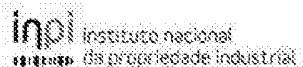

(11) Número de Publicação: **PT 2275554 E**



(51) Classificação Internacional:

C12N 15/31 (2015.01) **C07K 14/22** (2015.01)
C07K 16/12 (2015.01) **A61K 39/95** (2015.01)
A61K 39/40 (2015.01) **A61K 48/00** (2015.01)
G01N 33/53 (2015.01) **G01N 33/569** (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2000.10.30**

(30) Prioridade(s): **1999.10.29 US 162616 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.01.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.03.25**
123/2015

(73) Titular(es):

NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.

VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA (SI)

IT

(72) Inventor(es):

CESIRA GALEOTTI

IT

MARIAGRAZIA PIZZA

IT

MARIA SCARSELLI

IT

GUIDO GRANDI

IT

VEJA MASIGNANI

IT

(74) Mandatário:

NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO

RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS DE NEISSERIA

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO PROPORCIONA, ENTRE OUTRAS COISAS, PROTEÍNAS, POLIPÉPTIDOS E SEUS FRAGMENTOS, DERIVADOS DE BACTÉRIAS NEISSERIA MENINGITIDIS B. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM TAIS PROTEÍNAS, POLIPÉPTIDOS E/OU FRAGMENTOS, BEM COMO ÁCIDOS NUCLEICOS COMPLEMENTARES ÀQUELES (POR EXEMPLO, ÁCIDOS NUCLEICOS ANTIMENSAGEIROS). ADICIONALMENTE, ESTA INVENÇÃO PROPORCIONA ANTICORPOS, OS QUAIS SE LIGAM ÀS PROTEÍNAS, POLIPÉPTIDOS E/OU FRAGMENTOS. ESTA INVENÇÃO PROPORCIONA AINDA VETORES DE EXPRESSÃO ÚTEIS PARA PREPARAR AS PROTEÍNAS, POLIPÉPTIDOS E/OU FRAGMENTOS, BEM COMO CÉLULAS HOSPEDEIRAS TRANSFORMADAS COM TAIS VETORES. ESTA INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA COMPOSIÇÕES DAS PROTEÍNAS, POLIPÉPTIDOS, FRAGMENTOS E/OU ÁCIDOS NUCLEICOS, PARA SEREM UTILIZADAS COMO VACINAS, REAGENTES DE DIAGNÓSTICO, COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS, E SEMELHANTES. SÃO TAMBÉM PROPORCIONADOS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE TRATAMENTO COM AS COMPOSIÇÕES. ESTA INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA MÉTODOS DE DETEÇÃO DAS PROTEÍNAS, POLIPÉPTIDOS, FRAGMENTOS E/OU ÁCIDOS NUCLEICOS.

RESUMO

"PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS DE NEISSERIA"

Esta invenção proporciona, entre outras coisas, proteínas, polipéptidos e seus fragmentos, derivados de bactérias *Neisseria meningitidis* B. São também proporcionados ácidos nucleicos que codificam tais proteínas, polipéptidos e/ou fragmentos, bem como ácidos nucleicos complementares àqueles (por exemplo, ácidos nucleicos antimensageiros). Adicionalmente, esta invenção proporciona anticorpos, os quais se ligam às proteínas, polipéptidos e/ou fragmentos. Esta invenção proporciona ainda vetores de expressão úteis para preparar as proteínas, polipéptidos e/ou fragmentos, bem como células hospedeiras transformadas com tais vetores. Esta invenção também proporciona composições das proteínas, polipéptidos, fragmentos e/ou ácidos nucleicos, para serem utilizadas como vacinas, reagentes de diagnóstico, composições imunogénicas, e semelhantes. São também proporcionados métodos de preparação das composições e métodos de tratamento com as composições. Esta invenção também proporciona métodos de deteção das proteínas, polipéptidos, fragmentos e/ou ácidos nucleicos.

DESCRIÇÃO

"PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS DE NEISSERIA"

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção refere-se a sequências peptídicas antigénicas das bactérias *Neisseria meningitidis*.

TÉCNICA ANTERIOR

A *N.meningitidis* é um diplococo Gram-negativo, imóvel que é patogénico em humanos.

Com base no polissacárido capsular do organismo, foram identificados 12 serogrupos de *N.meningitidis*. O grupo A é o agente patogénico mais frequentemente implicado em doenças epidémicas na África subsariana. Os serogrupos B e C são responsáveis pela grande maioria de casos nos Estados Unidos e na maioria dos países desenvolvidos. Os serogrupos W 135 e Y são responsáveis pelos restantes casos nos Estados Unidos e países desenvolvidos.

A vacina meningocócica atualmente em utilização é uma vacina polissacarídea tetravalente constituída pelos serogrupos A, C, Y e W135. No entanto, o meningococo B permanece um problema. A abordagem polissacarídea não pode ser utilizada porque o polissacárido capsular menB é um polímero de ácido N-acetil-neuramínico ligado em $\alpha(2-8)$ que está também presente no tecido de mamíferos. Uma abordagem a uma vacina menB utiliza misturas de proteínas da membrana externa (OMPs). Para superar a variabilidade antigénica foram construídas vacinas multivalentes contendo até nove porinas diferentes [por exemplo, Poolman JT (1992)

Development of a meningococcal vaccine. Infect. Agents Dis. 4:13-28]. Outras proteínas utilizadas em vacinas da membrana externa foram as proteínas opa e opc, mas nenhuma destas abordagens foi capaz de superar a variabilidade antigénica [por exemplo, Ala'Aldeen & Borriello (1996)]. As proteínas de ligação de transferrina meningocócicas 1 e 2 estão ambas expostas na superfície e geram anticorpos bactericidas capazes de matar estirpes homólogas e heterólogas. [Vaccine 14(1):49-53].

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a fragmentos da proteína 936-1 divulgada no pedido internacional de patente WO99/57280 e WO00/22430 (os "Pedidos Internacionais"), em que os fragmentos compreendem pelo menos um determinante antigénico, e são selecionados dos 5 fragmentos da reivindicação 1, e a invenção também proporciona proteínas compreendendo um ou mais destes 5 fragmentos.

A invenção está sujeita à condição de que não inclui no seu âmbito as proteínas limitadas a qualquer uma das sequências de proteínas de comprimento total divulgadas no Pedidos Internacionais (isto é, as SEQ IDs pares: 2-3020 da WO99/57280 e as SEQ IDs ímpares: 963-1045 da WO00/22430).

As proteínas da invenção podem ser, evidentemente, preparadas por vários meios (por exemplo, expressão recombinante, purificação a partir de cultura de células, síntese química etc.) e em várias formas (por exemplo, nativa, fusões C-terminais e/ou N-terminais etc.). Aquelas são preferencialmente preparadas numa forma substancialmente pura (isto é, substancialmente isenta de outras proteínas de células de Neisseria ou do hospedeiro).

As proteínas curtas são preferencialmente produzidas utilizando síntese química de péptidos.

De acordo com um outro aspetto, a invenção proporciona anticorpos que reconhecem os fragmentos da invenção, com a condição de que a invenção não inclui no seu âmbito anticorpos que reconhecem qualquer uma das sequências de proteínas completas dos Pedidos Internacionais. Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais, e podem ser produzidos por qualquer meio adequado.

As composições compreendendo proteínas e/ou anticorpos de acordo com a invenção podem ser adequadas como vacinas, por exemplo, ou como reagentes de diagnóstico, ou como composições imunogénicas.

A proteína ou antícorpo de acordo com a invenção pode ser utilizado como um medicamento (por exemplo, como vacinas ou como composições imunogénicas) ou como reagentes de diagnóstico. Eles podem ser utilizados no fabrico de: (i) um medicamento para tratar ou prevenir infecção devido a bactérias de Neisseria; (ii) um reagente de diagnóstico para detetar a presença de bactérias de Neisseria ou de anticorpos gerados contra bactérias de Neisseria; e/ou (iii) um reagente que pode gerar anticorpos contra bactérias de Neisseria. As referidas bactérias de Neisseria podem ser de qualquer espécie ou estirpe (tal como *N. gonorrhoeae*) mas são preferencialmente *N. meningitidis*, especialmente estirpe A ou estirpe B.

A divulgação também proporciona um método de tratamento de um doente, compreendendo administrar ao doente uma quantidade terapeuticamente eficaz de ácido nucleico, proteína e/ou antícorpo de acordo com a invenção.

Segue-se um resumo das técnicas e procedimentos convencionais que podem ser utilizados para realizar a invenção (por exemplo, para utilizar as sequências divulgadas para efeitos de vacinação ou diagnóstico). Este resumo não é uma limitação à invenção mas, antes pelo contrário, proporciona exemplos que podem ser utilizados, mas que não são necessários.

Geral

A prática da presente invenção utilizará, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais de biologia molecular, microbiologia, ADN recombinante e imunologia, as quais estão dentro da perícia na técnica. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura, por exemplo, Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D.N Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed, 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the Methods in Enzymology series (Academic Press, Inc.), especially volumes 154 & 155; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer and Walker, eds. (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Scopes, (1987) Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition (Springer-Verlag, N.Y.), e Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C. C. Blackwell eds 1986). Nesta descrição são utilizadas as abreviaturas convencionais para nucleótidos e aminoácidos.

Definições

Uma composição contendo X está "substancialmente isenta de" Y quando pelo menos 85% em peso do total X+Y na composição é X. Preferencialmente, X compreende pelo menos cerca de 90% em peso do total de X+Y na composição, mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% ou até mesmo 99% em peso.

O termo "compreendendo" significa "incluindo," bem como "consistindo" por exemplo, uma composição "compreendendo" X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir algo adicional a X, tal como X+Y.

O termo "determinante antigénico" inclui epítopos de células B e epítopos de células T.

O termo "heterólogo" refere-se a dois componentes biológicos que não são encontrados em conjunto na natureza. Os componentes podem ser células hospedeiras, genes ou regiões reguladoras, tais como promotores. Embora os componentes heterólogos não sejam encontrados em conjunto na natureza, eles podem atuar em conjunto, como quando um promotor heterólogo para um gene é operacionalmente ligado ao gene. Outro exemplo é quando uma sequência meningocócica é heteróloga a uma célula hospedeira de rato. Um outro exemplo seria dois epítopos de proteínas iguais ou diferentes que foram reunidos numa única proteína numa disposição não encontrada na natureza

Uma "origem de replicação" é uma sequência polinucleotídica que inicia e regula a replicação de polinucleótidos, tal como um vetor de expressão. A origem de replicação comporta-se como uma unidade autónoma de replicação de polinucleótidos dentro de uma célula, capaz de se replicar

sob o seu próprio controlo. Uma origem de replicação pode ser necessária para um vetor se replicar numa célula hospedeira particular. Com certas origens de replicação, um vetor de expressão pode ser reproduzido num número de cópias muito alto na presença das proteínas apropriadas dentro da célula. Os exemplos de origens são as sequências com replicação autónoma, as quais são eficazes em levedura; e o antigénio T viral, eficaz em células COS-7.

Sistemas de expressão

As sequências de nucleótidos meningocócicas podem ser expressas numa variedade de sistemas de expressão diferentes; por exemplo, aqueles utilizados com células de mamíferos, baculovírus, plantas, bactérias e levedura.

i. Sistemas de Mamíferos

Os sistemas de expressão de mamíferos são conhecidos na técnica. Um promotor mamífero é qualquer sequência de ADN capaz de ligar a polimerase de ARN mamífera e iniciar a transcrição a jusante (3') de uma sequência codificante (por exemplo, gene estrutural) em ARNm. Um promotor terá uma região de início da transcrição, a qual é geralmente colocada proximal à extremidade 5' da sequência codificante, e uma caixa TATA, geralmente localizada 25-30 pares de bases (pb) a montante do sítio de início da transcrição. Julga-se que a caixa TATA controla a polimerase de ARN II para iniciar a síntese de ARN no sítio correto. Um promotor mamífero conterá também um elemento promotor a montante, geralmente localizado dentro de 100 a 200 pb a montante da caixa TATA. Um elemento promotor a montante determina a velocidade à qual a transcrição é iniciada e pode atuar em qualquer orientação [Sambrook et

al. (1989) "Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells." In Molecular Cloning: A Laboraloyy Manual. 2nd ed.].

Os genes de vírus de mamíferos são frequentemente expressos de forma elevada e têm uma grande gama de hospedeiros; por conseguinte, as sequências que codificam genes de vírus de mamíferos proporcionam sequências promotoras particularmente úteis. Os exemplos incluem o promotor precoce de SV40, o promotor LTR do vírus do tumor mamário de rato, promotor tardio principal de adenovírus (Ad MLP), e promotor do vírus herpes simplex. Além disso, as sequências derivadas de genes não virais, tal como o gene da metalotioneína murídea, proporcionam também sequências promotoras úteis. A expressão pode ser constitutiva ou regulado (induzível), dependendo do promotor pode ser induzida com glucocorticoides em células sensíveis a hormonas.

A presença de um elemento intensificador (intensificador), combinado com os elementos promotores descritos acima, aumentará em geral os níveis de expressão. Um intensificador é uma sequência reguladora de ADN que pode estimular a transcrição até 1000 vezes quando ligado a promotores homólogos ou heterólogos, começando a síntese no sítio de início de ARN normal. Os intensificadores são também ativos quando são colocados a montante ou a jusante do sítio de início da transcrição, quer na orientação normal ou invertida, ou a uma distância de mais do que 1000 nucleótidos do promotor [Maniatis et al. (1987) Science 236:1237; Alberts et al. (1989) Molecular Biology of the Cell, 2nd ed.]. Os elementos intensificadores derivados de vírus podem ser particularmente úteis, porque têm geralmente uma gama de hospedeiros mais lata. Os exemplos incluem o intensificador do gene precoce de SV40 [Dijkema et al (1985) EMBO J. 4:761] e o intensificador/promotores

derivados da repetição terminal longa (LTR) do Vírus do Sarcoma de Rous [Gorman et al. (1982b) Proc. Natl. Acad. Sci. 79:6777] e do citomegalovírus humano [Boshart et al. (1985) Cell 47:521]. Adicionalmente, alguns intensificadores são reguláveis e tornam-se ativos apenas na presença de um indutor, tal como uma hormona ou ião de metal [Sassone-Corsi e Borelli (1986) Trends Genet. 2:215; Maniatis et al. (1987) Science 236:1237].

Uma molécula de ADN pode ser expressa intracelularmente nas células de mamíferos. Uma sequência promotora pode ser diretamente ligada à molécula de ADN, em cujo caso o primeiro aminoácido na extremidade N-terminal da proteína recombinante será sempre uma metionina, a qual é codificada pelo codão de iniciação ATG. Se desejado, a extremidade N-terminal pode ser dissociado da proteína por incubação *in vitro* com brometo de cianogénio.

Alternativamente, as proteínas estranhas podem ser também segregadas a partir da célula para o meio de crescimento criando moléculas de ADN químéricas que codificam uma proteína de fusão constituída por um fragmento de sequência líder que proporciona a secreção da proteína estranha nas células de mamíferos. Preferencialmente, existem sítios de processamento codificados entre o fragmento do líder e o gene estranho que podem ser dissociados *in vivo* ou *in vitro*. Um fragmento de sequência líder codifica geralmente um péptido sinal constituído por aminoácidos hidrófobos que coordenam a secreção da proteína a partir da célula. A líder tripartida de adenovírus é um exemplo de uma sequência líder que proporciona a secreção de uma proteína estranha nas células de mamíferos.

Em geral, as sequências de terminação da transcrição e poliadenilação reconhecidas pelas células de mamíferos são regiões reguladoras localizadas 3' em relação ao codão de paragem da tradução e desse modo, em conjunto com os elementos promotores, flanqueiam a sequência codificante. A extremidade 3' do ARNm maduro é formada pela dissociação pós-tradução específica de um sítio e poliadenilação [Birnstiel et al. (1985) Cell 41:349; Proudfoot and Whitelaw (1988) "Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. In Transcription and splicing (ed. B.D. Hames and D.M. Glover); Proudfoot (1989) Trends Biochem. Sci. 14:105]. Estas sequências coordenam a transcrição de um ARNm que pode ser traduzido no polipeptído codificado pelo ADN. Os exemplos de sinais de terminação da transcrição/poliadenilação incluem aqueles derivados de SV40 [Sambrook et al (1989) "Expression of cloned genes in cultured mammalian cells." In Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

Em geral, os componentes descritos acima, compreendendo um promotor, sinal de poliadenilação e sequência de terminação da transcrição são colocados em conjunto em construções de expressão. Se desejado, intensificadores, intrôns com junção-excisão funcional de sítios doadores e aceitadores, e sequências líderes podem ser também incluídos numa construção de expressão. As construções de expressão são frequentemente mantidas num replicão, tal como um elemento extracromossómico (por exemplo, plasmídeos) capaz de manutenção estável num hospedeiro, tal como as células de mamíferos ou bactérias. Os sistemas de replicação de mamíferos incluem aqueles derivados de vírus animais que requerem fatores trans-actuantes para replicar. Por exemplo, os plasmídeos que contêm os sistemas de replicação de papovavírus, tal como SV40 [Gluzman (1981) Cell 23:175] ou poliomavírus, replicam-se até um número de cópias

extremamente alto na presença do抗原 T viral apropriado. Os exemplos adicionais de replicões de mamíferos incluem aqueles derivados de papilomavírus bovino e vírus Epstein-Barr. Adicionalmente, o replicão pode ter dois sistemas de replicação, permitindo assim que seja mantido, por exemplo, nas células de mamíferos para expressão e num hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. Os exemplos de tais vetores transportadores mamíferos-bactérias incluem pMT2 [Kaufinan et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9:946] e pHEBO [Shimizu et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:1074].

O procedimento de transformação utilizado depende do hospedeiro a ser transformado. Os métodos de introdução de polinucleótidos heterólogos em células de mamíferos são conhecidos na técnica e incluem, transfeção mediada por dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, transfeção mediada por polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação, encapsulamento do polinucleótido(s) em lipossomas e microinjeção direta do ADN nos núcleos.

Linhos de células de mamíferos disponíveis como hospedeiros para expressão são conhecidas na técnica e incluem muitas linhas de células imortalizadas disponíveis da American Type Culture Collection (ATCC), incluindo mas não se limitando a, células de ovário de hamster Chinês (CHO), células HeLa, células de rim de cria de hamster (BHK), células de rim de macaco (COS), células hepatocelulares de carcinoma humano (por exemplo, Hep G2), e um número de outras linhas de células.

ii. Sistemas de Baculovírus

O polinucleótido que codifica a proteína pode ser também inserido num vetor de expressão de inseto adequado, e é

ligado operacionalmente aos elementos de controlo dentro desse vetor. A construção do vetor utiliza técnicas que são conhecidas na técnica. Em geral, os componentes do sistema de expressão incluem um vetor de transferência, geralmente um plasmídeo bacteriano, o qual contém um fragmento do genoma de baculovírus, e um sítio de restrição conveniente para inserção do gene ou genes heterólogos a serem expressos; um baculovírus de tipo selvagem com uma sequência homóloga para o fragmento específico de baculovírus no vetor de transferência (isto permite a recombinação homóloga do gene heterólogo no genoma de baculovírus); e células hospedeiras de inseto apropriadas e meio de crescimento.

Após inserção da sequência de ADN que codifica a proteína no vetor de transferência, o vetor e o genoma viral de tipo selvagem são transfetados numa célula hospedeira de inseto, onde o vetor e genoma viral são deixados recombinar. O vírus recombinante empacotado é expresso e as placas recombinantes são identificadas e purificadas. Os materiais e métodos para sistemas de expressão de baculovírus/células de inseto estão comercialmente disponíveis na forma de kit a partir de, *inter alia*, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac"). Estas técnicas são geralmente conhecidas dos especialistas na técnica e completamente descritas em Summers e Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin N.º 1555 (1987) (a seguir "Summers e Smith").

Antes de inserir a sequência de ADN que codifica a proteína no genoma de baculovírus, os componentes descritos acima, compreendendo um promotor, líder (se desejado), sequência codificante de interesse, e sequência de terminação da transcrição, são geralmente reunidos numa construção de substituição intermediária (vetor de transferência). Esta construção pode conter um único gene e elementos

reguladores operacionalmente ligados; múltiplos genes, cada um com o seu próprio conjunto de elementos reguladores operacionalmente ligados; ou múltiplos genes, regulados pelo mesmo conjunto de elementos reguladores. As construções de substituição intermediárias são frequentemente mantidas num replicão, tal como um elemento extracromossómico (por exemplo, plasmídeos) capaz de manutenção estável num hospedeiro, tal como uma bactéria. O replicão terá um sistema de replicação, que permite assim que seja mantido num hospedeiro adequado para clonagem e amplificação.

Atualmente, o vetor de transferência mais geralmente utilizado para introduzir genes estranhos em AcNPV é pAc373. Foram também concebidos muitos outros vetores, conhecidos dos especialistas na técnica. Estes incluem, por exemplo, pVL985 (o qual altera o codão de iniciação de poliedrina de ATG para ATT, e o qual introduz um sítio de clonagem BamHI com 32 pares de bases a jusante do ATT; ver Luckow e Summers, *Virology* (1989) 17:31.

O plasmídeo geralmente contém também o sinal de poliadenilação de poliedrina (Miller et al. (1988) *Ann. Rev.. Microbiol.*, 42:177) e um gene procariótico de resistência a ampicilina- (*amp*) e a origem de replicação para seleção e propagação em *E. coli*.

Os vetores de transferência de baculovírus contêm geralmente um promotor de baculovírus. Um promotor de baculovírus é qualquer sequência de ADN capaz de ligar uma polimerase de ARN de baculovírus e iniciar a transcrição a jusante (5' para 3') de uma sequência codificante (por exemplo, gene estrutural) em ARNm. Um promotor terá uma região de início da transcrição que é geralmente colocada proximal à extremidade 5' da sequência codificante. Esta

região de início da transcrição inclui geralmente um sítio de ligação da polimerase de ARN e um sítio de início da transcrição. Um vetor de transferência de baculovírus pode ter também um segundo domínio denominado intensificador, o qual, se presente, está geralmente distal ao gene estrutural. A expressão pode ser regulada ou constitutiva.

Os genes estruturais, transcritos abundantemente em pontos tardios num ciclo de infecção viral, proporcionam sequências promotoras particularmente úteis. Os exemplos incluem sequências derivadas do gene que codifica a proteína poliédrica viral, Friesen et al., (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression," in: The Molecular Biology of Baculoviruses (ed. Walter Doerfler); Publ. EPO N.º 127 839 e 155 476; e o gene que codifica a proteína p10, Vlak et al., (1988), J. Gen. Virol. 69:765.

O ADN que codifica as sequências sinal adequadas pode ser derivado de genes para proteínas de inseto ou baculovírus segregadas, tal como o gene de poliedrina de baculovírus (Carbonell et al. (1988) Gene, 73:409). Alternativamente, uma vez que os sinais para modificações pós-tradução das células de mamífero (tais como dissociação de péptido sinal, dissociação proteolítica e fosforilação) parecem ser reconhecidos pelas células de insetos e os sinais necessários para secreção e acumulação nuclear parecem ser também conservados entre as células de invertebrados e células de vertebrados, as líderes com origem em não insetos, tais como aquelas derivadas de genes que codificam interferões humanos, Maeda et al., (1985), Nature 315:592; péptido de libertação de gastrina humana, Lebacq-Verheyden et al., (1988), Molec. Cell. Biol. 8:3129; IL-2 humana, Smith et al., (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82:8404; IL-3 de rato, (Miyajima et al., (1987) Gene 58:273; e glucocerebrosidase humana, Martin et al. (1988) ADN, 7:99,

podem ser também utilizadas para proporcionar secreção em insetos.

Um polipéptido ou poliproteína recombinante pode ser expresso intracelularmente ou, se é expresso com as sequências reguladoras apropriadas, pode ser segregado. A boa expressão intracelular de proteína estranhas não fundidas requer geralmente genes heterólogos que têm idealmente uma sequência líder curta contendo sinais de início da tradução adequados a preceder um sinal de início ATG. Se desejado, a metionina na extremidade N-terminal pode ser dissociada a partir da proteína madura por incubação *in vitro* com brometo de cianogénio.

Alternativamente, as poliproteínas ou proteínas recombinantes que não são naturalmente segregadas, podem ser segregadas a partir da célula de inseto criando moléculas de ADN químéricas que codificam uma proteína de fusão constituída por um fragmento de sequência líder que proporciona a secreção da proteína estranha em insetos. O fragmento de sequência líder codifica geralmente um péptido sinal constituído por aminoácidos hidrófobos que coordenam a translocação da proteína para o retículo endoplasmático.

Após inserção da sequência de ADN e/ou gene que codifica o precursor do produto de expressão da proteína, um hospedeiro de células de inseto é co-transformado com o ADN heterólogo do vetor de transferência e o ADN genómico do baculovírus de tipo selvagem -- geralmente por co-transfeção. O promotor e a sequência de terminação da transcrição da construção compreenderão geralmente uma secção de 2-5kb do genoma de baculovírus. Os métodos para introduzir ADN heterólogo no sítio desejado nos vírus de baculovírus são conhecidos na técnica. (ver Summers e Smith *supra*; Ju et al. (1987); Smith et al., Mol. Cell. Biol.

(1983) 3:2156; e Luckow e Summers (1989)). Por exemplo, a inserção pode ser num gene tal como o gene de poliedrina, por recombinação cruzada dupla homóloga; a inserção pode ser também num sítio de enzima de restrição manipulado por engenharia no gene de baculovírus desejado. Miller et al., (1989), Bioessays 4:91. A sequência de ADN, quando clonada no lugar do gene de poliedrina no vetor de expressão, está flanqueada a 5' e 3' por sequências específicas de poliedrina e é posicionada a jusante do promotor de poliedrina.

O vetor de expressão de baculovírus recém-formado é subsequentemente empacotado num baculovírus recombinante infeccioso. A recombinação homóloga ocorre a baixa frequência (entre cerca de 1% e cerca de 5%); assim, a maior parte do vírus produzido após co-transfeção é ainda vírus de tipo selvagem. Por conseguinte, é necessário um método para identificar vírus recombinantes. Uma vantagem do sistema de expressão é a triagem visual que permite distinguir vírus recombinantes. A proteína poliedrina, a qual é produzida pelo vírus nativo, é produzida a níveis muito altos nos núcleos de células infetadas em pontos tardios após infecção viral. A proteína poliedrina acumulada forma corpos de oclusão que contêm também partículas embutidas. Estes corpos de oclusão, até 15 μm de tamanho, são altamente refrativos, dando-lhes um aspecto muito brilhante que é facilmente visualizado sob a luz do microscópio. As células infetadas com vírus recombinante não têm corpos de oclusão. Para distinguir os vírus recombinantes de vírus de tipo selvagem, o sobrenadante da transfeção é aplicado sobre uma monocamada de células de insetos por técnicas conhecidas dos especialistas na técnica. Nomeadamente, as placas são pesquisadas sob a luz do microscópio quanto à presença (indicativo de vírus de tipo selvagem) ou ausência (indicativo de vírus

recombinante) de corpos de oclusão. "Current Protocols in Microbiology" Vol. 2 (Ausubel et al. eds) em 16.8 (Sup. 10, 1990); Summers e Smith, *supra*; Miller et al. (1989).

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

Estão comercialmente disponíveis células e meios de cultura de células para a expressão direta e de fusão de polipeptídios heterólogos num baculovírus/sistema de expressão; a tecnologia de cultura de células é geralmente conhecida dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Summers e Smith *supra*.

As células de inseto modificadas podem ser depois cultivadas num meio nutriente apropriado, o qual permite a manutenção estável do(s) plasmídeo(s) presente(s) no hospedeiro de inseto modificado. Nos casos em que o gene do produto de expressão está sob controlo induzível, o hospedeiro pode ser cultivado até alta densidade, e a expressão induzida. Alternativamente, nos casos em que a expressão é constitutiva, o produto será continuamente expresso para o meio e o meio nutriente tem de ser continuamente circulado, enquanto se retira o produto de interesse e aumenta os nutrientes consumidos. O produto pode ser purificado por técnicas tais como cromatografia, por exemplo, HPLC, cromatografia de afinidade,

cromatografia de troca iônica, etc.; eletroforese; centrifugação com gradiente de densidade; extração com solvente, ou semelhantes. Consoante apropriado, o produto pode ser ainda purificado, conforme necessário, de forma a remover substancialmente quaisquer proteínas de inseto que sejam também segregadas para o meio ou resultem da lise das células de insetos, de forma a proporcionar um produto que está, pelo menos, substancialmente isento de detritos do hospedeiro, por exemplo, proteínas, lípidos e polissacáridos.

A fim de obter a expressão da proteína, as células hospedeiras recombinantes derivadas dos transformantes são incubadas sob condições que permitem a expressão da sequência codificante da proteína recombinante. Estas condições variarão, dependente da célula hospedeira selecionada. No entanto, as condições são facilmente determinadas pelos especialistas com conhecimentos médios na matéria, com base no que é conhecido na técnica.

iii. Sistemas Vegetais

Existem muitos sistemas de expressão genética em culturas de células vegetais e plantas inteiras conhecidos na técnica. Os sistemas de expressão genética em células vegetais ilustrativos incluem aqueles descritos em patentes, tais como: US 5,693,506; US 5,659,122; e US 5,608,143. Exemplos adicionais de expressão genética em cultura de células vegetais foram descritos por Zenk, Phytochemistry 30:3861-3863 (1991). Além das referências descritas acima, a descrição de péptidos sinal de proteínas vegetais pode ser encontrada em Vaulcombe et al., Mol. Gen. Genet. 209:33-40 (1987); Chandler et al., Plant Molecular Biology 3:407-418 (1984); Rogers, J. Biol. Chem. 260:3731-3738 (1985); Rothstein et al., Gene 55:353-356 (1987);

Whittier et al., Nucleic Acids Research 15:2515-2535 (1987); Wirsel et al., Molecular Microbiology 3:3-14 (1989); Yu et al., Gene 122:247-253 (1992). Uma descrição da regulação da expressão de genes vegetais pela hormona vegetal, ácido giberélico, e das enzimas segregadas induzidas pelo ácido giberélico pode ser encontrada em R.L. Jones e J. MacMillin, Gibberellins: in: Advanced Plant Physiology, Malcolm B. Wilkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, London, pp. 21-52. Referências que descrevem outros genes regulados metabolicamente: Sheen, Plant Cell, 2:1027-1038 (1990); Maas et al., EMBO J. 9:3447-3452 (1990); Benkel e Hickey, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1337-1339 (1987)

Tipicamente, utilizando técnicas conhecidas na matéria, uma sequência polinucleotídica desejada é inserida numa cassette de expressão compreendendo elementos genéticos reguladores concebidos para funcionarem em plantas. A cassette de expressão é inserida num vetor de expressão desejado com sequências acompanhantes, a montante e a jusante da cassette de expressão, adequadas para expressão num hospedeiro vegetal. As sequências acompanhantes serão de origem em plasmídeo ou vírus e proporcionam as características necessárias ao vetor para permitir que os vetores transfiram o ADN de um hospedeiro de clonagem original, tal como as bactérias, para o hospedeiro vegetal desejado. A construção básica de vetor bacteriano/vegetal proporcionará preferencialmente uma origem de replicação procariota com gama ampla de hospedeiros; um marcador selecionável procariota; e, para transformações de Agrobacterium, sequências de ADN T para transferência mediada por Agrobacterium para cromossomas vegetais. Nos casos em que o gene heterólogo não é prontamente adequado para detecção, a construção também terá preferencialmente um gene marcador selecionável adequado para determinar se uma célula vegetal foi transformada. Uma revisão geral dos marcadores

adequados, por exemplo, para os membros da família das gramíneas, encontra-se em Wilmink e Dons, 1993, Plant Mol. Biol. Repr., 11(2):165-185.

Também são recomendadas sequências adequadas para permitir a integração da sequência heteróloga no genoma vegetal. Estas podem incluir sequências de transposição e semelhantes para recombinação homóloga bem como sequências Ti, as quais permitem a inserção aleatória de uma cassette de expressão heteróloga num genoma vegetal. Os marcadores selecionáveis procariotas adequados incluem a resistência a antibióticos tais como ampicilina ou tetraciclina. Outras sequências de ADN que codificam funções adicionais podem estar também presentes no vetor, como é conhecido na técnica.

As moléculas de ácido nucleico da presente invenção podem ser incluídas numa cassette de expressão para expressão da(s) proteína(s) de interesse. Em geral, existirá apenas uma cassette de expressão, embora sejam exequíveis duas ou mais. A cassette de expressão recombinante conterá além da sequência codificante da proteína heteróloga os seguintes elementos, uma região promotora, sequências não traduzidas 5' vegetais, codão de iniciação dependendo se o gene estrutural vem munido de uma, ou não, e uma sequência de terminação da transcrição e tradução. Os sítios de enzimas de restrição únicos nas extremidades 5' e 3' da cassette permitem a inserção fácil num vetor preexistente.

Uma sequência codificante heteróloga pode ser para qualquer proteína relacionada com a presente invenção. A sequência que codifica a proteína de interesse codificará um péptido sinal que permite o processamento e translocação da proteína, consoante apropriado e, em geral, não conterá qualquer sequência que possa resultar na ligação da proteína desejada da invenção a uma membrana. Uma vez que,

para a maior parte, a região de início da transcrição será para um gene que é expresso e deslocado durante a germinação, utilizando o péptido sinal que proporciona translocação, pode também proporcionar-se a translocação da proteína de interesse. Desta maneira, a(s) proteína(s) de interesse será(ão) deslocada(s) a partir das células nas quais são expressas e pode(m) ser eficientemente colhida(s). Tipicamente, a secreção em sementes é através da camada da aleurona ou do epitélio escutelar para o endosperma da semente. Embora não seja necessário que a proteína seja segregada a partir das células na qual a proteína é produzida, isto facilita o isolamento e purificação da proteína recombinante.

Uma vez que a expressão final do produto de gene desejado ocorrerá numa célula eucariota, é desejável determinar se qualquer porção do gene clonado contém sequências que serão processadas como intrões pela maquinaria de excisão do hospedeiro. Se assim for, pode realizar-se mutagénese específica de um lócus na região do "intrão" para impedir a perda de uma porção da mensagem genética como um código de intrão falso, Reed e Maniatis, *Cell* 41:95-105, 1985.

O vetor pode ser microinjetado diretamente nas células vegetais através da utilização de micropipetas para transferir mecanicamente o ADN recombinante. Crossway, Mol. Gen. Genet., 202:179-185, 1985. O material genético pode ser também transferido para a célula vegetal utilizando polietileno glicol, Krens, et al., *Nature*, 296, 72-74, 1982. Outro método de introdução de segmentos de ácido nucleico é a penetração balística de alta velocidade por pequenas partículas com o ácido nucleico dentro da matriz de pequenas esférulas ou partículas, ou na superfície, em que Klein, et al., *Nature*, 327, 70-73, 1987 e Knudsen e Muller, 1991, *Planta*, 185:330-336 descrevem o

bombardeamento do endosperma de cevada com partículas para gerar cevada transgénica. Ainda outro método de introdução seria a fusão de protoplastos com outras entidades, quer minicélulas, células, lisossomas ou outros corpos com lípidos fusíveis na superfície, Fraley, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1859-1863, 1982.

O vetor pode ser também introduzido nas células vegetais por eletroporação. (Fromm et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 82:5824, 1985). Nesta técnica, os protoplastos vegetais são eletroporados na presença de plasmídeos contendo a construção de gene. Impulsos elétricos de alta potência de campo permeabilizam reversivelmente as biomembranas permitindo a introdução dos plasmídeos. Os protoplastos vegetais eletroporados restabelecem a parede celular, dividem-se e formam o calo vegetal.

Todas as plantas a partir das quais possam ser isolados e cultivados protoplastos para dar plantas inteiras regeneradas podem ser transformadas para que sejam recuperadas plantas inteiras que contêm o gene transferido. Sabe-se que praticamente todas as plantas podem ser regeneradas a partir de células ou tecidos cultivados, incluindo mas não se limitando a todas as espécies principais de cana-de-açúcar, beterraba sacarina, algodão, árvores de frutos e outras, leguminosas e vegetais. Algumas plantas adequadas incluem, por exemplo, espécies dos géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*,

Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Biowaalia, Glycine, Lolium, Zea, Trilicum, Sorghum e Datura.

Os meios para regeneração variam de espécie para espécie de planta mas, em geral, é primeiro proporcionada uma suspensão de protoplastos transformados contendo cópias do gene heterólogo. Forma-se tecido de calo e pode induzir-se rebentos a partir do calo e subsequentemente enraizados. Alternativamente, pode induzir-se a formação de embriões a partir da suspensão de protoplastos. Estes embriões germinam como embriões naturais para formar plantas. Os meios de cultura conterão geralmente vários aminoácidos e hormonas, tais como auxina e citocininas. É também vantajoso adicionar ácido glutâmico e prolina ao meio, especialmente para espécies tais como milho e luzerna. Os rebentos e raízes desenvolvem-se normalmente em simultâneo. A regeneração eficiente dependerá do meio, do genótipo e da história da cultura. Se estas três variáveis forem controladas, então a regeneração é completamente reproduzível e repetível.

Nalguns sistemas de cultura de células vegetais, a proteína da invenção desejada pode ser excretada ou, alternativamente, a proteína pode ser extraída a partir da planta inteira. Nos casos em que a proteína desejada da invenção é segregada para o meio, esta pode ser recolhida. Alternativamente, os embriões e as metades de sementes sem embrião ou outro tecido vegetal podem ser mecanicamente rompidos para libertar qualquer proteína segregada entre células e tecidos. A mistura pode ser suspensa numa solução tampão para recuperar as proteínas solúveis. Os métodos convencionais de isolamento e purificação de proteínas serão em seguida utilizados para purificar a proteína recombinante. Os parâmetros de tempo, temperatura, pH, oxigénio e volumes serão ajustados através de métodos de

rotina para otimizar a expressão e recuperação de proteína heteróloga.

iv. Sistemas Bacterianos

As técnicas de expressão bacteriana são conhecidas na técnica. Um promotor bacteriano é qualquer sequência de ADN capaz de ligar a polimerase de ARN bacteriana e iniciar a transcrição a jusante (3') de uma sequência codificante (por exemplo, gene estrutural) em ARNm. Um promotor terá uma região de início da transcrição que é geralmente colocada proximal à extremidade 5' da sequência codificante. Esta região de inicio da transcrição inclui geralmente um sítio de ligação de polimerase de ARN e um sítio de início da transcrição. Um promotor bacteriano pode ter também um segundo domínio denominado um operador, que pode sobrepor um sítio de ligação de polimerase de ARN adjacente no qual começa a síntese de ARN. O operador permite transcrição (induzível) regulada negativa, já que uma proteína repressora do gene pode ligar o operador e, desse modo, inibir a transcrição de um gene específico. A expressão constitutiva pode ocorrer na ausência de elementos reguladores negativos, tais como o operador. Além disso, a regulação positiva pode ser conseguida por uma sequência de ligação de proteína ativadora de gene, a qual, se presente está geralmente proximal (5') à sequência de ligação da polimerase de ARN. Um exemplo de uma proteína ativadora de gene é a proteína ativadora do catabolismo (CAP), a qual ajuda a iniciar a transcrição do operão lac em *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud et al. (1984) Annu. Rev. Genet. 18:173]. Por conseguinte, a expressão regulada pode ser positiva ou negativa, aumentando ou reduzindo desse modo a transcrição.

As sequências que codificam as enzimas da via metabólica proporcionam sequências promotoras particularmente úteis. Os exemplos incluem sequências promotoras derivadas de enzimas metabolizantes de açúcares, tais como galactose, lactose (*lac*) [Chang et al. (1977) Nature 198:1056] e maltose. Exemplos adicionais incluem sequências promotoras derivadas de enzimas biossintéticas tais como triptofano (*trp*) [Goeddel et al. (1980) Nuc. Acids Res. 8:4057; Yelverton et al. (1981) Nucl. Acids Res. 9:731; patente US 4,738,921; EP-A-0036776 e EP-A-0121775]. O sistema promotor de β -lactamase (*bla*) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." In Interferon 3 (ed. I. Gresser)], os sistemas promotores de bacteriófago lambda PL [Shimatake et al. (1981) Nature 292:128] e T5 [(patente US 4,689,406] proporcionam também sequências promotoras úteis.

Além disso, os promotores sintéticos que não ocorrem na natureza também atuam como promotores bacterianos. Por exemplo, as sequências de ativação da transcrição de um promotor bacteriano ou bacteriófago podem ser ligadas às sequências de operão de outro promotor bacteriano ou bacteriófago, gerando um promotor híbrido sintético [patente US 4,551,433]. Por exemplo, o promotor *tac* é um promotor híbrido *trp-lac* constituído por sequências promotoras *trp* e de operão *lac* que é regulado pelo repressor *lac* [Amann et al. (1983) Gene 25:167; de Boer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:21]. Além disso, um promotor bacteriano pode incluir promotores naturais de origem não bacteriana que têm a aptidão para ligar a polimerase de ARN bacteriana e iniciar a transcrição. Um promotor natural de origem não bacteriana pode ser também acoplado com uma polimerase de ARN compatível para produzir níveis altos de expressão de alguns genes em procariotas. O sistema de polimerase de ARN/promotor de bacteriófago T7 é

um exemplo de um sistema promotor acoplado [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; Tabor et al. (1985) Proc Natl. Acad. Sci. 82:1074]. Além disso, um promotor híbrido pode ser também constituído por um promotor de bacteriófago e uma região operadora de *E. coli* (EPO-A-0 267 851).

Além de uma sequência promotora atuante, um sítio de ligação de ribossoma eficiente é também útil para a expressão de genes estranhos em procariotas. Na *E. coli*, o sítio de ligação de ribossoma é denominado de sequência de Shine-Dalgarno (SD) e inclui um codão de iniciação (ATG) e uma sequência de 3-9 nucleótidos de comprimento localizada 3-11 nucleótidos a montante do codão de iniciação [Shine et al. (1975) Nature 254:34]. Julga-se que a sequência SD promove a ligação do ARNm ao ribossoma pelo emparelhamento de bases entre a sequência SD e a 3' do ARNr 16S de *E. coli* [Steitz et al. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA." In Biological Regulation and Development: Gene Expression (ed. R.F. Goldberger)]. Para expressar genes eucarióticos e genes procarióticos com sítio de ligação de ribossoma fraco [Sambrook et al. (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*." In Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

Uma molécula de ADN pode ser expressa intracelularmente. Uma sequência promotora pode ser diretamente ligada à molécula de ADN, em cujo caso o primeiro aminoácido na extremidade N-terminal será sempre uma metionina, a qual é codificada pelo codão de iniciação ATG. Se desejado, a metionina na extremidade N-terminal pode ser dissociada a partir da proteína por incubação *in vitro* com brometo de cianogénio ou por incubação *in vivo* ou *in vitro* com uma peptidase de metionina N-terminal bacteriana (EPO-A-0 219 237).

As proteínas de fusão proporcionam uma alternativa à expressão direta. Em geral, uma sequência de ADN que codifica a porção N-terminal de uma proteína bacteriana endógena, ou outra proteína estável, é fundida com a extremidade 5' de sequências codificantes heterólogas. Após expressão, esta construção proporcionará uma fusão das duas sequências de aminoácidos. Por exemplo, o gene das células lambda de bacteriófagos pode ser ligado na extremidade 5' de um gene estranho e expresso em bactérias. A proteína de fusão resultante retém preferencialmente um sítio para uma enzima de processamento (fator Xa) para dissociar a proteína de bacteriófago do gene estranho [Nagai et al. (1984) *Nature* 309:810]. As proteínas de fusão podem ser também preparadas com sequências de genes de *lacZ* [Jia et al. (1987) *Gene* 60:197], *trpE* [Allen et al. (1987) *J. Biotechnol.* 5:93; Makoff et al. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135:11] e Chey [EP-A-0 324 647]. A sequência de ADN na junção das duas sequências de aminoácidos pode, ou não, codificar um sítio dissociável. Outro exemplo é uma proteína de fusão de ubiquitina. Uma tal proteína de fusão é preparada com a região de ubiquitina que retém preferencialmente um sítio para uma enzima de processamento (por exemplo, protéase de processamento específico de ubiquitina) para dissociar a ubiquitina da proteína estranha. Através deste método, a proteína estranha nativa pode ser isolada [Miller et al. (1989) *Bio/Technology* 7:698]. Alternativamente, as proteínas estranhas podem ser também segregadas a partir da célula gerando moléculas de ADN químéricas que codificam uma proteína de fusão constituída por um fragmento da sequência peptídica sinal que proporciona a secreção da proteína estranha em bactérias [US patente 4,336,336]. O fragmento da sequência sinal codifica geralmente um péptido sinal constituído por aminoácidos hidrófobos que coordenam a secreção da proteína

a partir da célula. A proteína é segregada para o meio de crescimento (bactérias gram-positivas) ou para o espaço periplasmático, localizado entre a membrana interna e externa da célula (bactérias gram-negativas). Preferencialmente, existem sítios de processamento codificados entre o fragmento de péptido sinal e o gene estranho que podem ser dissociados *in vivo* ou *in vitro*.

O ADN que codifica as sequências sinal adequadas pode ser derivado de genes para proteínas bacterianas segregadas, tal como o gene da proteína da membrana externa de *E. coli* (*ompA*) [Masui et al. (1983), in: Experimental Manipulation of Gene Expression; Ghrayeb et al. (1984) EMBO J. 3:2437] e a sequência sinal da fosfatase alcalina de *E. coli* (*phoA*) [Oka et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7212]. Como um exemplo adicional, a sequência sinal do gene da alfaamilase de várias estirpes de *Bacillus* pode ser utilizada para segregar proteínas heterólogas de *B. subtilis* [Palva et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EP-A-0 244 042].

Em geral, as sequências de terminação da transcrição reconhecidas pelas bactérias são regiões reguladoras localizadas 3' em relação ao codão de paragem da tradução e, desse modo, em conjunto com o promotor flanqueiam a sequência codificante. Estas sequências coordenam a transcrição de um ARNm que pode ser traduzido no polipéptido codificado pelo ADN. As sequências de terminação da transcrição incluem frequentemente sequências de ADN de cerca de 50 nucleótidos capazes de formar estruturas de volta em ápice que ajudam na terminação da transcrição. Os exemplos incluem sequências de terminação da transcrição derivadas de genes com promotores fortes,

tais como o gene *trp* em *E. coli*, assim como outros genes biossintéticos.

Em geral, os componentes descritos acima, compreendendo um promotor, sequência sinal (se desejado), sequência codificante de interesse e sequência de terminação da transcrição, são colocados em conjunto em construções de expressão. As construções de expressão são frequentemente mantidas num replicão, tal como um elemento extracromossómico (por exemplo, plasmídeos) capaz de manutenção estável num hospedeiro, tal como as bactérias. O replicão terá um sistema de replicação, que permite assim que seja mantido num hospedeiro procariótico para expressão ou para clonagem e amplificação. Além disso, um replicão pode ser um plasmídeo com um número de cópias alto ou baixo. Um plasmídeo com um número de cópias alto terá geralmente um número de cópias que varia desde cerca de 5 a cerca de 200, e geralmente cerca de 10 a cerca de 150. Um hospedeiro contendo um plasmídeo com um número de cópias alto conterá preferencialmente pelo menos cerca de 10, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 20 plasmídeos. Um vetor com um número de cópias alto ou baixo pode ser selecionado, dependendo do efeito do vetor e a proteína estranha no hospedeiro.

Alternativamente, as construções de expressão podem ser integradas no genoma bacteriano com um vetor de integração. Os vetores de integração contêm geralmente pelo menos uma sequência homóloga ao cromossoma bacteriano que permite que o vetor se integre. As integrações parecem resultar de recombinações entre ADN homólogo no vetor e o cromossoma bacteriano. Por exemplo, os vetores de integração construídos com ADN de várias estirpes de *Bacillus* integram-se no cromossoma do *Bacillus* (EP-A- 0 127 328). Os

vetores de integração podem ser também constituídos por sequências de bacteriófagos ou transposição.

Em geral, as construções de expressão extracromossómicas e de integração podem conter marcadores selecionáveis para permitir a seleção de estirpes bacterianas que foram transformadas. Os marcadores selecionáveis podem ser expressos no hospedeiro bacteriano e podem incluir genes que tornam as bactérias resistentes a fármacos tais como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina (neomicina) e tetraciclina [Davies et al. (1978) *Ann. Rev. Microbiol.* 32:469]. Os marcadores selecionáveis podem incluir também genes bioquímicos, tais como aqueles nas vias bioquímicas da histidina, triptofano e leucina.

Alternativamente, alguns dos componentes descritos acima podem ser colocados em conjunto em vetores de transformação. Os vetores de transformação são geralmente constituídos por um marcador selecionável que é mantido num replicão ou desenvolvido num vetor de integração, como descrito acima.

Foram desenvolvidos vetores de expressão e transformação, quer replicões extracromossómicos ou vetores de integração, para transformação em muitas bactérias. Por exemplo, foram desenvolvidos vetores de expressão para, *inter alia*, as seguintes bactérias: *Bacillus subtilis* [Palva et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582; EP-A-0 036 259 e EP-A-0 063 953; WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake et al. (1981) *Nature* 292:128; Amann et al. (1985) *Gene* 40:183; Studier et al. (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 e EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powell et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655]; *Streptococcus lividans* [Powell et al. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655], *Streptomyces lividans* [patente

US 4,745,056]. Os métodos de introdução de ADN exógeno em hospedeiros bacterianos são bem conhecidos na técnica, e incluem geralmente a transformação de bactérias tratadas com CaCl₂ ou outros agentes, tais como catiões bivalentes e DMSO. O ADN pode ser também introduzido em células bacterianas por eletroporação. Os procedimentos de transformação variam geralmente com a espécie bacteriana a ser transformada. Ver, por exemplo, [Masson et al. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Palva et al. (1982) Proc. Natal. Acad. Sci. USA 79:5582; EP-A-0 036 259 e EP-A-0 063 953; WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang et al. (1990) J. Bacteriol. 172:949, *Campylobacter*], [Cohen et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H.W. Boyer e S. Nicosia); Mandel et al. (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taceto (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*], [Chassy et al. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173 *Lactobacillus*]; [Fiedler et al. (1988) Anal. Biochem 170:38, *Pseudomonas*]; [Augustin et al. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203, *Staphylococcus*], [Barany et al. (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by eletroporation, in: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti e R. Curtiss III); Perry et al. (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti et al. (1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1:412, *Streptococcus*].

v. Expressão em Levedura

Sistemas de expressão em levedura são também conhecidos para um especialista com conhecimentos médios na matéria. Um promotor de levedura é qualquer sequência de ADN capaz de ligar a polimerase de ARN de levedura e iniciar a transcrição a jusante (3') de uma sequência codificante (por exemplo, gene estrutural) em ARNm. Um promotor terá uma região de início da transcrição que é geralmente colocada proximal à extremidade 5' da sequência codificante. Esta região de início da transcrição inclui geralmente um sítio de ligação de polimerase de ARN (a "Caixa TATA") e um sítio de início da transcrição. Um promotor de levedura pode ter também um segundo domínio denominado sequência ativadora a montante (UAS), o qual, se estiver presente, está geralmente distal em relação ao gene estrutural. A UAS permite expressão regulada (induzível). A expressão constitutiva ocorre na ausência de uma UAS. A expressão regulada pode ser positiva ou negativa, aumentando ou reduzindo desse modo a transcrição.

A levedura é um organismo de fermentação com uma via metabólica ativa, por conseguinte as sequências que codificam as enzimas da via metabólica proporcionam sequências promotoras particularmente úteis. Os exemplos incluem álcool-desidrogenase (ADH) (EP-A-0 284 044), enolase, glucocinase, glucose-6-fosfato-isomerase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAP ou GAPDH), hexocinase, fosfofructocinase, 3-fosfoglicerato-mutase e piruvato-cinase (PyK) (EPO-A-0 329 203). O gene da levedura *PHO5*, que codifica a fosfatase ácida, também proporciona sequências promotoras úteis [Myanohara et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1].

Além disso, os promotores sintéticos que não ocorrem na natureza também atuam como promotores de levedura. Por exemplo, as sequências UAS de um promotor de levedura podem ser unidas com a região de ativação da transcrição de outro promotor de levedura, gerando um promotor híbrido sintético. Os exemplos de tais promotores híbridos incluem a sequência reguladora de ADH ligada à região de ativação da transcrição de GAP (Patente US N.º 4,876,197 e 4,880,734). Outros exemplos de promotores híbridos incluem promotores que consistem das sequências reguladoras dos genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10* ou *PHO5*, combinadas com a região de ativação da transcrição de um gene de uma enzima glicolítica tal como GAP ou PyK (EP-A-0 164 556). Além disso, um promotor de levedura pode incluir promotores naturais de origem diferente de levedura que têm a aptidão para ligar a polimerase de ARN de leveduras e iniciar a transcrição. Os exemplos de tais promotores incluem, *inter alia*, [Cohen et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1078; Henikoff et al. (1981) Nature 283:835; Hollenberg et al. (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:119; Hollenberg et al. (1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*," in: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (eds. K.N. Timmis e A. Puhler); Mercerau-Puigalon et al. (1980) Gene 11:163; Panthier et al. (1980) Curr. Genet. 2:109;].

Uma molécula de ADN pode ser expressa intracelularmente em levedura. Uma sequência promotora pode ser ligada diretamente à molécula de ADN, em cujo caso o primeiro aminoácido na extremidade N-terminal da proteína recombinante será sempre uma metionina, a qual é codificada pelo codão de iniciação ATG. Se desejado, a metionina na extremidade N-terminal pode ser dissociada da proteína por incubação *in vitro* com brometo de cianogénio.

As proteínas de fusão proporcionam uma alternativa para os sistemas de expressão de levedura, bem como nos sistemas de expressão de mamíferos, baculovírus e bacterianos. Em geral, uma sequência de ADN que codifica a porção N-terminal de uma proteína de levedura endógena, ou outra proteína estável, é fundida com a extremidade 5' de sequências codificantes heterólogas. Após expressão, esta construção proporcionará uma fusão das duas sequências de aminoácidos. Por exemplo, o gene da superóxido dismutase (SOD) de levedura ou humana, pode ser ligado na extremidade 5' de um gene estranho e expresso em levedura. A sequência de ADN na junção das duas sequências de aminoácidos pode, ou não, codificar um sítio dissociável. Ver, por exemplo, EP-A-0 196 056. Outro exemplo é uma proteína de fusão de ubiquitina. Uma tal proteína de fusão é feita com a região de ubiquitina que retém preferencialmente um sítio para uma enzima de processamento (por exemplo, protéase de processamento específica de ubiquitina) para dissociar a ubiquitina da proteína estranha. Por conseguinte, através deste método pode isolar-se a proteína estranha nativa (por exemplo, WO88/024066).

Alternativamente, as proteínas estranhas podem ser também segregadas a partir da célula para o meio de crescimento gerando moléculas de ADN quiméricas que codificam uma proteína de fusão constituída por um fragmento de sequência líder que proporciona a secreção da proteína estranha em levedura. Preferencialmente, existem sítios de processamento codificados entre o fragmento líder e o gene estranho que podem ser dissociados *in vivo* ou *in vitro*. O fragmento de sequência líder codifica geralmente um péptido sinal constituído por aminoácidos hidrófobos que coordenam a secreção da proteína a partir da célula. O ADN que codifica sequências sinal adequadas pode ser derivado de

genes para proteínas de levedura segregadas, tais como o gene da invertase de levedura (EP-A-0 012 873; JPO. 62,096,086) e o gene do fator A (patente US 4,588,684). Alternativamente, existem líderes de origem diferente de leveduras, tal como um interferão líder, que também proporcionam secreção em leveduras (EP-A-0 060 057).

Uma classe preferida de líderes de secreção são aquelas que utilizam um fragmento do gene do fator alfa de levedura, o qual contém uma sequência sinal "pré", e uma região "pró". Os tipos de fragmentos de fator alfa que podem ser utilizados incluem a líder do fator alfa pré-pré inteira (cerca de 83 resíduos de aminoácidos) bem como líderes do fator alfa truncadas (geralmente cerca de 25 a cerca de 50 resíduos de aminoácidos) (Patentes US 4,546,083 e 4,870,008; EP-A-0 324 274). Os líderes adicionais que utilizam um fragmento líder do fator alfa que proporciona secreção incluem líderes do fator alfa híbridos preparados com uma pré-sequência de uma primeira levedura, mas uma pró-região de um segundo fator alfa de levedura. (por exemplo, ver WO 89/02463.)

Em geral, as sequências de terminação da transcrição reconhecidas pela levedura são regiões reguladoras localizadas 3' em relação ao codão de paragem da tradução e, desse modo, em conjunto com o promotor flanqueiam a sequência codificante. Estas sequências coordenam a transcrição de um ARNm que pode ser traduzido no polipeptídeo codificado pelo ADN. Os exemplos da sequência de terminação da transcrição e outras sequências de terminação reconhecidas por leveduras, tais como aquelas que codificam enzimas glicolíticas.

Em geral, os componentes descritos acima, compreendendo um promotor, líder (se desejado), sequência codificante de

interesse e sequência de terminação da transcrição, são colocados em conjunto em construções de expressão. As construções de expressão são frequentemente mantidas num replicão, tal como um elemento extracromossómico (por exemplo, plasmídeos) capaz de manutenção estável num hospedeiro, tal como levedura ou bactérias. O replicão pode ter dois sistemas de replicação, permitindo assim que a sua expressão seja mantida, por exemplo, em levedura para expressão e num hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. Os exemplos de tais vetores transportadores levedura-bactérias incluem o YEp24 [Botstein et al. (1979) Gene 8:17-24], pCl/1 [Brake et al. (1984) PNAS USA 81:4642-4646] e YRp17 [Stinchcomb et al. (1982) J. Mol. Biol. 158:157]. Além disso, um replicão pode ser um plasmídeo com um número de cópias alto ou baixo. Um plasmídeo com um número de cópias alto terá geralmente um número de cópias que varia desde cerca de 5 a cerca de 200, e geralmente cerca de 10 a cerca de 150. Um hospedeiro contendo um plasmídeo com um número de cópias alto terá preferencialmente pelo menos cerca de 10, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 20. Pode ser selecionada a introdução de um vetor com um número de cópias alto ou baixo, dependendo do efeito do vetor e a proteína estranha no hospedeiro. Ver por exemplo, Brake et al., *supra*.

Alternativamente, as construções de expressão podem ser integradas no genoma de levedura com um vetor de integração. Os vetores de integração contêm geralmente pelo menos uma sequência homóloga a um cromossoma de levedura que permite que o vetor se integre, e preferencialmente contêm duas sequências homólogas que flanqueiam a construção de expressão. As integrações parecem resultar de recombinações entre o ADN homólogo no vetor e o cromossoma da levedura [Orr-Weaver et al. (1983) Methods in Enzymol.

101:228-245]. Um vetor de integração pode ser dirigido para um lócus específico na levedura selecionando a sequência homóloga apropriada para inclusão no vetor. Ver Orr-Weaver et al., *supra*. Uma ou mais construções de expressão podem integrar, possivelmente afetar os níveis de proteína recombinante produzidos [Rine et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6750]. As sequências cromossómicas incluídas no vetor podem ocorrer como um único segmento no vetor, o que resulta na integração de todo o vetor, ou em dois segmentos homólogos a segmentos adjacentes no cromossoma e que flanqueiam a construção de expressão no vetor, o que pode resultar na integração estável apenas da construção de expressão. Em geral, as construções de expressão extracromossómica e de integração podem conter marcadores selecionáveis para permitir a seleção de estirpes de levedura que foram transformadas. Os marcadores selecionáveis podem incluir genes biossintéticos que podem ser expressos no hospedeiro de levedura, tais como *ADE2*, *HIS4*, *LEU2*, *TRP1* e *ALG7*, e o gene de resistência a G418, os quais conferem resistência das células de levedura à tunicamicina e G418, respectivamente. Além disso, um marcador selecionável adequado pode também proporcionar uma levedura com a capacidade para crescer na presença de compostos tóxicos, tais como metais. Por exemplo, a presença de *CUP1* permite que a levedura cresça na presença de iões cobre [Butt et al. (1987) Microbiol. Rev. 51:351].

Alternativamente, alguns dos componentes descritos acima podem ser colocados em conjunto em vetores de transformação. Os vetores de transformação são geralmente constituídos por um marcador selecionável que é mantido num replicão ou desenvolvido num vetor de integração, como descrito acima.

Foram desenvolvidos vetores de expressão e transformação, quer replicões extracromossómicos ou vetores de integração, para transformação em muitas leveduras. Por exemplo, foram desenvolvidos vetores de expressão para, *inter alia*, as seguintes leveduras: *Candida albicans* [Kurtz, et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142], *Candida maltosa* [Kunze, et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141]. *Hansenula polymorpha* [Gleeson, et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302], *Kluyveromyces fragilis* [Das, et al. (1984) J. Bacteriol. 158:1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154:737; Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8:135], *Pichia guillerimondii* [Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141], *Pichia pastoris* [Cregg, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376; US Patent Nos. 4,837,148 and 4,929,555], *Saccharomyces cerevisiae* [Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153:163], *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse (1981) Nature 300:706] e *Yarrowia lipolytica* [Davidow, et al. (1985) Curr. Genet. 10:380471 Gaillardin, et al. (1985) Curr. Genet. 10:49]. Os métodos de introdução de ADN exógeno em hospedeiros de levedura são bem conhecidos na técnica, e incluem geralmente a transformação de esferoplastos ou de células de levedura intactas tratadas com catiões alcalinos. Os procedimentos de transformação variam geralmente com a espécie de levedura a ser transformada. Ver, por exemplo, [Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; Candida]; [Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp et al., (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302; Hansenula]; [Das et al. (1984) J. Bacteriol. 158:1165; De Louvencourt et al. (1983) J. Bacterial. 154:1165; Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8:135; Kluyveromyces]; [Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376; Kunze et al. (1985) J. Basic

Microbiol. 25:141; US Patent Nos. 4,837,148 and 4,929,555; Pichia]; [Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito et al. (1983) J. Bacterial. 153:163 Saccharomyces]; [Beach and Nurse (1981) Nature 300:706; Schizosaccharomyces]; [Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10:39; Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10:49; Yarrowia].

Anticorpos

Como aqui utilizado, o termo "anticorpo" refere-se a um polipéptido ou grupo de polipéptidos constituído por pelo menos um sítio de combinação de anticorpo. Um "sítio de combinação de anticorpo" é o espaço de ligação tridimensional com uma forma de superfície interna e distribuição de carga complementar às características de um epítopo de um antigénio, o qual permite uma ligação do anticorpo com o antigénio. O "anticorpo" inclui, por exemplo, anticorpos de vertebrados, anticorpos híbridos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos alterados, anticorpos univalentes, proteínas Fab e anticorpos de domínio único.

Os anticorpos contra as proteínas da invenção são úteis para cromatografia de afinidade, imunoensaios e para distinguir/identificar proteínas meningocócicas.

Os anticorpos para as proteínas da invenção, tanto policlonais como monoclonais, podem ser preparados por métodos convencionais. Em geral, a proteína é primeiro utilizada para imunizar um animal adequado, preferencialmente um rato, ratazana, coelho ou cabra. Os coelhos e cabras são preferidos para a preparação de soros policlonais devido ao volume de soro que pode ser obtido e à disponibilidade de anticorpos anti-coelho e anti-cabra

marcados. A imunização é geralmente realizada misturando ou emulsionando a proteína em soro fisiológico, preferencialmente num adjuvante tal como adjuvante completo de Freund, e injetando a mistura ou emulsão por via parentérica (geralmente por via subcutânea ou por via intramuscular). Uma dose de 50-200 g/injeção é tipicamente suficiente. A imunização é geralmente reforçada 2-6 semanas depois com uma ou mais injeções da proteína em soro fisiológico, utilizando preferencialmente um adjuvante incompleto de Freund. Alternativamente, pode gerar-se anticorpos por imunização *in vitro* utilizando métodos conhecidos na técnica, os quais para os fins desta invenção são considerados equivalentes à imunização *in vivo*. Os antissoros policlonais são obtidos por sangramento do animal imunizado para um recipiente de vidro ou plástico, incubação do sangue a 25 °C durante uma hora, seguida de incubação a 4 °C durante 2-18 horas. O soro é recuperado por centrifugação (por exemplo, 1 000 g durante 10 minutos). Pode obter-se cerca de 20-50 mL por sangramento a partir de coelhos.

Os anticorpos monoclonais são preparados utilizando o método convencional de Kohler & Milstein [Nature (1975) 256:495-96], ou uma modificação do mesmo. Tipicamente, um rato ou ratazana é imunizado como descrito acima. No entanto, em vez de se sangrar o animal para extrair o soro, o baço (e opcionalmente vários gânglios linfáticos grandes) é removido e dissociado em células únicas. Se desejado, as células de baço podem ser triadas (após remoção de células aderentes não específicas) aplicando uma suspensão de células a uma placa ou poço revestido com o抗ígenio proteico. As células B que expressam imunoglobulina ligada à membrana específica para o抗ígenio ligam-se à placa, e não são arrastadas por lavagem com o resto da suspensão. As células B resultantes, ou todas as células de baço

dissociadas, são então induzidas a fundir com células de mieloma para formar hibridomas, e são cultivadas num meio seletivo (por exemplo, meio de hipoxantina, aminopterina, timidina, "HAT"). Os hibridomas resultantes são aplicados por diluição limitante e são analisados quanto à produção de anticorpos que se ligam especificamente ao抗原 de imunização (e que não se ligam a抗原s não relacionados). Os hibridomas segregadores de MAb selecionados são em seguida cultivados *in vitro* (por exemplo, em frascos de cultura de tecido ou reatores de fibras ocas) ou *in vivo* (como ascite em ratos).

Se desejado, os anticorpos (quer policlonais ou monoclonais) podem ser marcados utilizando técnicas convencionais. Os marcadores adequados incluem fluoróforos, cromóforos, átomos radioativos (particularmente ^{32}P e ^{115}I), reagentes densos em eletrões, enzimas, e ligandos possuindo parceiros de ligação específicos. As enzimas são tipicamente detetadas pela sua atividade. Por exemplo, a peroxidase de rábano-silvestre é geralmente detetada pela sua aptidão para converter a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) num pigmento azul, quantificável com um espetrofotómetro. "Parceiro de ligação específico" refere-se a uma proteína capaz de ligar uma molécula de ligando com alta especificidade, como, por exemplo, no caso de um抗原 e um anticorpo monoclonal específico para esse fim. Outros parceiros de ligação específicos incluem biotina e avidina ou estreptavidina, IgG e proteína A, e os numerosos pares receptor-ligando conhecidos na técnica. Deve ser entendido que a descrição acima não pretende classificar os vários marcadores em classes distintas, já que o mesmo marcador pode servir em vários modos diferentes. Por exemplo, o ^{125}I pode servir como um marcador radioativo ou como um reagente denso de eletrões. A HRP pode servir como enzima ou como抗原 para um MAb. Além

disso, pode combinar-se vários marcadores para o efeito desejado. Por exemplo, os MAbs e a avidina também requerem marcadores na prática desta invenção: assim, pode marcar-se um MAb com biotina, e detetar a sua presença com avidina marcada com ^{125}I ou com um MAb anti-biotina marcado com HRP. Outras permutações e possibilidades serão imediatamente evidentes para os especialistas com conhecimentos médios na matéria e são consideradas como equivalentes no âmbito da invenção.

Composições Farmacêuticas

As composições farmacêuticas podem compreender polipéptidos ou anticorpos da invenção. As composições farmacêuticas compreenderão uma quantidade terapeuticamente eficaz de polipéptidos ou anticorpos da invenção reivindicada.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" como aqui utilizado refere-se a uma quantidade de um agente terapêutico para tratar, melhorar ou prevenir uma doença ou condição desejada, ou para exibir um efeito terapêutico ou preventivo detetável. O efeito pode ser detetado, por exemplo, por marcadores químicos ou níveis de抗原. Os efeitos terapêuticos incluem também uma redução nos sintomas físicos, tais como menor temperatura corporal. A quantidade eficaz exata para um indivíduo dependerá do tamanho e saúde do indivíduo, da natureza e extensão da condição, e da terapêutica ou associação de terapêuticas selecionada para administração. Assim, não é útil especificar uma quantidade eficaz exata antecipadamente. No entanto, a quantidade eficaz para uma determinada situação pode ser determinada por experimentação de rotina e está dentro da avaliação do clínico.

Para os fins da presente invenção, uma dose eficaz será desde cerca de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg ou 0,05 mg/kg a cerca de 10 mg/kg das construções de ADN no indivíduo ao qual é administrada.

Uma composição farmacêutica pode conter também um veículo farmaceuticamente aceitável. O termo "veículo farmaceuticamente aceitável" refere-se a um veículo para administração de um agente terapêutico, tal como os anticorpos ou um polipéptido, genes e outros agentes terapêuticos. O termo refere-se a qualquer veículo farmacêutico que não induza ele mesmo a produção de anticorpos prejudiciais ao indivíduo que recebe a composição, e que pode ser administrado sem toxicidade indevida. Os veículos adequados podem ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tais como proteínas, polissacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e partículas de vírus inactivos. Tais veículos são bem conhecidos dos especialistas com conhecimentos médios na matéria.

Ali podem ser utilizados sais farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo, sais de ácidos minerais tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos e semelhantes; e os sais de ácidos orgânicos tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos e semelhantes. Uma discussão aprofundada de excipientes farmaceuticamente aceitáveis está disponível em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Os veículos farmaceuticamente aceitáveis em composições terapêuticas podem conter líquidos tais como água, soro fisiológico, glicerol e etanol. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como humectantes ou emulsionantes,

substâncias tampão de pH, e semelhantes, podem estar presentes nesses veículos. Tipicamente, as composições terapêuticas são preparadas como formas injetáveis, quer como soluções ou suspensões líquidas; podem ser também preparadas formas sólidas adequadas para dissolução ou suspensão em veículos líquidos antes da injeção. Os lipossomas estão incluídos dentro da definição de um veículo farmaceuticamente aceitável.

Métodos de Administração

Uma vez formuladas, as composições podem ser administradas diretamente ao indivíduo. Os indivíduos a serem tratados podem ser animais; em particular, podem ser tratados indivíduos humanos.

A administração direta das composições será geralmente realizada por injeção, quer por via subcutânea, intraperitoneal, intravenosa ou intramuscular ou administradas no espaço intersticial de um tecido. As composições podem ser também administradas numa lesão. Outros modos de administração incluem a administração oral e pulmonar, supositórios, e aplicações transdérmicas ou transcutâneas (por exemplo, ver WO98/20734), agulhas, e pistolas de genes ou injectores de compressão. O regime de administração pode ser um plano de dose única ou um plano de múltiplas doses.

Vacinas

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

Tais vacinas compreendem antigénio(s) de imunização, imunogénio(s), polipéptido(s), proteína(s) ou ácido nucleico, geralmente em combinação com "veículos farmaceuticamente aceitáveis," os quais incluem qualquer veículo que não induza ele mesmo a produção de anticorpos prejudiciais ao indivíduo que recebe a composição. Os veículos adequados são tipicamente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tais como proteínas, polissacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tais como gotículas de óleo ou lipossomas) e partículas de vírus inactivos. Tais veículos são bem conhecidos dos especialistas com conhecimentos médios na matéria. Adicionalmente, estes veículos podem atuar como agentes imunoestimulantes ("adjuvantes"). Além disso, o antigénio ou imunogénio pode ser conjugado com um toxoide bacteriano, tal como um toxoide de difteria, tétano, cólera, *H. pylori*, etc., agentes patogénicos.

Os adjuvantes preferidos para melhorar a eficácia da composição incluem, mas não se limitam a: (1) sais de alumínio (alúmen), tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, etc; (2) formulações de emulsões de óleo em água (com ou sem outros agentes imunoestimulantes específicos tais como péptidos de muramilo (ver abaixo) ou componentes da parede celular bacteriana), tais como, por exemplo, (a) MF59™ (WO 90/14837; Capítulo 10 in Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), contendo 5% de Esqualeno, 0,5% de Tween 80 e 0,5% de Span 85 (contendo opcionalmente várias quantidades de MTP-PE (ver abaixo), embora não seja necessário) formulados em partículas submicrométricas utilizando um microfluidificador tal como o microfluidificador Modelo

110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, contendo 10% de Esqualano, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero bloqueado com plurônico L121 e thr-MDP (ver abaixo) microfluidizado numa emulsão submicrométrica ou agitado em vórtice para gerar uma emulsão com um tamanho de partícula maior, e (c) sistema adjuvante Ribi™ (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) contendo 2% de Esqualeno, 0,2% de Tween 80 e um ou mais componentes da parede celular bacteriana do grupo que consiste em monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trealose (TDM) e esqueleto da parede celular (CWS), preferencialmente - MPL + CWS (Detox™); (3) podem ser utilizados adjuvantes de saponina, tais como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) ou partículas geradas a partir destes tais como ISCOMs (complexos imunoestimulantes); (4) Adjuvante completo de Freund (CFA) e Adjuvante incompleto de Freund (IFA); (5) citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferões (por exemplo, gama interferão), fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), etc; e (6) outras substâncias que atuam como agentes imunoestimulantes para melhorar a eficácia da composição. O alúmen e o MF59™ são preferidos.

Como mencionados acima, os péptidos de muramilo incluem, mas não se limitam a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc. As composições imunogénicas (por exemplo, o antigénio de imunização /imunogénio/polipeptídeo/proteína/ácido nucleico, veículo farmaceuticamente aceitável e adjuvante) conterão tipicamente diluentes, tais como água, soro fisiológico,

glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como humectantes ou emulsionantes, substâncias tampão de pH e semelhantes, podem estar presentes em tais veículos.

Tipicamente, as composições imunogénicas são preparadas como injetáveis, quer como soluções ou suspensões líquidas; podem ser também preparadas formas sólidas adequadas para dissolução ou suspensão em veículos líquidos antes da injeção. A preparação pode ser também emulsionada ou encapsulada em lipossomas para um melhor efeito adjuvante, como discutido acima sob veículos farmaceuticamente aceitáveis.

As composições imunogénicas utilizadas como vacinas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz do antigénico ou polipéptidos imunogénicos, bem como qualquer outro dos componentes supramencionados, consoante necessário. Por "quantidade imunologicamente eficaz", entende-se que a administração dessa quantidade a um indivíduo, numa dose única ou como parte de uma série, é eficaz para tratamento ou prevenção. Esta quantidade varia dependendo da saúde e condição física do indivíduo a ser tratado, do grupo taxonómico do indivíduo a ser tratado (por exemplo, primata não humano, primata, etc.), a capacidade do sistema imunitário do indivíduo para sintetizar anticorpos, o grau de proteção desejado, a formulação da vacina, a avaliação da situação médica pelo médico assistente e outros fatores relevantes. Prevê-se que a quantidade cairá numa gama relativamente larga que pode ser determinada através de ensaios de rotina.

As composições imunogénicas são convencionalmente administradas por via parentérica, por exemplo, por injeção, quer por via subcutânea, intramuscular ou

transdérmica/transcutânea (por exemplo, WO98/20734). As formulações adicionais adequadas para outros modos de administração incluem formulações orais e pulmonares, supositórios e aplicações transdérmicas. O regime de administração pode ser um plano de dose única ou um plano múltiplas doses. A vacina pode ser administrada em conjunto com outros agentes imunorreguladores.

Como uma alternativa às vacinas à base de proteínas, pode utilizar-se vacinação com ADN [por exemplo, Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunology 9:271-283; Donnelly et al. (1997) Annu Rev Immunol 15:617-648; ver mais à frente].

Composições farmacêuticas de polipéptidos

Além dos veículos e sais farmaceuticamente aceitáveis descritos acima, os seguintes agentes adicionais podem ser utilizados com as composições de polinucleótidos e/ou polipéptidos.

A. Polipéptidos

Um exemplo são polipéptidos que incluem, sem limitação: asialo-orosumicoide (ASOR); transferrina; asialo-glicoproteínas; anticorpos; fragmentos de anticorpos; ferritina; interleucinas; interferões, fator de estimulação de colónias de granulócitos, macrófagos (GM-CSF), fator de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF), fator de estimulação de colónias de macrófagos (M-CSF), fator de células estaminais e eritropoietina. Podem ser também utilizados抗原性virais, tais como proteínas do envelope. Também, proteínas de outros organismos invasivos, tais como o péptido de 17 aminoácidos da proteína circunsporozoito de plasmodium falciparum conhecida como RII.

B.Hormonas, Vitaminas, etc.

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

C.Polialquilenos, Polissacáridos, etc.

Pode ser também incluído polialquíleno glicol com os polinucleótidos/polipéptidos desejados. Numa forma de realização preferida, o polialquíleno glicol é polietileno glicol. Além disso, podem ser incluídos mono-, di- ou polissacáridos. Numa forma de realização preferida deste aspetto, o polissacárido é dextrano ou DEAE-dextrano. Também, quitosano e poli(lactídeo-co-glicolídeo)

D.Lípidos e Lipossomas

O polinucleótido/polipéptido desejado pode ser também encapsulado em lípidos ou embalado em lipossomas antes da administração ao indivíduo ou a células provenientes deste.

O encapsulamento em lípidos é geralmente realizado utilizando lipossomas que são capazes de ligar ou reter de forma estável o ácido nucleico. A proporção de polinucleótido condensado para preparação de lípidos pode variar mas será geralmente em torno de 1:1 (mg de ADN:micromoles de lípido) ou mais de lípido. Para uma revisão da utilização de lipossomas como veículos para administração de ácidos nucleicos, ver, Hug e Sleight (1991) Biochim. Biophys. Acta. 1097:1-17; Straubinger (1983) Meth. Enzymol. 101:512-527.

As preparações lipossómicas para serem utilizadas na presente invenção incluem preparações catiónicas (carregadas positivamente), aniónicas (carregadas negativamente) e neutras. Foi demonstrado que os lipossomas catiónicos medeiam a administração intracelular de ADN de plasmídeo (Felgner (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7416); ARNm (Malone (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6077-6081); e fatores de transcrição purificados (Debs (1990) J. Biol. Chem. 265:10189-10192), na forma funcional.

Os lipossomas catiónicos estão prontamente disponíveis. Por exemplo, os lipossomas de N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamónio (DOTMA) estão disponíveis sob a marca comercial Lipofectin, da GIBCO BRL, Grand Island, NY. (ver, também, Felgner *supra*). Outros lipossomas comercialmente disponíveis incluem transfectace (DDAB/DOPE) e DOTAP/DOPE (Boerhinger). Outros lipossomas catiónicos podem ser preparados a partir de materiais prontamente disponíveis utilizando técnicas bem conhecidas na matéria. Ver, por exemplo, Szoka (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4194-4198; WO90/11092 para uma descrição da síntese de lipossomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilammonio)propano).

De forma semelhante, os lipossomas aniónicos e neutros estão prontamente disponíveis, tal como da Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), ou podem ser facilmente preparados utilizando materiais prontamente disponíveis. Tais materiais incluem fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoifosfatidilcolina (DOPC), dioleoifosfatidilglicerol (DOPG), dioleoifosfatidiletanolamina (DOPE), entre outros. Estes materiais podem ser também misturados com os materiais de partida DOTMA e DOTAP em proporções apropriadas. Os métodos de preparação de

lipossomas utilizando estes materiais são bem conhecidos na técnica.

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

E.Lipoproteínas

Além disso, as lipoproteínas podem ser incluídas com o polinucleótido/polipéptido a ser administrado. Os exemplos de lipoproteínas a serem utilizadas incluem: quilomicrões, HDL, IDL, LDL e VLDL. Podem ser também utilizados mutantes, fragmentos ou fusões destas proteínas. Podem ser também utilizadas modificações de lipoproteínas naturais, tais como o LDL acetilado. Estas lipoproteínas podem direcionar a administração de polinucleótidos para células que expressam receptores de lipoproteínas. Preferencialmente, se as lipoproteínas estiverem incluídas com o polinucleótido a ser administrado, não é incluído outro ligando de direcionamento na composição.

As lipoproteínas naturais compreendem um lípido e uma porção de proteína. As porções de proteínas são conhecidas como apoproteínas. Atualmente, foram isoladas e identificadas as apoproteínas A, B, C, D e E. Pelo menos duas destas contêm várias proteínas, designadas pelos algarismos Romanos, AI, AII, AIV; CI, CII, CIII.

Uma lipoproteína pode compreender mais do que uma apoproteína. Por exemplo, os quilomicrões naturais compreendem A, B, C e E, ao longo do tempo estas lipoproteínas perdem A e adquirem as apoproteínas C e E. A VLDL compreende as apoproteínas A, B, C e E, a LDL compreende a apoproteína B; e a HDL compreende as apoproteínas A, C e E.

Os aminoácidos destas apoproteínas são conhecidos e são descritos em, por exemplo, Breslow (1985) Annu Rev. Biochem 54:699; Law (1986) Adv. Exp Med. Biol. 151:162; Chen (1986) J Biol Chem 261:12918; Kane (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:2465; e Utermann (1984) Hum Genet 65:232.

As lipoproteínas contêm uma variedade de lípidos incluindo, triglicéridos, colesterol (livre e ésteres) e fosfolípidos. A composição dos lípidos varia em termos de lipoproteínas naturais. Por exemplo, os quilomicrões compreendem principalmente triglicéridos. Uma descrição mais detalhada do conteúdo de lípidos de lipoproteínas naturais pode ser encontrada, por exemplo, em Meth. Enzymol. 128 (1986). A composição dos lípidos é escolhida para ajudar na conformação da apoproteína para atividade de ligação ao recetor. A composição de lípidos pode ser também escolhida para facilitar a interação hidrófoba e associação com a molécula de ligação do polinucleótido.

As lipoproteínas naturais podem ser isoladas, por exemplo, a partir de soro por ultracentrifugação. Tais métodos são descritos em *Meth. Enzymol. (supra)*; Pitas (1980) *J. Biochem.* 255:5454-5460 e Mahey (1979) *J Clin. Invest.* 64:743-750. As lipoproteínas podem ser também produzidas por métodos *in vitro* ou recombinantes por expressão dos genes de apoproteína numa célula hospedeira desejada. Ver, por exemplo, Atkinson (1986) *Annu Rev Biophys Chem* 15:403 e Radding (1958) *Biochim Biophys Acta* 30: 443. As lipoproteínas podem ser também adquiridas de fornecedores comerciais, tais como Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, EUA. Uma descrição adicional de lipoproteínas pode ser encontrada em Zuckermann et al. WO98/06437..

F. Agentes Policatiónicos

Podem ser incluídos agentes policatiónicos, com ou sem lipoproteína, numa composição com o polinucleótido/polipéptido desejado a ser administrado.

Os agentes policatiónicos exibem, tipicamente, uma carga líquida positiva ao pH fisiológico relevante e são capazes de neutralizar a carga elétrica de ácidos nucleicos para facilitar a administração numa localização desejada. Estes agentes têm aplicações *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Os agentes policatiónicos podem ser utilizados para administrar ácidos nucleicos a um indivíduo vivo por via intramuscular, por via subcutânea, etc.

Os que se seguem são exemplos de polipéptidos úteis como agentes policatiónicos: polilisina, poliarginina, poliornitina e protamina. Outros exemplos incluem histonas, protaminas, albumina de soro humano, proteínas de ligação a ADN, proteínas cromossómicas não histona, proteínas de

revestimento de vírus de ADN, tais como (X174, os fatores de transcrição contêm também domínios que ligam o ADN e, por conseguinte, podem ser úteis como agentes de condensação de ácidos nucleicos. Resumidamente, os fatores de transcrição tais como C/CEBP, c-jun, c-fos, AP-1, AP-2, AP-3, CPF, Prot-1, Sp-1, Oct-1, Oct-2, CREP e TFIID contêm domínios básicos que ligam sequências de ADN.

Os agentes policationícios orgânicos incluem: espermina, espermidina e putrescina.

As dimensões e as propriedades físicas de um agente policationíco podem ser extrapoladas a partir da lista acima, para construir outros agentes policationícios polipeptídicos ou para produzir agentes policationícios sintéticos.

Os agentes policationícios sintéticos que são úteis incluem, por exemplo, DEAE-dextrano, polibreno. A Lipofectina e a LipofectAMINE™ são monómeros que formam complexos policationícios quando combinados com polinucleótidos/polipéptidos.

Ensaios de imunodiagnóstico

Os抗原os meningocócicos da invenção podem ser utilizados em imunoensaios para detetar níveis de anticorpos (ou, reciprocamente, os anticorpos anti-meningocóccico podem ser utilizados para detetar níveis de抗原). Imunoensaios com base em抗原os recombinantes, bem definidos podem ser desenvolvidos para substituir métodos de diagnóstico invasivos. Podem ser detetados anticorpos para proteínas meningocócicas nas amostras biológicas, incluindo por exemplo, amostras de sangue ou soro. A conceção dos imunoensaios está sujeita a

uma grande variação e uma variedade destas são conhecidas na técnica. Os protocolos para o imunoensaio podem basear-se, por exemplo, em competição, ou reação direta, ou em ensaios de tipo sanduíche. Os protocolos podem também, por exemplo, utilizar suportes sólidos, ou podem ser por imunoprecipitação. A maioria dos ensaios envolve a utilização de anticorpos ou polipeptídos marcados; os marcadores podem ser, por exemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminescentes, radioativas ou corantes. Ensaios que amplificam os sinais da sonda são também conhecidos; cujos exemplos são ensaios que utilizam biotina e avidina, e imunoensaios marcados e mediados por enzimas, tais como ensaios ELISA.

Os kits adequados para imunodiagnóstico e que contêm os reagentes marcados apropriados são construídos empacotando os materiais apropriados, incluindo as composições da invenção, em recipientes adequados, juntamente com os restantes reagentes e materiais (por exemplo, tampões, soluções salinas, etc. adequados) necessários para a realização do ensaio, bem como conjuntos adequados de instruções de ensaio.

MODOS PARA REALIZAR A INVENÇÃO

A sequência de proteína da 936-1 divulgado nos Pedidos Internacionais foi, *inter alia*, submetida a análise por computador para prever fragmentos de péptidos antigénicos dentro das proteínas de comprimento total. Foram utilizados três algoritmos nesta análise:

- **AMPHI** Este programa foi utilizado para prever epítópos de células T [Gao et al. (1989) J. Immunol. 143:3007; Roberts et al. (1996) AIDS Res Hum Retrovir 12:593; Quakyi

et al. (1992) Scand J Immunol suppl.11:9] e encontra-se disponível no pacote Protean da DNASTAR, Inc. (1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715 EUA).

- **ÍNDICE ANTIGÉNICO** como divulgado por Jameson & Wolf (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. CABIOS, 4:181:186
- **HIDROFILICIDADE** como divulgado por Hopp & Woods (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. PNAS, 78:3824-3828

Os três algoritmos identificam frequentemente os mesmos fragmentos. Tais fragmentos multiplamente identificados são particularmente preferidos. Os algoritmos identificam frequentemente fragmentos sobrepostos

Fragmentos da Proteína Antigénica Preferidos

As seguintes sequências de aminoácidos na Tabela 1 são identificadas por títulos que indicam o número atribuído à grelha de leitura aberta (ORF) particular, coerentes com aqueles designados no Pedidos Internacionais. Os títulos são da seguinte forma: [sem prefixo] [#], onde "sem prefixo" significa uma sequência de *N. meningitidis* serótipo B; e "#" significa o número atribuído a essa grelha de leitura aberta (ORF). Por exemplo, "936" refere-se a uma sequência de aminoácidos de *N.meningitidis B*, da ORF número 936. A presença de um sufixo "-1" no título indica uma sequência adicional encontrada para essa ORF particular. Assim, "936-1" refere-se a uma sequência de aminoácidos de *N. meningitidis B*, da ORF número 936, a qual é outra sequência encontrada para a ORF 936 além da originalmente designada ORF 936. Cada sequência de

aminoácidos é precedida do número da posição de aminoácido inicial e seguida do número da posição de aminoácido final.

Tabela 1

936-1

Regiões AMPHI - AMPHI

112-

AlaGluGlyValTyrAsnTyrIleThrValAlaSerLeuProArgThrAlaGlyAspIleAlaGlyAsp-
134

Índice Antigénico - Jameson-Wolf

33-ValGlyAlaLysSerAlaValAspArgArgThrThrGlyAlaGlnThrAspAspAsnValMet-53
56-ArgIleGluThrThrAlaArgSerTyrLeuArgGlnAsnAsnGlnThrLysGlyTyr-74

124-LeuProArgThrAlaGlyAspIleAlaGlyAspThrTrpAsnThrserLysvalArgAla-143

Regiões Hidrófilas - Hopp-Woods

37-SerAlaValAspArgArgThrThrGlyAlaGlnThrAspAspAsnValMet-53

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L

<120> PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS DE NEISSERIA

<130> P055440EP

<140> EP

<141> 2000-10-30

<150> US 60/162616

<151> 1999-10-29

<160> 27

<170> SeqWin99, versão 1.02

<210> 1

<211> 202

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

Met	Lys	Pro	Lys	Pro	His	Thr	Val	Arg	Thr	Leu	Ile	Ala	Ala	Ile	Phe
1															15

Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Gly	Cys	Val	Ser	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Ala	Ala
				20				25							30

Val	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala	Val	Asp	Arg	Arg	Thr	Thr	Gly	Ala	Gln	Thr
				35			40								45

Asp	Asp	Asn	Val	Met	Ala	Leu	Arg	Ile	Glu	Thr	Thr	Ala	Arg	Ser	Tyr
				50			55								60

Leu	Arg	Gln	Asn	Asn	Gln	Thr	Lys	Gly	Tyr	Thr	Pro	Gln	Ile	Ser	Val
				65			70				75				80

Val	Gly	Tyr	Asn	Arg	His	Leu	Leu	Leu	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Glu	
				85				90							95

Gly	Glu	Lys	Gln	Phe	Val	Gly	Gln	Ile	Ala	Arg	Ser	Glu	Gln	Ala	Ala
				100			105								110

Glu	Gly	Val	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Ala
				115			120								125

Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Asp	Thr	Trp	Asn	Thr	Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Thr
				130			135								140

Leu	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Val	Lys	Ile	Val	Thr
				145			150				155				160

Tyr	Gly	Asn	Val	Thr	Tyr	Val	Met	Gly	Ile	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Gln
				165				170							175

Ala	Gln	Ile	Thr	Gln	Lys	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Gly	Val	Gln	Lys	Val
				180			185								190

Ile	Thr	Leu	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Val	Gln	Arg						

195		200													
-----	--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<210> 2

<211> 202

<212> PRT

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 2

Met	Lys	Pro	Lys	Pro	His	Thr	Val	Arg	Thr	Leu	Ile	Ala	Ala	Val	Leu
1										10					15

Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Gly	Cys	Phe	Ser	Ala	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Ala
										25				30	

Val	Gly	Ala	Lys	Ser	Val	Ile	Asp	Arg	Arg	Thr	Thr	Gly	Ala	Gln	Thr
										40				45	

Asp	Asp	Asn	Val	Met	Ala	Leu	Arg	Ile	Glu	Thr	Thr	Ala	Arg	Ser	Tyr
									55					60	

Leu	Arg	Gln	Asn	Asn	Gln	Thr	Lys	Gly	Tyr	Thr	Pro	Gln	Ile	Ser	Val
									75					80	

Val	Gly	Tyr	Asn	Arg	His	Leu	Leu	Leu	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Glu	
									90					95	

Gly	Glu	Lys	Gln	Phe	Val	Gly	Gln	Ile	Ala	Arg	Ser	Glu	Gln	Ala	Ala
								105					110		

Glu	Gly	Val	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Ala
								120					125		

Gly	Asp	Ile	Ala	Gly	Asp	Thr	Trp	Asn	Thr	Ser	Lys	Val	Arg	Ala	Thr
										140					

Leu	Leu	Gly	Ile	Ser	Pro	Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Val	Lys	Ile	Ile	Thr
								150				155		160	

Tyr	Gly	Asn	Val	Thr	Tyr	Val	Met	Gly	Ile	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Gln
								165		170		175			

Ala	Gln	Ile	Thr	Gln	Lys	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Gly	Val	Gln	Lys	Val
								180		185		190			

Ile	Thr	Leu	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Val	Gln	Arg
								195	200

<210> 3

<211> 128

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 3

Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val Arg Thr Leu Ile Ala Ala Ile Phe
 1 5 10 15

 Ser Leu Ala Leu Ser Gly Cys Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala
 20 25 30

 Val Gly Ala Lys Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
 35 40 45

 Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr
 50 55 60

 Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val
 65 70 75 80

 Val Gly Tyr Asn Arg His Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu
 85 90 95

 Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
 100 105 110

 Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala
 115 120 125

<210> 4

<211> 202

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 4

Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val Arg Thr Leu Thr Ala Ala Val Leu
 1 5 10 15

 Ser Leu Ala Leu Gly Gly Cys Val Ser Ala Val Val Gly Gly Ala Ala
 20 25 30

 Val Gly Ala Lys Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
 35 40 45

 Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr
 50 55 60

 Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val
 65 70 75 80

 Val Gly Tyr Asn Arg His Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu
 85 90 95

Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
 100 105 110
 Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala
 115 120 125
 Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr
 130 135 140
 Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr
 145 150 155 160
 Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln
 165 170 175
 Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val
 180 185 190
 Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr Val Gln Arg
 195 200

<210> 5

<211> 202

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 5

Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val Arg Thr Leu Ile Ala Ala Val Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Leu Gly Gly Cys Phe Ser Ala Val Val Gly Gly Ala Ala
 20 25 30

Val Gly Ala Lys Ser Val Ile Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
 35 40 45

Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr
 50 55 60

Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val
 65 70 75 80

Val Gly Tyr Asn Arg His Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu
 85 90 95

Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
 100 105 110

Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala
 115 120 125
 Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr
 130 135 140
 Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Ile Thr
 145 150 155 160
 Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln
 165 170 175
 Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val
 180 185 190
 Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr Val Gln Arg
 195 200

<210> 6

<211> 202

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 6

Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val Arg Thr Leu Thr Ala Ala Val Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Leu Gly Gly Cys Val Ser Ala Val Val Gly Gly Ala Ala
 20 25 30

Val Gly Ala Lys Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
 35 40 45

Asp Asp Asn Val Met Ala Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr
 50 55 60

Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val
 65 70 75 80

Val Gly Tyr Asn Arg His Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu
 85 90 95

Gly Glu Lys Gln Phe Val Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
 100 105 110

Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala
 115 120 125

Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr
 130 135 140

Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys Ile Val Thr
 145 150 155 160

Tyr Gly Asn Val Thr Tyr Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln
165 170 175

Ala Gln Ile Thr Gln Lys Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val
180 185 190

Ile Thr Leu Tyr Gln Asn Tyr Val Gln Arg
195 200

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 7

Thr Leu Ile Ala Ala Ile
1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 8

Gly Cys Val Ser Ala Val
1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 9

Gln Phe Val Gly Gln Ile
1 5

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 10

Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr
1 5 10 15

Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp
20

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 11

Met Lys Pro Lys Pro His Thr Val
1 5

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 12

Val Gly Ala Lys Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr
1 5 10 15

Asp Asp Asn Val Met
20

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 13

Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln Thr
1 5 10 15

Lys Gly Tyr

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 14

Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe
1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 15

Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
1 5

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 16

Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp Thr Trp Asn Thr Ser
1 5 10 15

Lys Val Arg Ala
20

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 17

Ser Pro Ala Thr Gln Ala Arg Val Lys
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 18
Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 19
Met Lys Pro Lys Pro His Thr
1 5

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 20
Ser Ala Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val
1 5 10 15
Met

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 21
Arg Ile Glu Thr Thr Ala
1 5

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 22
Asn Asn Gln Thr Lys Gly Tyr
1 5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 23
Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe
1 5

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 24
Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 25
Pro Arg Thr Ala Gly
1 5

<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 26

Thr His Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Ala Arg Gly Val Ala Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fragmento de proteína

<400> 27

Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile
1 5

Lisboa, 21 de Maio de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína compreendendo um ou mais fragmentos de SEQ ID NO: 2884 da WO99/51280 (MKPKFTVRTLIAAIFSLALSGCVSAVIG SAAVGAKSAVDRRTTGAQTDDNVMALRIETTARSILRQNNQTKGYTPQISVVGY NRHLLLLGQVATEGEKQFVGQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWN TSKVRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTYVMGILTPEEQAQITQKVSTTVGVQK VITLYQNYVQR), em que o(s) referido(s) fragmento(s):

- (a) compreendem pelo menos um determinante antigénico; e
- (b) compreendem uma sequência selecionada de:

112-AlaGluGlyValTyrAsnTyrIleThrValAlaSerLeuProArgThrAlaGlyAspIleAlaGlyAsp-134
33-ValGlyAlaLysSerAlaValAspArgArgThrThrGlyAlaGlnThrAspAspAsnValMet-53
56-ArgIleGluThrThrAlaArgSerTyrLeuArgGlnAsnAsnGlnThrLysGlyTyr-74
124-LeuProArgThrAlaGlyAspIleAlaGlyAspThrTrpAsnThrSerLysValArgAla-143
37-SerAlaValAspArgArgThrGlyAlaGlnThrAspAspAsnValMet-53

e em que a referida proteína não é as SEQ ID NOS: 2876, 2878, 2880, 2882, 2884 ou 2886 da WO99/57280.

2. Anticorpo que reconhece o fragmento como definido na reivindicação 1.

Lisboa, 21 de Maio de 2015