usado refere-se a  
10 qualquer célula que pode liberar uma citocina em resposta a um estímulo antigênico direto ou indireto. Incluídos no termo "células imunes" aqui, estão os linfócitos, incluindo células exterminadoras naturais (NK), células T (CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup>), células B, macrófagos e monócitos, células Th;  
15 células Th1; células Th2; leucócitos; células dendríticas, macrófagos; células-tronco e monócitos e qualquer outra célula que é capaz de produzir uma molécula de citocina, em resposta a estimulação por antígeno direta ou indireta. Tipicamente, uma célula imune é um linfócito, por exemplo,  
20 um linfócito de célula T.

O termo "citocina", como aqui usado refere-se a uma molécula liberada a partir de uma célula imune em resposta à estimulação com um antígeno. Exemplos destas citocinas incluem, mas não estão limitados a: GM-CSF; IL-1 $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ;

IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-10; IL-12; IL-17A, IL-17F ou outros membros da família IL-17, IL-22, IL-23, IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IFN- $\gamma$ ; MIP-1 $\alpha$ ; MIP-1 $\beta$ ; TGF $\beta$ ; TNF $\alpha$  ou TNF $\beta$ . O termo "citocina" não inclui anticorpos.

5           O termo "indivíduo" como aqui usado refere-se a qualquer animal em que ele é útil para elicitar uma resposta imune. O indivíduo pode ser um animal selvagem, doméstico, comercial ou de companhia, como um pássaro ou mamífero. O indivíduo pode ser um humano. Embora em uma  
10       forma de realização da invenção seja contemplado que as composições imunogênicas, como aqui descrito, também podem ser adequadas para o tratamento terapêutico ou profilático em humanos, mas também é aplicável a vertebrados de sangue quente, por exemplo, mamíferos, tais como primatas não-  
15       humanos (particularmente os primatas superiores), carneiros, cão, roedor (por exemplo, camundongos ou ratos), porquinho-da-índia, cabra, porco, gato, coelho, vaca, e os não mamíferos, como galinhas, patos ou perus. Em outra  
20       forma de realização, o indivíduo é um animal selvagem, por exemplo, um pássaro, tais como para o diagnóstico da gripe aviária. Em algumas formas de realização, o indivíduo é um animal ou animal experimental ou substituto de animal como um modelo de doença. O indivíduo pode ser um indivíduo em necessidade de tratamento veterinário, onde elicitar uma

resposta imune a um antígeno é útil para prevenir uma  
doença e/ou para controlar a propagação de uma doença, por  
exemplo, SIV, STL1, SFV, ou no caso de gado, febre aftosa,  
ou no caso das aves, a doença de Marek ou gripe aviária, e  
5 outras tais doenças.

Como usado aqui, o termo "patógeno" refere-se a um  
organismo ou molécula que causa uma doença ou distúrbio em  
um indivíduo. Por exemplo, patógenos incluem, mas não estão  
limitados a vírus, fungos, bactérias, parasitas e outros  
10 organismos infecciosos ou moléculas dos mesmos, bem como  
por organismos macroscópicos taxonomicamente relacionados  
dentro das categorias de algas, fungos, leveduras,  
protozoários, ou similares.

Uma "célula de câncer" refere-se a uma célula pré-  
15 cancerosa, ou cancerosa ou transformada, quer *in vivo*, ex  
vivo, ou em cultura de tecidos, que tem mudanças  
fenotípicas espontâneas ou induzidas que não envolvem  
necessariamente a absorção de novo material genético.  
Embora a transformação possa surgir a partir de infecção  
20 com um vírus transformante e incorporação de novo ácido  
nucléico genômico, ou a absorção de ácido nucléico exógeno,  
ela também pode surgir espontaneamente ou após exposição a  
um carcinogênio, mutando desse modo um gene endógeno.  
Transformação/câncer está associado com, por exemplo,

alterações morfológicas, imortalização de células, controle do crescimento aberrante, formação de focos, independência de ancoragem, malignidade, perda de inibição de contato e limitação da densidade de crescimento, fator de crescimento ou independência de soro, marcadores específicos de tumor, invasividade ou metástase, e crescimento de tumor em hospedeiros animais apropriados, tais como camundongos nus. Ver, por exemplo, Freshney, CULTURE ANIMAL CELLS: MANUAL BASIC TECH. (3ª. ed., 1994).

O termo "tipo selvagem" refere-se à sequência de polinucleotídeos de ocorrência natural, normal, codificando uma proteína, ou uma porção da mesma, ou sequência de proteína, ou uma sua porção, respectivamente, tal como tipicamente existe *in vivo*.

O termo "mutante" refere-se a um organismo ou célula com qualquer mudança no seu material genético, em particular, uma mudança (isto é, deleção, substituição, adição ou alteração) em relação a uma sequência de polinucleotídeos de tipo selvagem ou qualquer mudança relativa a uma sequência de proteínas de tipo selvagem. O termo "variante" pode ser usado alternadamente com "mutante". Embora seja geralmente assumido que uma mudança no material genético resulta em uma mudança da função da proteína, os termos "mutante" e "variante" referem-se a



uma mudança na sequência de uma proteína de tipo selvagem, independentemente de se a mudança altera a função da proteína (por exemplo, aumenta, diminui, confere uma nova função), ou se a mudança não tem nenhum efeito sobre a  
5 função da proteína (por exemplo, mutação ou variação é silenciosa).

O termo "farmaceuticamente aceitável" refere-se a compostos e composições que podem ser administradas a mamíferos sem toxicidade indevida. O termo "veículos  
10 farmaceuticamente aceitáveis" exclui meio de cultura de tecido. Exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a sais de ácidos minerais tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos, e outros, e os sais de ácidos orgânicos tais como acetatos,  
15 propionatos, malonatos, benzoatos, e outros. Os veículos farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos na arte.

Será apreciado que as proteínas ou polipeptídeos muitas vezes contêm aminoácidos diferentes dos 20 aminoácidos tipicamente referidos como os 20 aminoácidos de  
20 ocorrência natural e que muitos aminoácidos, incluindo os aminoácidos terminais, podem ser modificados em um determinado polipeptídeo, por processos naturais, tais como a glicosilação e outras modificações pós-tradução, ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas na

arte. Modificações conhecidas que podem estar presentes em polipeptídeos da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, fixação covalente de flavina, fixação covalente de uma porção heme, fixação covalente de um polinucleotídeo ou derivado de polinucleotídeo, fixação covalente de um lipídio ou derivado de lipídio, fixação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligações dissulfeto, desmetilação, formação de reticulações covalentes, formação de cistina, formação de piroglutamato, formulação, gama- carboxilação, glicação, glicosilação, formação de âncora GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristoilação, oxidação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, transferência - adição mediada de RNA de aminoácidos para proteínas, como arginilação, e ubiquitinação.

Como usado aqui, os termos "homólogos" ou "homólogas" são usados alternadamente, e, quando usados para descrever um polinucleotídeo ou polipeptídeo, indicam que dois polinucleotídeos ou polipeptídeos, ou sequências designadas dos mesmos, quando otimamente alinhadas e comparadas, por exemplo, usando os programas BLAST, versão 2.2.14 com parâmetros de *default* para o alinhamento são idênticos, com

inserções ou deleções de nucleotídeos ou inserções ou deleções de aminoácidos apropriadas, em pelo menos 70% dos nucleotídeos, geralmente de cerca de 75% a 99%, como pelo menos 98 a 99% dos nucleotídeos. Para um polipeptídeo, deve  
5 haver pelo menos 50% de identidade de aminoácidos no polipeptídeo. O termo "homólogo" ou "homóloga", como aqui usado refere-se também a homologia com respeito à estrutura. Determinação de homólogos de genes ou polipeptídeos pode ser facilmente determinada pelo versado  
10 na arte. Quando no contexto com um percentual definido, a percentagem de homologia definida significa, pelo menos, a percentagem de similaridade de aminoácidos. Por exemplo, 85% de homologia refere-se a pelo menos 85% de similaridade de aminoácidos.

15 Como usado aqui, o termo "heterólogo" com referência a sequências de ácidos nucleicos, proteínas ou polipeptídeos significa que estas moléculas não são de ocorrência natural nesta célula. Por exemplo, a sequência de ácido nucleico codificando para um polipeptídeo de antígeno de fusão aqui  
20 descrito que está inserido em uma célula, por exemplo, no contexto de um vetor de expressão de proteína, é uma sequência de ácido nucleico heteróloga.

Para comparação de sequências, tipicamente uma sequência atua como sequência de referência, para a qual as

sequências de teste são comparadas. Quando usando um algoritmo de comparação de sequências, sequências de teste e de referência são introduzidas em um computador, coordenadas de subsequência são designadas, se necessário, e os parâmetros do programa do algoritmo de sequência são projetados. O algoritmo de comparação de sequências calcula então a percentagem de identidade de sequência para a(s) sequência(s) de teste relativa(s) à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa projetados. Quando necessário ou desejado, um alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser conduzido por qualquer variedade de abordagens, uma vez que são bem conhecidos na arte.

O termo "variante" como aqui usado pode referir-se a um polipeptídeo ou ácido nucléico que difere do polipeptídeo ou ácido nucléico de ocorrência natural por uma ou mais deleções, adições, substituições ou modificações da cadeia lateral de aminoácidos ou ácidos nucléicos, ainda retendo uma ou mais funções ou atividades biológicas específicas da molécula ocorrendo naturalmente. As substituições de aminoácidos incluem alterações em que um aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido diferente de ocorrência natural ou um não convencional. Tais substituições podem ser classificadas como

"conservativas", caso em que um resíduo de aminoácido contido em um polipeptídeo é substituído por outro aminoácido de ocorrência natural de caráter semelhante quer em relação à polaridade, funcionalidade da cadeia lateral ou tamanho. Substituições englobados pelas variantes, como aqui descrito, podem também ser "não conservativas", em que um resíduo de aminoácido que está presente em um peptídeo é substituído com um aminoácido tendo propriedades diferentes (por exemplo, substituindo um aminoácido carregado ou hidrofóbico com alanina) ou, alternativamente, em que um aminoácido de ocorrência natural é substituído por um aminoácido não convencional. Também englobados dentro do termo "variante" quando usado com referência a um polinucleotídeo ou polipeptídeo, são variações na estrutura primária, secundária ou terciária, em comparação a um polinucleotídeo ou polipeptídeo de referência, respectivamente (por exemplo, em comparação com um polinucleotídeo ou polipeptídeo de tipo selvagem).

O termo "substancialmente similar", quando usado em referência a uma variante de um antígeno ou de um derivado funcional de um antígeno em comparação com o antígeno original significa que uma sequência do indivíduo particular varia da sequência de polipeptídeo de antígeno por uma ou mais substituições, deleções ou adições, mas

retêm pelo menos 50%, ou mais, por exemplo, pelo menos 60%, 70%, 80%, 90% ou mais, inclusive, da função do antígeno para elicitar uma resposta imune em um indivíduo. Para determinar as sequências de polinucleotídeos, todas as

5 sequências de polinucleotídeos do indivíduo capazes de codificar as sequências de aminoácidos substancialmente similares são consideradas como sendo substancialmente similares a uma sequência de polinucleotídeos de referência, não obstante as diferenças na sequência de

10 códon. Uma sequência de nucleotídeos é "substancialmente similar" a uma determinada sequência de ácido nucléico do antígeno se: (a) a sequência de nucleotídeos hibrida com as regiões de codificação da sequência do antígeno nativo, ou (b) a sequência de nucleotídeos é capaz de hibridação com a

15 sequência de nucleotídeos do antígeno nativo sob condições moderadamente estridentes e tem uma atividade biológica similar à da proteína do antígeno nativo, ou (c) as sequências de nucleotídeos que são degeneradas como resultado do código genético relativamente às sequências de

20 nucleotídeos definidas em (a) ou (b). Proteínas substancialmente similares serão tipicamente maiores do que cerca de 80% similares à sequência correspondente da proteína nativa.

As variantes podem incluir mudanças de aminoácidos

conservativas ou não conservativas, tal como descrito abaixo. As mudanças polinucleotídicas podem resultar em substituições, adições, deleções, fusões e truncagens de aminoácido, no polipeptídeo codificado pela sequência de referência. As variantes também podem incluir inserções, deleções ou substituições de aminoácidos, incluindo inserções e substituições de aminoácidos e outras moléculas) que tipicamente não ocorrem na sequência de peptídeos que é a base da variante, por exemplo, mas não se limitando a inserção de ornitina que não ocorre tipicamente em proteínas humanas. "Substituições de aminoácidos conservativas" resultam da substituição de um aminoácido por outro que tem propriedades estruturais e/ou químicas semelhantes. Tabelas de substituição conservativa que fornecem aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na arte. Por exemplo, um dos seis grupos seguintes contém cada um aminoácidos que são substituições conservativas entre si: (1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T), (2) Ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), (3) Asparagina (N), Glutamina (Q), (4) Arginina (R), Lisina (K), (5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V) e (6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W). Ver, por exemplo, Creighton, PROTEINS (W.H. Freeman & Co., 1984).

A escolha de aminoácidos conservativos pode ser selecionada com base na localização do aminoácido a ser substituído no peptídeo, por exemplo, se o aminoácido está no exterior do peptídeo e exposto a solventes, ou sobre o interior e não exposto a solventes. Seleção de tais substituições conservativas de aminoácidos está dentro da perícia de um versado na arte. Portanto, pode-se selecionar as substituições de aminoácidos conservativas apropriadas para aminoácidos no exterior de uma proteína ou peptídeo (isto é, os aminoácidos expostos a um solvente). Estas substituições incluem, mas não estão limitadas às seguintes: a substituição de Y com F, T com S ou K, P com A, E com D ou Q, N com D ou G, R com K, G com N ou A, T com S ou K, D com N ou E, I com L ou V, F com Y, S com T ou A, R com K, G com N ou A, K com R, A com S, K ou P.

Em alternativa, é também possível selecionar as substituições de aminoácidos conservativas apropriadas para aminoácidos no interior de uma proteína ou peptídeo (isto é, os aminoácidos não são expostos a um solvente). Por exemplo, pode-se usar as seguintes substituições conservativas: em que Y é substituído com F, T com A ou S, I com L ou V, W com Y, M com L, N com D, G com A, T com A ou S, D com N, I com L ou V, F com Y ou L, S com A ou T e A com S, G, T ou V. Em algumas formas de realização, os



polipeptídeos LF incluindo substituições de aminoácidos não conservativas estão também englobados dentro do termo "variantes". Como aqui usado, o termo substituição "não conservativa" refere-se a substituição de um resíduo de aminoácido por um resíduo de aminoácido diferente que tenha propriedades químicas diferentes. Exemplos não limitativos de substituições não conservativas incluem ácido aspártico (D), sendo substituído por glicina (G); asparagina (N), sendo substituída por lisina (K) e alanina (A) sendo substituída por arginina (R).

O termo "derivado", como aqui usado refere-se a proteínas ou peptídeos que foram quimicamente modificados, por exemplo, por ubiquitinação, rotulação, peguilação (derivatização com polietileno glicol) ou a adição de outras moléculas. Uma molécula é também um "derivado" de outra molécula quando contém porções químicas adicionais que não fazem parte tipicamente da molécula. Tais porções podem melhorar a solubilidade da molécula, absorção, semi-vida biológica, etc As porções podem alternativamente diminuir a toxicidade da molécula, ou eliminar ou atenuar um efeito lateral indesejável da molécula, etc As porções capazes de mediar tais efeitos são descritas em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (21<sup>a</sup>. ed., Tory, ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006).

O termo "funcional" quando usado em conjunto com "derivado" ou "variante" refere-se a uma molécula de proteína que possui uma atividade biológica que é substancialmente similar a uma atividade biológica da molécula ou entidade que é um derivado ou variante.

"Substancialmente similar", neste contexto, significa que a atividade biológica, por exemplo, a antigenicidade de um polipeptídeo, é pelo menos 50% tão ativa como uma referência, por exemplo, um polipeptídeo de tipo selvagem correspondente, por exemplo, pelo menos 60% tão ativo, 70% tão ativo, 80% tão ativo, 90% tão ativo, 95% tão ativo, como 100% ativo, ou mesmo superior (isto é, a variante ou derivado tem uma maior atividade do que o tipo selvagem), por exemplo, 110% ativo, 120% ativo, ou mais, inclusive.

O termo "recombinante" quando usado para descrever uma molécula de ácido nucléico, significa um polinucleotídeo de origem genômica, cDNA, viral, semi-sintético, e/ou sintético, o qual, em virtude da sua origem ou manipulação, não está associado com toda ou uma porção das sequências de polinucleotídeos com os quais está associado na natureza. O termo recombinante como usado em relação a um peptídeo, polipeptídeo, proteína, ou proteína de fusão recombinante, significa um polipeptídeo produzido por expressão de um polinucleotídeo recombinante. O termo recombinante como

usado com relação a uma célula hospedeira significa uma célula hospedeira em que um polinucleotídeo recombinante foi introduzido. Recombinante também é aqui usado para referir-se, com referência ao material (por exemplo, uma  
5 célula, um ácido nucléico, uma proteína, ou um vetor) que o material foi modificado pela introdução de um material heterólogo (por exemplo, uma célula, um ácido nucléico, uma proteína, ou um vetor).

O termo "vetores" refere-se a uma molécula de ácido  
10 nucléico capaz de transportar ou de mediar a expressão de um ácido nucléico heterólogo, ao qual ele foi ligado a uma célula hospedeira, um plasmídeo é uma espécie do gênero englobado pelo termo "vetor". O termo "vetor" refere-se tipicamente a uma sequência de ácido nucléico contendo uma  
15 origem de replicação e outras entidades necessárias para replicação e/ou manutenção de uma célula hospedeira. Os vetores capazes de dirigir a expressão de genes e/ou sequência de ácido nucléico ao qual estão ligados operacionalmente, são aqui referidos como "vetores de  
20 expressão". Em geral, os vetores de expressão de utilidade estão muitas vezes sob a forma de "plasmídeos", que se referem a moléculas de DNA de filamento dupla circular que, em sua forma de vetor não estão ligados ao cromossomo e, tipicamente, compreendem entidades para a expressão estável

ou transiente ou o DNA codificado. Outros vetores de expressão que podem ser usados nos métodos, como aqui descritos, incluem, mas não estão limitados a plasmídeos, epissomas, cromossomas artificiais bacterianos, cromossomas artificiais de levedura, bacteriófagos ou vetores virais, e tais vetores podem integrar no genoma do hospedeiro ou replicar de forma autônoma na célula particular. Um vetor pode ser um vetor DNA ou RNA. Outras formas de vetores de expressão conhecidos pelos versados na arte, que servem a funções equivalentes também podem ser usadas, por exemplo, vetores extracromossômicos auto-replicantes ou vetores que se integram em um genoma hospedeiro. Os vetores preferidos são aqueles capazes de replicação e/ou expressão autônoma de ácidos nucléicos aos quais estão ligados.

O termo "reduzido" ou "reduzir" ou "diminuição", como aqui usado significa, geralmente, uma redução de uma quantidade estatisticamente significativa em relação a uma referência. Para evitar dúvidas, "reduzido" significa diminuição estatisticamente significativa de pelo menos 10%, em comparação com um nível de referência, por exemplo, uma diminuição de pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos, 50%, ou pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, ou pelo menos 80%, pelo menos 90% ou mais, até e incluindo uma diminuição de 100% (isto é, nível ausente, em

comparação com uma amostra de referência), ou qualquer diminuição entre 10-100%, em comparação com um nível de referência, tal como o termo é aqui definido.

O termo "baixo", como aqui usado, significa geralmente inferior por uma quantidade estatisticamente significativa, para evitar dúvidas, "baixo" significa um valor estatisticamente significativo de pelo menos 10% mais baixo do que um nível de referência, por exemplo, um valor de, pelo menos 20% menor do que um nível de referência, pelo menos, 30% mais baixo do que um nível de referência, pelo menos, 40% mais baixo do que um nível de referência, pelo menos, 50% mais baixo do que um nível de referência, pelo menos, 60% mais baixo do que um nível de referência, pelo menos 70% mais baixo do que um nível de referência, pelo menos, 80% mais baixo do que um nível de referência, pelo menos, 90% mais baixo do que um nível de referência, até e incluindo 100% mais baixo do que um nível de referência (isto é, nível ausente, em comparação com uma amostra de referência).

Os termos "aumentado" ou "aumentar", como aqui usado, significa geralmente um aumento por uma quantidade estatisticamente significativa, tal como um aumento estatisticamente significativo de pelo menos 10%, em comparação com um nível de referência, incluindo um aumento

de pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos, 100% ou mais, inclusive, incluindo, por exemplo, pelo menos, 2 vezes, pelo menos, 3  
5 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, aumento de pelo menos 10 vezes ou mais, em comparação com um nível de referência, tal como o termo é aqui definido.

O termo "elevado", como aqui usado significa, geralmente, um mais elevado por uma quantidade  
10 estatisticamente significativa em relação a uma referência, tal como um valor estatisticamente significativo em pelo menos 10% maior do que um nível de referência, por exemplo, pelo menos 20% maior, em pelo menos 30% maior, pelo menos 40% maior, pelo menos 50% maior, pelo menos 60% maior, pelo  
15 menos 70% maior, pelo menos 80% maior, pelo menos 90% maior, pelo menos 100% maior, inclusive, tal como, pelo menos, 2 vezes maior, pelo menos, 3 vezes maior, pelo menos 4 vezes maior, pelo menos, 5 vezes maior, pelo menos, 10 vezes maior ou mais, em comparação com um nível de  
20 referência.

Como usado aqui, o termo "compreendendo" significa que outros elementos podem também estar presentes, além dos elementos definidos apresentados. O uso de "compreendendo" indica inclusão em vez de limitação.

O termo "consistindo de" refere-se a composições, métodos, e respectivos componentes dos mesmos, como aqui descritos, que são exclusivos de qualquer elemento não recitado nesta descrição da forma de realização.

5        Como aqui usado, o termo "consistindo essencialmente de" refere-se aos elementos necessários para uma dada forma de realização. O termo permite a presença de elementos que não afetam materialmente a(s) característica(s) básica(s) e nova(s) ou funcional(ais) da forma de realização da  
10        invenção.

Deve ser ainda compreendido que todos os tamanhos de bases ou tamanhos de aminoácidos e todos os pesos moleculares ou valores de massas moleculares, dados para ácidos nucleicos ou polipeptídeos são aproximados, e são  
15        dados para a descrição. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes aos aqui descritos possam ser usados na prática ou testes da presente descrição, os métodos e materiais apropriados são aqui descritos.

20        Como aqui usado, o termo "biotina" refere-se ao próprio compostos de biotina e análogos, derivados e variantes da mesma. Assim, o termo "biotina" inclui biotina (ácido cis-hexa-hidro-2-oxo-1H-tieno [3,4] imidazol-4-pentanóico) e qualquer um de seus derivados e análogos, incluindo compostos de tipo biotina. Tais compostos

incluem, por exemplo, biotina-e-N-lisina, biocitina hidrazida, derivados amino ou sulfidríla de 2-iminobiotina e N-hidroxissuccinimida éster de ácido biotinil-E-aminocapróico, sulfossuccinimidaiminobiotina, biotinbromoacetilhidrazida, p-diazobenzoil biocitina, 3 - (N -maleimidopropionil) biocitina, destiobiotina, e semelhantes. O termo "biotina" também compreende as variantes de biotina que podem ligar especificamente a um ou mais de uma porção de rhizavidina, avidina, estreptavidina, tamavidina, ou outros peptídeos como avidina.

Embora a invenção acima tenha sido descrita em alguns detalhes por meio de ilustração e exemplo para fins de clareza de entendimento, será prontamente evidente para um versado na arte à luz dos ensinamentos desta invenção que certas alterações e modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito ou escopo das reivindicações anexas. O seguinte pretende ser ilustrativo da presente invenção, no entanto, a prática da invenção não é limitada ou restringida de qualquer modo pelos exemplos.

#### EXEMPLOS

Exemplo 1: Expressando proteína de ligação à biotina recombinante solúvel de alto rendimento e proteína de fusão da mesma em *E. coli*



Rhizavidina recombinante (rRhavi) usada nestes estudos é uma versão modificada N-terminal que contém apenas os resíduos 45 a 179 da proteína de tipo selvagem. Para otimizar o nível de expressão de rRhavi em *E. coli*, a  
5 sequência do gene que codifica os polipeptídeos Rhizavidina (45-179) foi re-desenhada usando códons de expressão preferidos para *E. coli*, então sintetizados e clonados no vetor pET21b. Para facilitar a duplicação correta e obter um rendimento elevado de proteína recombinante solúvel, uma  
10 sequência de DNA codificando uma sequência de sinal de localização periplásmico de *E. coli* (19 aminoácidos, MKKIWLALAGLVLAFSASA, SEQ ID NO:2) foi introduzida na extremidade 5' do gene sintético de rRhavi. Esta sequência de sinal está prevista para ser deletada automaticamente a  
15 partir da proteína recombinante, após a sua alvo-marcação para o periplasma de *E. coli* durante o processo de expressão.

Uma sequência de DNA codificando uma região de ligação flexível e His-tag (GGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH, SEQ ID NO: 14)  
20 foi diretamente inserida na extremidade 3' do gene sintético rRhavi. Isto ajuda para a purificação da proteína de ligação à biotina recombinante. Além disso, um antígeno pode ser inserido no ligador tendo um ligador flexível em ambos os lados, por exemplo, o antígeno pode ser inserido

entre os aminoácidos S e V do ligador. Como tal, o antígeno é separado da proteína de ligação à biotina pelo ligador de peptídeo (GGGGSSS, SEQ ID NO: 22) e etiqueta His pelo ligador de peptídeo (VDKLAAALE, SEQ ID NO: 11) este pode  
5 estabilizar a proteína de fusão.

Para construir as proteínas de fusão Rhizavidina-antígeno, uma sequência de DNA codificando uma região de ligador flexível consistindo de sete aminoácidos (GGGGSSS, SEQ ID NO: 22) pode ser inserida diretamente na extremidade  
10 3' do gene rRhavi sintético, para ajudar a estabilizar a proteína de fusão. Os genes codificando antígenos candidatos (comprimento total ou fragmentos desejado) foram amplificados a partir do DNA genômico de patógenos de interesse por procedimentos de rotina de PCR e inseridos no  
15 vetor de expressão rRhavi apenas além da região do ligador.

Para expressão da proteína, os plasmídeos contendo construtos alvos foram transformados na cepa de *E. coli* BL21 (DE3) usando o procedimento de choque de calor normal. Uma única colônia foi escolhida recentemente a partir da  
20 placa (ou um carga de glicerol foi usada depois) e inoculada em 30 ml de meio de Luria-Bertani (LB) contendo ampicilina (Amp+) para uma cultura noturna a 37°C. No dia 2, 5 ml de cultura de partida foram inoculados em 1 litro de meio LB/Amp+ e cultivados a 37°C até OD<sub>600</sub> = 1 ser atingido.

Depois de resfriar o meio a 16°C, 0,2 mM de concentração final de IPTG foi adicionado nas culturas para uma indução durante a noite.

As proteínas foram purificadas a partir da fração  
5 periplásmica usando um protocolo de choque osmótico  
modificado. Brevemente, as células bacterianas a partir da  
cultura de 6 litros foram coletadas e re-colocadas em  
suspensão em 120 ml de tampão contendo 30 mM Tris (pH 8,0),  
20% de sacarose e 1 mM de EDTA. Depois de se agitar em  
10 temperatura ambiente durante 20 min, as células foram re-  
sedimentadas por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min.  
O sobrenadante foi coletado como fração 1, e as células  
foram recolocadas em suspensão em 80 ml de solução  
resfriada com gelo contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, inibidor de  
15 protease e de DNase. Depois de se agitar a 4 °C durante 20  
min, a mistura foi submetida a centrifugação a 13.000 rpm  
durante 20 min e o sobrenadante foi coletado como fração 2.  
Após a adição de uma concentração final de 150 mM de NaCl,  
10 mM MgCl<sub>2</sub> e 10 mM de imidazol, o sobrenadante combinando  
20 fração 1 e fração 2 foi aplicado a uma coluna de Ni-NTA. As  
proteínas eluídas da coluna de Ni-NTA foram ainda  
purificadas por filtração em gel usando coluna Superdex 200  
ciclado em um purificador AKTA. As frações de pico  
contendo proteína alvo foram reunidas e concentradas. A

concentração de proteínas foi medida usando kit de ensaio de proteína BCA de Bio-Rad. As proteínas purificadas foram divididas em alíquotas, congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C para uso futuro.

5 O construto de proteína de ligação à biotina é mostrado esquematicamente na Figura 1, e SDS-PAGE da proteína de ligação à biotina purificada é mostrado na Figura 2.

10 O construto de proteínas de fusão compreendendo a proteína de ligação à biotina é mostrado esquematicamente na Figura 3, e SDS-PAGE exemplares das proteínas de fusão purificadas são mostrados na Figura 4.

#### **Exemplo 2: Derivado lipídado de proteínas de ligação de biotina**

15 Um derivado lipídado da proteína de ligação à biotina recombinante foi produzido usando um método semelhante ao descrito no Exemplo 1. O derivado lipídado usado neste estudo é uma versão modificada do N-terminal de rhizavidina de tipo selvagem que contém apenas os resíduos 45-179 da  
20 proteína de tipo selvagem. Para otimizar o nível de expressão de rRhavi em *E. coli*, a sequência do gene que codifica polipeptídeos de rhizavidina (45-179) foi re-desenhada usando códons de expressão preferidos de *E. coli*, depois sintetizados e clonados no Vetor pET21b. Para

facilitar a lipidação, duplicação correta e obter um elevado rendimento de proteína recombinante solúvel, uma sequência de DNA codificando a sequência de lipidação (19 aminoácidos, MKKVAAFVALSLLMAGC, SEQ ID NO: 3) foi introduzida na extremidade 5 'do gene sintético de rRhavi. A lipidação será adicionada ao resíduo Cys de sequência de lipidação por bactérias, por exemplo, *E. coli*, durante o processo de expressão.

Para expressão da proteína, o plasmídeo contendo construtos alvos foi transformado na cepa de *E. coli* BL21 (DE3) usando o procedimento de choque de calor normal. Uma única colônia foi retirada recentemente da placa (ou um carga de glicerol foi usada depois) e inoculada em 30 ml de meio de Luria-Bertani (LB) contendo ampicilina (Amp+) para uma cultura noturna a 37°C. No dia 2, uma cultura de partida de 5ml foi inoculada em 1 litro de meio LB/Amp+ e cultivada a 37°C até OD<sub>600</sub> = 1 ser atingido. Depois de resfriar o meio a 16°C, 0,2 mM de concentração final de IPTG foi adicionado para as culturas uma indução noturna.

Rhizavidina lipídada foi purificada a partir de fração de membrana de *E. coli*. Células de *E. coli* foram coletadas e re-colocadas em suspensão em tampão de lise (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0) contendo inibidores de protease, Dnase, 10 mM de Mg<sup>2+</sup> e lisozima. As células foram rompidas

por um ciclo de congelamento-descongelamento e o sobrenadante foi removido após a centrifugação a 13.000 rpm durante 45 min. Os grânulos de células foram então re-colocados em suspensão em tampão de lise contendo 0,5% sdoc, e homogeneizados por batedor com contas. Os lisados foram então aplicados por centrifugação a 13.000 rpm durante 45 min, e o sobrenadante foi coletado para a purificação por afinidade. Rhavi lipídada foi eluída com tampão de lise contendo 0,5% SDOC e 300 mM Im.

As proteínas eluídas da coluna Ni-NTA foram ainda purificadas por filtração em gel usando coluna Superdex 200 ciclada em purificador AKTA. As frações de pico contendo proteína alvo foram reunidas e concentradas. A concentração de proteínas foi medida usando kit de ensaio de proteína BCA de Bio-Rad. As proteínas purificadas foram divididas em alíquotas, congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e mantidas a 80°C para uso futuro.

Uma proteína de ligação à biotina lipídada produzida é mostrada esquematicamente na **Figura 5**, e SDS-PAGE da proteína de ligação à biotina lipídada purificada é mostrado na **Figura 6**.

### **Exemplo 3: Atividade TLR2 de proteína de ligação à biotina lipídada**

A atividade TLR2 de proteína de ligação à biotina

lipidada foi testada em células HEK TLR2. Células HEK TLR2 foram semeadas em placas de 24 cavidades a  $5 \times 10^5$  células/por cavidade em 500  $\mu$ l de volume. Proteína de ligação à biotina lipidada foi adicionada em diferentes concentrações de estimulação a 37°C durante a noite. Os sobrenadantes foram coletados no segundo dia para a medição de IL-8 por ELISA. Como um controle, as células HEK 293 foram usadas para a estimulação na mesma condição.

A atividade TLR2 de proteína de ligação à biotina lipidada foi determinada. Os resultados mostraram que proteína de ligação à biotina lipidada induziu a produção de IL-8 a partir de HEK TLR2, mas não a partir de células HEK 293 (Figura 7).

#### **Exemplo 4: Mutantes não hemolíticos de Hla e proteínas de fusão**

As sequências de DNA codificando polipeptídeo maduro Hla tipo selvagem (aminoácidos 27-319) foram clonadas a partir de genoma de *Staphylococcus aureus*. Todos os mutantes não hemolíticos de Hla foram gerados por mutagenese sítio-dirigida usando QuickChange. Para obter as proteínas de fusão de ligação de Hla-biotina, a sequência de DNA codificando Hla tipo selvagem ou Hla mutante foi inserida além da região de ligador seguida pelo gene da proteína de ligação de biotina. Todos os construtos foram

clonados em pET21b e transformados em *E. coli* para expressão, como descrito acima.

Os mutantes não hemolíticos de Hla foram produzidos. As variantes não hemolíticas exemplares de Hla estão representadas esquematicamente na **Figura 8**. SDS-PAGE das  
5 das variantes de tipo selvagem ou não hemolíticas purificadas de Hla e proteína de fusão é mostrado nas **Figuras 9 e 10**.

**Exemplo 5: Atividade hemolítica de Hla tipo selvagem,  
10 Hla mutante e proteínas de fusão**

A atividade hemolítica de Hla tipo selvagem, Hla mutante e as suas proteínas de fusão com proteína de ligação à biotina foi analisada usando células de sangue de coelho. As células vermelhas do sangue a partir de 250 µl  
15 de sangue de coelho foram granuladas, lavadas duas vezes com PBS e em seguida re-colocadas em suspensão em 10 ml de PBS. Hla de tipo selvagem, Hla mutante e proteínas de fusão foram diluídos com PBS a concentrações indicadas e, em seguida, adicionados em placas de 96 cavidades a 100 µl por  
20 cavidade. As células de sangue foram adicionadas à placa de 96 cavidades contendo Hla ou proteínas de fusão a 25 µl por cavidade e então incubadas a 37°C durante 30 min. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos e analisadas por leitor de ELISA a OD450.



Atividade hemolítica de Hla tipo selvagem, Hla mutante e suas proteínas de fusão foi avaliada. Os resultados demonstram que Hla mutante têm atividade hemolítica muito menor relativamente a Hla tipo selvagem (**Figura 11**). Além disso, as proteínas de fusão de Hla compreendendo proteína de ligação à biotina tinha uma hemolítica atividade ainda menor em relação à proteína Hla mutante não-fusão (**Figura 12**).

#### **Exemplo 6: Atividade estimulatória da proteína de fusão de Hla mutante**

As células de macrófagos C57 WT foram estimuladas com proteína de fusão Hla mutante não hemolítica. As células foram semeadas em placa de 24 cavidades a  $5 \times 10^5$  células por cavidade. Proteína de fusão de Hla mutante foi diluída com meio de crescimento e adicionada às cavidades em concentração indicada para a estimulação a 37°C durante a noite. Os sobrenadantes foram coletados no dia seguinte, depois de centrifugação a 2000 rpm durante 5 min e, em seguida, analisados para a secreção de citocinas por ELISA.

Atividade estimulatória da proteína de fusão de Hla mutante foi analisada. Os resultados mostraram que a proteína de fusão de Hla mutante (rhavi-Hla209) induziu a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-23, IL-1 $\beta$ , e IL-17 (**Figura 13**).

**Exemplo 7. Proteínas de ligação à biotina lipídada e proteínas de fusão de Hla mutante facilitam a resposta imune a outros antígenos.**

Os construtos de vacina com bae em MAPS foram obtidos a partir polissacarídeo capsular pneumocócico biotinilado sorotipo-1, antígenos de TB fusionados a rhizavidina e qualquer um dentre rhizavidina não lipídada, rhizavidina lipídada ou rhavi-Hla209. Camundongos foram imunizados com diferentes construtos de MAPS e as respostas de células T contra antígenos de TB em diferentes grupos de imunização foram analisados e comparados após 3 imunizações. Brevemente, o sangue total de diferentes grupos de camundongos foram estimulados com proteínas TB purificadas *in vitro* a 37°C durante 6 dias e a concentração de citocina no sobrenadante foi detectada por ELISA.

Os resultados mostraram que os grupos de camundongos recebendo complexo de MAPS contendo rhizavidina lipídada ou contendo rhavi-Hla209 geraram melhores respostas de Th17 (IL-17A) e célula Th1 (IFN- $\gamma$ ) aos antígenos TB (**Figura 14**). Isto indicou que rhizavidina lipídada e rhavi-Hla209 podem atuar como um co-estimulador/adjuvante na formulação da vacina de MAPS.

Entende-se que a anterior descrição detalhada e exemplos são apenas ilustrativos e não devem ser

considerados como limitações ao escopo da invenção. Várias mudanças e modificações às formas de realização descritas, que serão evidentes para os versados na arte, podem ser feitas sem sair do espírito e âmbito da presente invenção.

5 Além disso, todas as patentes e outras publicações identificadas são aqui expressamente incorporadas por referência, com o objetivo de descrever e revelar, por exemplo, as metodologias descritas nestas publicações que podem ser usadas em conexão com a presente invenção. Estas  
10 publicações são dadas somente para sua divulgação antes da data de depósito do presente pedido. Nada a este respeito deve ser interpretado como admissão de que os inventores não têm direito a antecipar esta descrição em virtude da invenção anterior, ou qualquer outro motivo. Todas as  
15 declarações sobre data ou representação quanto aos conteúdos desses documentos são baseadas em informações disponíveis para os requerentes, e não constitui qualquer admissão quanto à exatidão das datas ou ao conteúdo destes documentos.

20 Todas as patentes e outras publicações identificadas no relatório e exemplos são aqui expressamente incorporadas por referência para todos os fins. Estas publicações são apresentadas somente para sua divulgação antes da data de apresentação do presente pedido. Nada a este respeito deve

ser interpretado como uma admissão de que os inventores não têm o direito de antecipar esta divulgação em virtude da invenção anterior ou por qualquer outro motivo. Todas as declarações sobre a data ou representação quanto ao conteúdo desses documentos são baseadas em informações disponíveis para os requerentes, e não constitui qualquer admissão quanto à exatidão das datas ou conteúdos destes documentos.

Embora as formas de realização preferidas tenham sido representadas e descritas em detalhes aqui, será evidente para os especialistas na técnica relevante que várias modificações, adições, substituições, e similares, podem ser feitas sem se afastar do espírito da invenção e estas, assim, são consideradas como estando dentro do escopo da invenção tal como definida nas reivindicações que se seguem.

Além disso, em extensão ainda não indicada, deve ser entendido pelos versados na técnica que qualquer uma das várias formas de realização aqui descritas e ilustradas podem ser ainda modificadas de modo a incorporar características mostradas em qualquer uma das outras formas de realização aqui descritas.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Proteína de fusão **caracterizada** pelo fato de compreender uma proteína de ligação à biotina e uma proteína ou um peptídeo antigênicos, em que a proteína de ligação à biotina consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID NO:1, e em que a proteína de fusão não compreende os aminoácidos 1 a 44 de uma proteína de rizavidina do tipo selvagem de SEQ ID NO:4.

2. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a proteína ou o peptídeo antigênicos estão fundidos à proteína de ligação à biotina através de um ligante peptídico.

3. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o ligante peptídico consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 22.

4. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a proteína ou peptídeo antigênicos são um antígeno selecionado a partir do grupo que consiste em antígenos pneumocócicos, antígenos de tuberculose, antígenos do antraz, antígenos de HIV, antígenos da gripe sazonal ou epidêmica, antígenos da influenzae, antígenos de Pertussis, antígenos de Staphylococcus aureus, antígenos meningocócicos, antígenos Haemophilus, antígenos do HPV, antígenos de *E. Coli*, antígenos de Salmonella, antígenos de Enterobacter,

antígenos de *Acinetobacter*, antígenos de *Pseudomonas*, antígenos de *Klebsiella*, antígenos de *Citrobacter*, antígenos de *Clostridia*, antígenos de *Shigella*, antígenos de *Campylobacter*, antígenos de *Vibrio cholera*, toxóides, toxinas, ou porções de toxinas ou suas combinações.

5. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a proteína ou o peptídeo antigênicos são um antígeno, que é uma variante não hemolítica da alfa-hemolisina de *S. aureus*.

6. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que a variante não hemolítica da alfa-hemolisina de *S. Aureus* consiste na alfa-hemolisina de *S. Aureus* de tipo selvagem de SEQ ID NO: 59 compreendendo uma mutação no resíduo de aminoácido 205, 213 ou 209-211.

7. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que a variante não hemolítica da alfa-hemolisina de *S. Aureus* consiste na alfa-hemolisina de *S. Aureus* de tipo selvagem de SEQ ID NO:59 compreendendo uma das seguintes mutações:

- a. resíduo 205 W a A;
- b. resíduo 213 W a A; ou
- c. resíduos 209-211 DRD a AAA.

8. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que a proteína antigênica ou peptídeo antigênico é uma variante não-hemolítica da alfa-

hemolisina de *S. Aureus* que consiste na sequência de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25.

9. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a proteína de fusão compreende uma sequência-sinal bacteriana no N-terminal.

10. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a proteína de ligação à biotina consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 15.

11. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que a proteína de fusão consiste na sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, e SEQ ID NO: 28.

12. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que a proteína de fusão tem uma atividade hemolítica menor que um título equivalente da alfa-hemolisina de tipo selvagem (Hla).

13. Proteína de fusão, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada pelo** fato de que a alfa-hemolisina consiste em uma sequência de aminoácidos dos aminoácidos 27-319 da alfa-hemolisina de *S. aureus* do tipo selvagem de SEQ ID NO: 59.

14. Proteína alfa-hemolisina mutante (mHla)

**caracterizada pelo** fato de consistir na alfa-hemolisina de *S.aureus* do tipo selvagem de SEQ ID NO: 59 com uma mutação no resíduo de aminoácido 205, 213 ou 209-211, em que a mutante da alfa-hemolisina tem menor atividade hemolítica que um título equivalente de alfa-hemolisina de tipo selvagem (Hla).

15. Alfa-hemolisina mutante, de acordo a reivindicação 14, **caracterizada pelo** fato de que a alfa-hemolisina mutante consiste na alfa-hemolisina de *S. aureus* do tipo selvagem de SEQ ID NO: 59 com uma das seguintes mutações:

- a. Resíduo 205 W a A;
- b. Resíduo 213 W a A; ou
- c. Resíduo 209-211 DRD a AAA.

16. Alfa-hemolisina mutante, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada pelo** fato de que a alfa-hemolise mutante consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25.

17. Uso de proteína de ligação à biotina solúvel consistindo na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, ou proteína de fusão conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado pelo** fato de que ser para a preparação de um medicamento para induzir a resposta imune em um indivíduo a pelo menos uma proteína antigênica ou peptídeo antigênico conforme descrito na reivindicação 4.



18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo** fato que a resposta imune é uma resposta mediada por anticorpos ou uma resposta mediada por células B.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo** fato que a resposta imune é uma resposta mediada por células T CD4+, incluído uma resposta mediada por TH1, TH2 ou TH17 ou uma resposta mediada por células T CD8+.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 17 **caracterizado pelo** fato que resposta imune é uma resposta mediada por anticorpos ou uma resposta mediada por células B e uma resposta mediada por células T.

21. Composição imunogênica **caracterizada pelo** fato de compreender pelo menos um polissacarídeo antigênico e pelo menos um polipeptídeo antigênico e pelo menos um par de moléculas com afinidade complementar compreendendo uma primeira molécula de afinidade e uma molécula de afinidade complementar, em que:

i. a primeira molécula de afinidade está associada a, pelo menos, um polissacarídeo antigênico; e

ii. a molécula de afinidade complementar está associada com, pelo menos, um polipeptídeo antigênico para formar uma proteína de fusão, em que a molécula de afinidade complementar é uma proteína de ligação à biotina que consiste

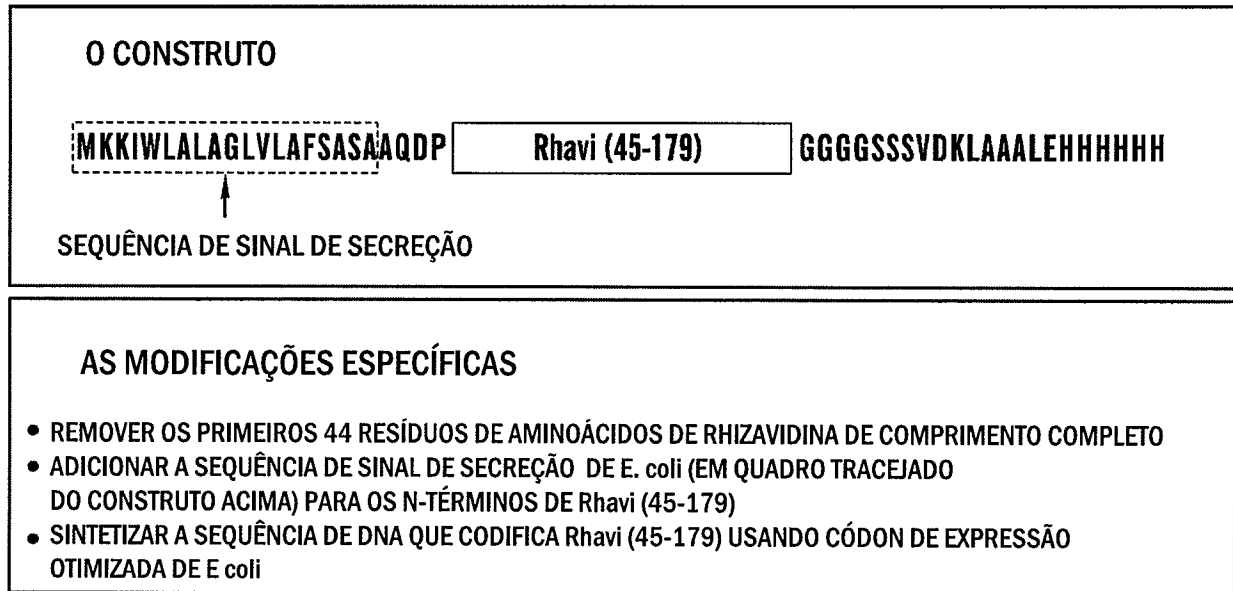
na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, e em que a proteína de fusão não compreende os aminoácidos 1 a 44 da proteína rizavidina do tipo selvagem de SEQ ID NO: 4,

em que a primeira molécula de afinidade se associa com a molécula de afinidade complementar para ligar o polipeptídeo antigênico com o polissacarídeo antigênico.

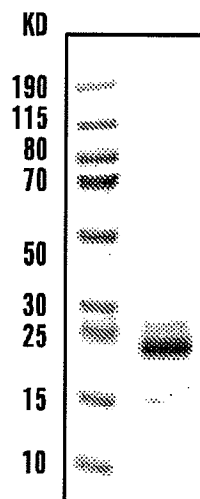
22. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizada pelo** fato que a proteína de ligação à biotina consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1.

23. Composição imunogênica, de acordo com as reivindicações 21 e 22, **caracterizada pelo** fato de que a primeira molécula de afinidade consiste em uma molécula de biotina.

24. Composição imunogênica, de acordo com as reivindicações 21 a 23, **caracterizada pelo** fato de que a primeira molécula de afinidade está associada não covalentemente à molécula de afinidade complementar para ligar o polipeptídeo antigênico e o polissacarídeo antigênico.



**FIG. 1**

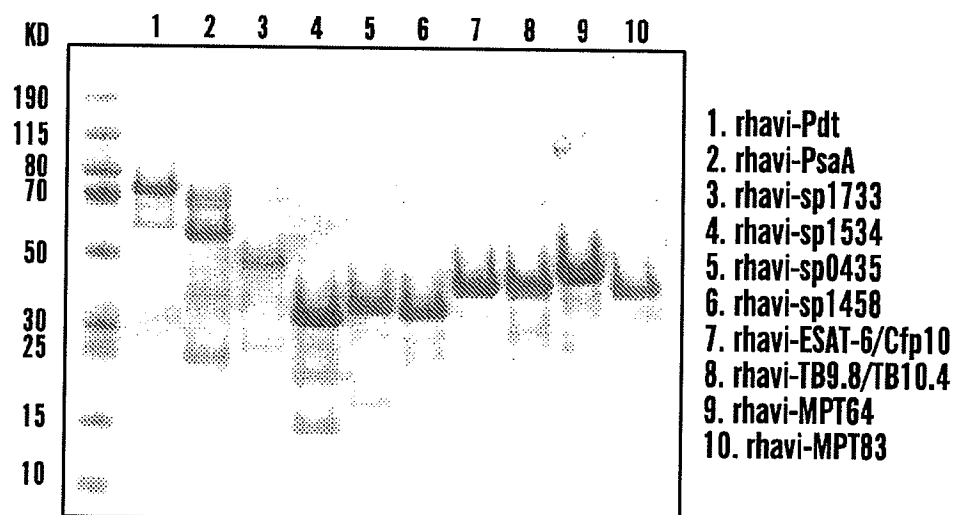


SDS-PAGE DE RHIZAVIDINA RECOMBINANTE PURIFICADA (45-179)

**FIG. 2**

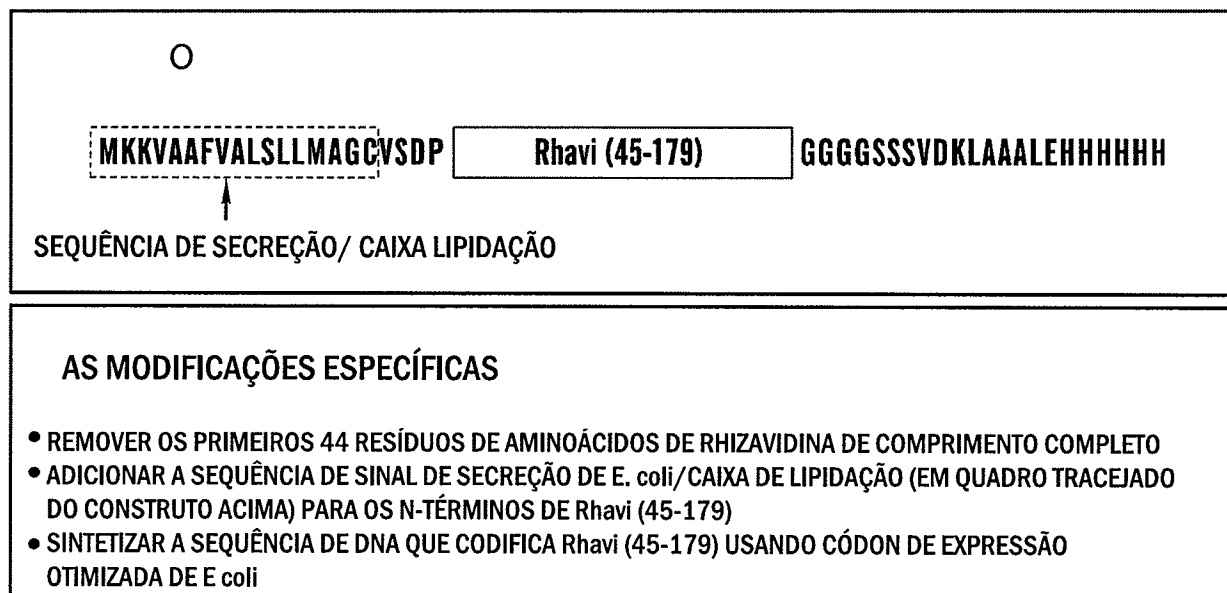
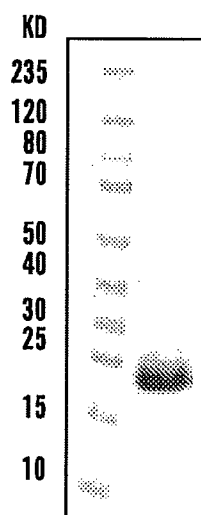
MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDP Rhavi (45-179) GGGGSSS Antígeno X LEHHHHHH

**FIG. 3**



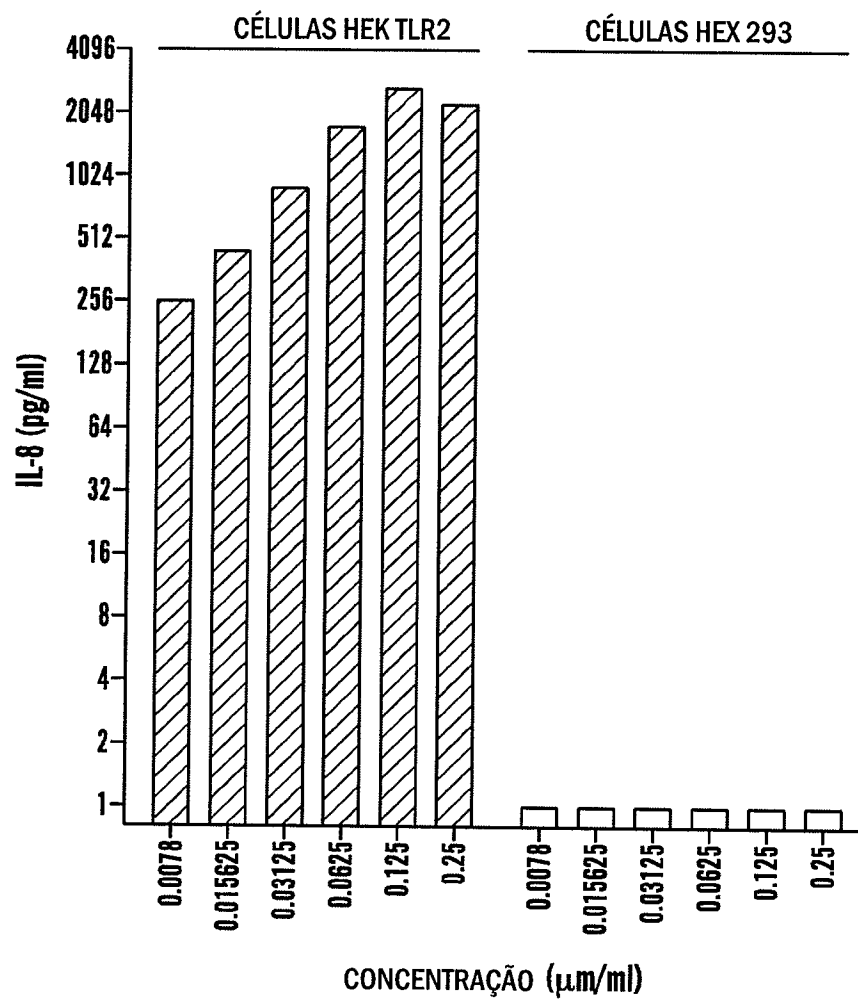
SDS-PAGE DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DE RHIZAVIDINA PURIFICADA

**FIG. 4**

**FIG. 5**

SDS-PAGE DE RHIZAVIDINA LIPIDADA PURIFICADA

**FIG. 6**



ATIVIDADE DE TLR2 DE RHIZAVIDINA LIPIDADA

**FIG. 7**

## OS CONSTRUTOS

## 1) Hla (WT/MUTANTE)

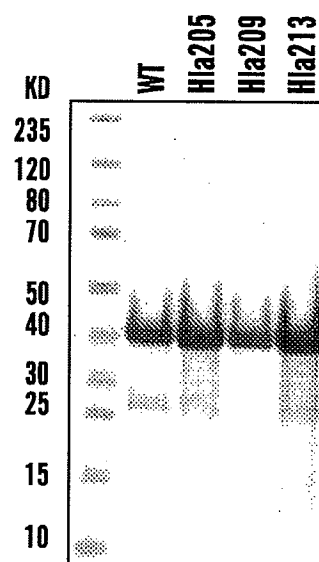
M Hla (27-319) LEHHHHHH

## 2) PROTEÍNA FUSÃO Rhizavidina-Hla (WT/MUTANTE)

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDP Rhizavidina(45-179) GGGGSSS Hla (27-319) LEHHHHHH

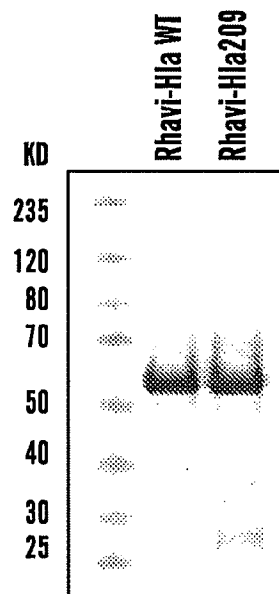
## MUTAÇÕES DE PONTOS FEITAS EM Hla

- RESÍDUO 205 W PARA A
- RESÍDUO 209-211: DRD PARA AAA
- RESÍDUO 213 W PARA A

**FIG. 8**

SDS-PAGE DE Hla WT OU MUTANTE PURIFICADO

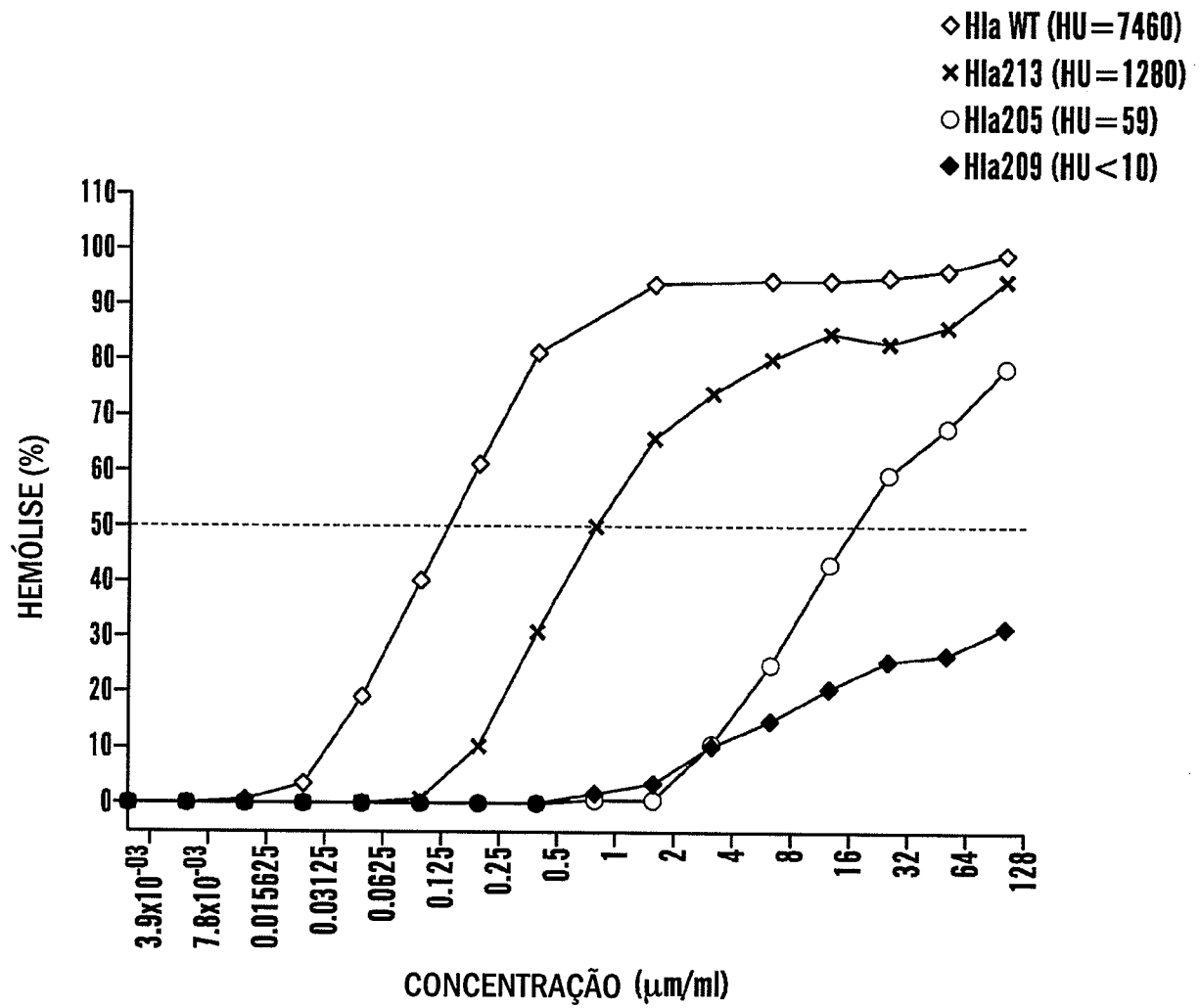
**FIG. 9**



SDS-PAGE DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DE RHIZAVIDINA  
PURIFICADAS DE Hla WT OU MUTANTE

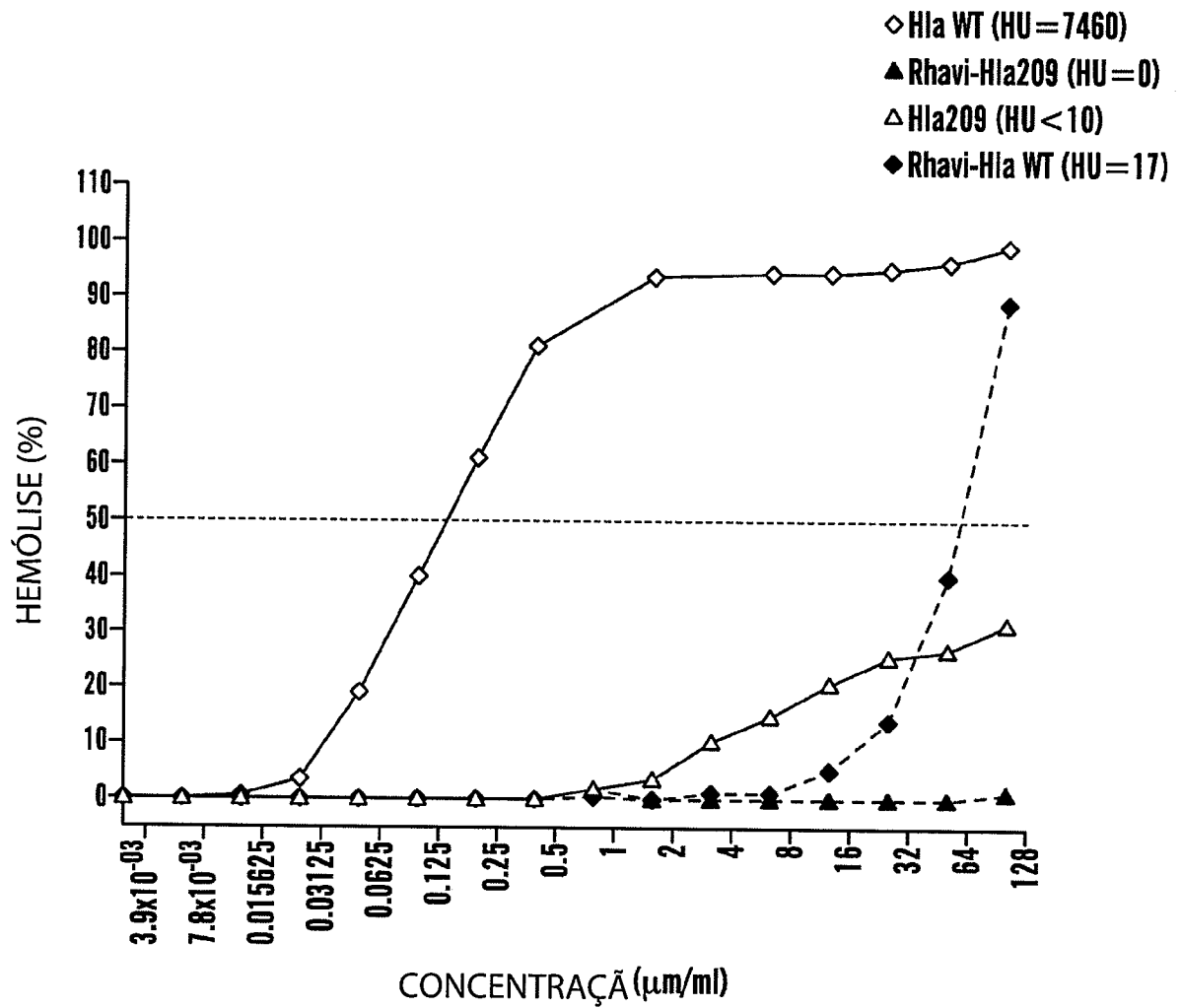
***FIG. 10***





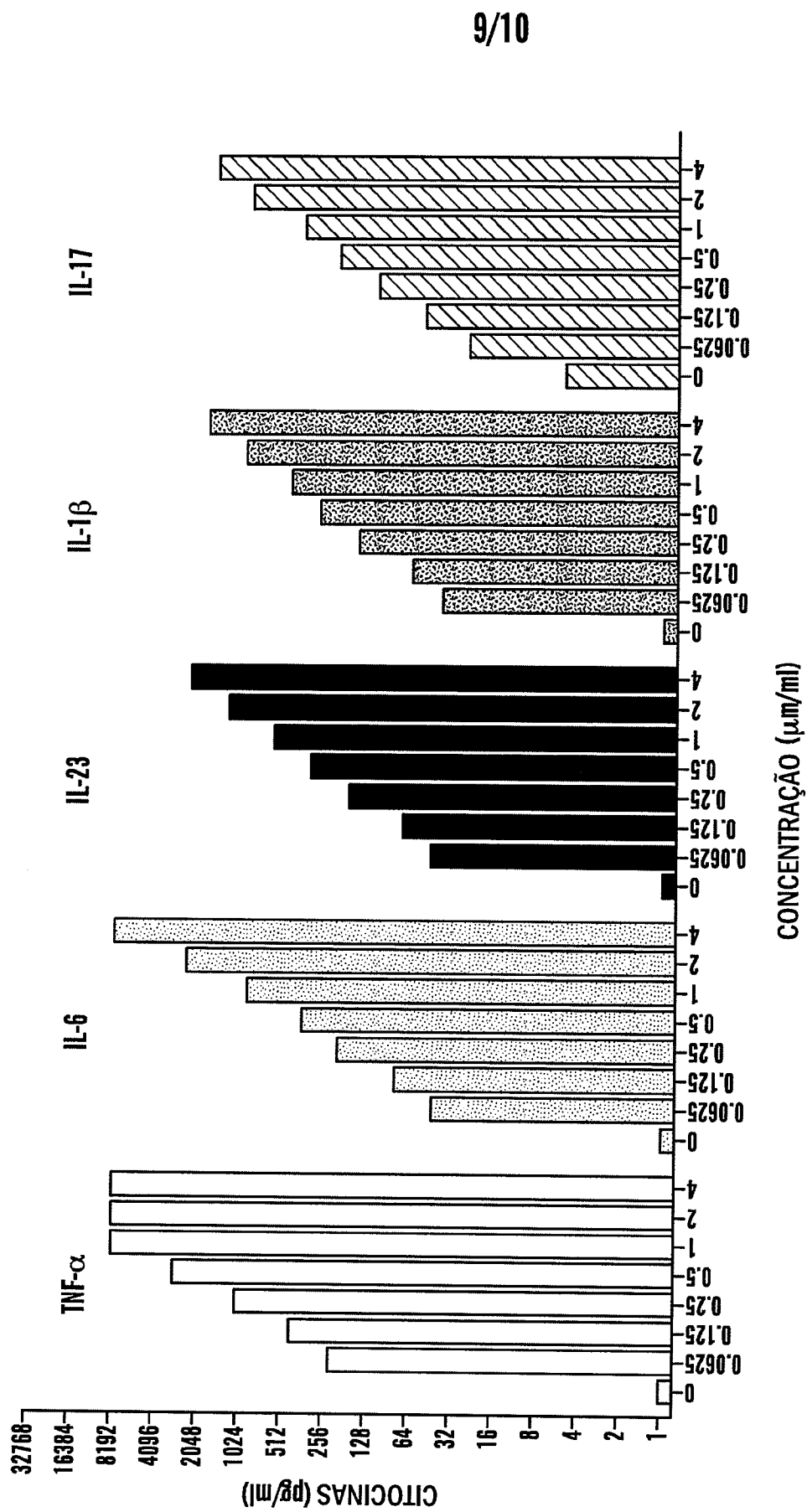
ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE Hla WT OU MUTANTE

**FIG. 11**



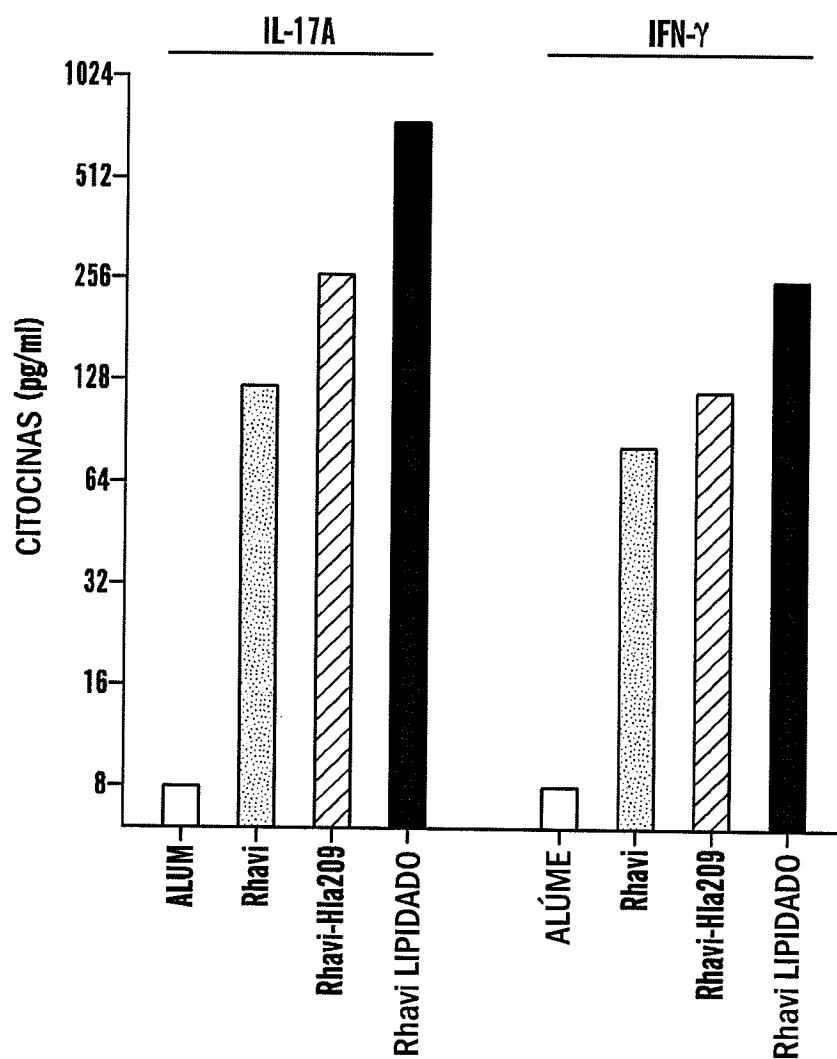
ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE H1a WT OU MUTANTE E  
SUAS PROTEÍNAS DE FUSÃO DE RHIZAVIDINA

**FIG. 12**



ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS COM Rhavi-Ha209 INDUZ CITOCINAS PRO-INFLAMATÓRIAS MÚLTIPAS

**FIG. 13**



INCORPORAÇÃO DE RHIZAVIDINA LIPIDADA OU Rhavi-Hla209 EM COMPLEXO  
MAPS ACENTUA AS RESPOSTAS DE CÉLULAS T A OUTROS ANTÍGENOS

**FIG. 14**