

(11) Número de Publicação: **PT 1534326 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/95 (2006.01) **A61P 37/04** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.09.01	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L. VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA SI	IT
(30) Prioridade(s): 2002.08.30 GB 0220194		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.06.01	(72) Inventor(es): MARIAGRAZIA PIZZA DAVIDE SERRUTO RINI RAPPUOLI	IT IT IT
(45) Data e BPI da concessão: 2007.07.04 102/2007	(74) Mandatário: FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE ATAYDE AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT	

(54) Epígrafe: **APERFEIÇOAMENTOS EM VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA BACTERIANAS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

EPÍGRAFE:	"APERFEIÇOAMENTOS EM VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA BACTERIANAS"
-----------	--

CAMPO TÉCNICO

Esta invenção refere-se ao campo da preparação de vesículas para fins de imunização.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Uma das várias tentativas para imunização contra a infecção da *N. meningitidis* é a utilização de vesículas de membranas externas (OMVs). O *Norwegian National Institute of Public Health* tem produzido (e.g. ref.1) uma vacina eficaz contra o serogrupo B, mas, embora esta vacina seja segura e evite a doença MenB, a sua eficácia é limitada à estirpe usada para produzir a vacina.

A vacina "RIVM" é baseada em vesículas contendo seis diferentes sub-tipos porA e tem demonstrado ser imunogénica em crianças em ensaios clínicos na fase II [2].

A referência 3 revela uma vacina contra diferentes serotipos patogénicos de meningococos do serogrupo B, baseado em OMVs que retêm um complexo de proteína de 65-kDa. A referência 4 revela uma vacina compreendendo OMVs de estirpes meningocócicas, geneticamente concebidas, com as OMVs compreendendo: pelo menos um proteína de membrana externa da Classe 1 (OMP), mas não compreendendo uma OMP de Classe 2/3. A referência 5 revela OMVs compreendendo OMPs que tem mutações

nos seus anéis de superfície e OMVs compreendendo derivados de lipopolissacárido meningocócico (LPS).

A referência 6 revela composições compreendendo OMVs suplementadas com proteínas de ligação à transferrina (e.g. TbpA e TbpB) e/ou Cu,Zn-superóxido dismutase. Referência 7 revela composições compreendendo OMVs suplementadas com várias proteínas. A referência 8 revela preparações das vesículas da membrana obtidas a partir de *N. meningitidis* com um gene modificado *fur*.

Assim como no serogrupo B da *N. meningitidis*, foram preparadas vesículas para outras bactérias. A referência 9 revela um processo para preparar vacinas baseadas em OMV para o serogrupo A de meningococos. As referências 10 e 11 revelam vesículas de *N. gonorrhoeae*. A referência 12 revela preparações de vesículas a partir de *N. lactamica*. Foram também preparadas vesículas a partir de *Moraxella catarrhalis* [13,14], *Shigella flexneri* [15,16], *Pseudomonas aeruginosa* [15,16], *Porphyromonads gingivalis* [17], *Treponema pallidum* [18], *Flaemophilus influenzae* [19 & 20] e *Helicobacter pylori* [21].

Uma desvantagem das preparações das vesículas bacterianas é que não estão presentes importantes antigénios protectores. Para reter antigénios tais como NspA em preparações OMV, a referência 20 revela que a expressão *nspA* deve ser supra-regulada com concomitante *porA* e separação de *cps*. É um objecto da invenção fornecer outras preparações de vesículas e melhoradas, ao mesmo tempo que processos para o seu fabrico. Em particular, é um objecto da invenção fornecer vesículas que retêm importantes componentes imunogénicos bacterianos a partir de *N. meningitidis*.

EXPOSIÇÃO DA INVENÇÃO

Os métodos da técnica anterior de preparação de OMV meningocócica envolvem o uso de detergente durante a disrupção da membrana bacteriana [e.g. ver a ref.22, em que é usado um detergente desoxicolado]. A invenção é baseada na descoberta surpreendente de que a disrupção da membrana, na ausência de detergente, resulta em OMVs que retêm importantes componentes imunogénicos bacterianos, particularmente (i) a proteína de superfície NspA protectora, (ii) a proteína "287", e (iii) a proteína "741".

Portanto, a invenção fornece um processo para o fabrico duma vesícula de membrana exterior a partir de uma bactéria, em que a membrana bacteriana é rompida substancialmente na ausência de detergente. As preparações de OMV são também obtidas pelos processos da invenção.

Para obter vesículas de NspA^{+ve}, o processo da invenção é muito mais simples do que a realização de múltiplas manipulações genéticas, como descrito na referência 20.

O processo da invenção envolverá tipicamente os seguintes passos básicos: a) tratamento de células bacterianas na ausência substancial de detergente; b) centrifugação da composição a partir do passo a) para separar as vesículas de membrana exterior, a partir de células tratadas e resíduos de células, e recolha do sobrenadante; c) realização de uma centrifugação a alta velocidade do sobrenadante a partir do passo b) e recolha das vesículas de membrana externa num pellet; d) redispersão do pellet a partir do passo c) num tampão; e) realização duma segunda centrifugação de alta velocidade, de acordo com o passo c), recolhendo as vesículas de membrana externa num pellet; f) redispersão do pellet a partir do passo e), num meio aquoso.

O processo pode também compreender os seguintes passos: g) realizar a filtração esterilizada através de, pelo menos, dois

filtros de diminuição da dimensão de poro da composição redispersada, a partir do passo f); e h) incluir, opcionalmente, a composição a partir do passo g) num veículo farmacêuticamente aceitável e/ou uma composição adjuvante.

O passo a) dá origem a vesículas da membrana exterior bacteriana, e as vesículas compreendem, geralmente, componentes de membrana externa substancialmente na sua forma nativa. Vantajosamente, são preservados os componentes NspA da membrana, "287" e "741".

O passo (b) envolverá, tipicamente, a centrifugação entre os 5000 - 10000 g durante mais duma hora.

Os passos (c) e (e) envolverão, tipicamente, a centrifugação entre os 35000 - 100000 g até 2 horas.

Os passos de centrifugação são preferivelmente realizados entre os 2°C e os 8°C.

Qualquer tampão adequado pode ser usado no passo (d), e.g., tampão Tris, tampão fosfato, tampão histidina, etc., O passo (f) pode também envolver o uso de um tampão que pode ser o mesmo tampão que o usado no passo (d), ou pode simplesmente envolver o uso de água (e.g. água para injeção).

O passo (g) termina, preferivelmente, com um filtro de tamanho de poro de cerca de 0,2µm.

A invenção também fornece uma composição de vesícula de *N. meningitidis*, caracterizada por as vesículas incluírem (i) a proteína NspA, (ii) a proteína "287", e (iii) a proteína "741".

As bactérias

As bactérias a partir das quais são preparados os OMVs podem ser Gram-positivas, mas podem ser, preferivelmente, Gram-negativas. As bactérias podem ser provenientes do género *Moraxella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Treporrema*, *Porphyromonas* ou *Helicobacter* (ver acima para as espécies preferidas), mas,

preferivelmente do género *Neisseria*. As espécies *Neisseria* preferidas são a *N. meningitidis* e a *N. gonorrhoeae*. Dentro da *N. meningitidis*, pode ser usado qualquer um dos serogrupos A, C, W136 e Y, mas é preferível preparar vesículas dos serogrupo B. As estirpes preferidas dentro do serogrupo B são as MC58, 2996, H4476 e 394/98.

Para reduzir a actividade pirogénica, é preferível que as bactérias tenham baixos níveis de endotoxinas (LPS). São conhecidas bactérias mutantes adequadas, e.g. *Neisseria* mutante [23] e o *Helicobacter* mutante [24]. Os processos para preparar as membranas exteriores destituídas de LPS, a partir de bactérias Gram-negativas, são revelados na referência 25.

As bactérias podem ser do tipo selvagem, ou podem ser bactérias recombinantes. As bactérias recombinantes preferidas sobre-expressam (em relação à estirpe selvagem correspondente) imunogénicos tais como NspA, 287, 741, TbpA, TbpB, superóxido dismutase [6], etc. As bactérias podem expressar mais do que uma proteína da membrana exterior PorA da classe I, e.g. 2, 3, 4, 5 dos subtipos PorA: Pl.7,16; Pl.19,15; Pl.5c,10; Pl.12,13; e Pl.7h,4 [e.g. refs 26, 27].

O processo da invenção envolverá, tipicamente um passo inicial de cultura da bactéria, seguido, opcionalmente, por um passo de concentração das células cultivadas.

Disrupção da Membrana

A disrupção da membrana para a formação de vesículas é substancialmente realizada na ausência de detergente.

Em particular, a disrupção da membrana pode ser substancialmente realizada na ausência dum detergente de desoxicolato, estando presentes, opcionalmente, outros detergentes.

A disrupção da membrana pode ser substancialmente realizada na ausência dum detergente iónico, estando

opcionalmente presente um detergente não iónico. Alternativamente, pode ser realizado, substancialmente na ausência dum detergente não iónico, estando o detergente iónico opcionalmente presente. Nalgumas modalidades, nem o detergente iónico nem o não iónico estão presentes.

Os passos após a disrupção da membrana e a formação da vesícula podem envolver o uso de detergente. Assim, é abrangido pela invenção um processo em que ocorre a disrupção da membrana na ausência de detergente, mas em que o detergente é posteriormente adicionado às vesículas preparadas.

O termo "substancialmente na ausência" significa que o detergente em questão está presente numa concentração não superior a 0,05% (e.g. $\leq 0,025\%$, $\leq 0,015\%$, $\leq 0,010\%$, $\leq 0,005\%$, $\leq 0,002\%$, $\leq 0,001\%$, ou mesmo 0%) durante a disrupção da membrana. Assim, não estão excluídos os processos em que estão presentes os vestígios de quantidades de detergente, durante a preparação da vesícula.

A disrupção da membrana, na ausência de detergente, pode ser realizada numa bactéria intacta, usando técnicas físicas, e.g. sonicação, homogeneização, microfluidização, cavitação, choque osmótico, trituração, moagem, prensa francesa, mistura, etc.

As vesículas

Os processos da invenção produzem vesículas de membrana externa. As OMVs são preparadas a partir da membrana externa das bactérias cultivadas. Podem ser obtidas a partir de bactérias desenvolvidas em caldo ou meio de cultura sólido, preferivelmente, separando as células bacterianas do meio de cultura (e.g. por filtração ou por filtração de velocidade reduzida para agregar as células), lisar as células (sem detergente), e separar uma fracção de membrana externa das moléculas citoplasmáticas (e.g. por filtração, por

precipitação diferencial ou agregação das membranas externas e/ou OMVs, por métodos de separação por afinidade utilizando ligandos que reconhecem especificamente moléculas de membrana externa, ou por centrifugação de elevada velocidade que agrega as membranas externas e/ou OMVs).

As OMVs podem distinguir-se das microvesículas (MVs[28] e "as OMVs nativas [66]" ("NOMVs")), que são vesículas de membranas que ocorrem naturalmente que se formam espontaneamente durante o crescimento bacteriano e são libertadas para o meio de cultura. As MVs podem ser obtidas pelo cultivo *Neisseria* em meio de cultura líquido, separando todas as células do meio de cultura líquido (e.g. por filtração ou por centrifugação a baixa velocidade para agregar apenas as células e não as pequenas bolhas), e recolhendo as MVs que estão presentes no meio de cultura destituído de células (e.g. por filtração, por precipitação diferencial ou agregação de MVs, por centrifugação a alta velocidade para agregar os MVs). As estirpes para uso na produção de MVs podem ser geralmente seleccionadas na base da quantidade de MVs produzidas na cultura. As referências 29 e 30 descrevem a *Neisseria* com elevada produção de MV.

Componentes Bacterianos Imunogénicos Retidos

A ausência substancial de detergente nos processos da invenção resulta nas preparações de vesículas que retêm componentes imunogénicos da superfície bacteriana que, utilizando métodos da técnica anterior baseados em detergente, seriam, por outro lado perdidos ou diminuídos. Na *N. meningitidis*, três imunogénicos que são vantajosamente retidos usando a invenção incluem, mas não estão limitados a: (1) NspA; (2) proteína "741"; e (3) proteína "287".

A NspA (proteína de superfície de *Neisseria* A) é revelada nas referências ref. 31 a 37, e como SEQ IDs 4008-4033 da

referência 38. É uma vacina candidata para a prevenção da doença meningocócica. É altamente conservada entre as estirpes. Apesar de toda a esperança inicial, no entanto, crê-se agora que a NspA não será um antígeno protector adequado por si só e necessitará de ser administrado com antígenos adicionais [e.g. ref. 36, e exemplo 11 da ref.38]. Descobriu-se que a NspA era removida por métodos de preparação de detergentes da técnica anterior. De acordo com a presente invenção, contudo, a NspA, pode ser retida em vesículas. Tais vesículas NspA^{+ve} são vantajosas porque uma combinação de dois potentes imunogénicos conhecidos (i.e. vesículas + NspA) é preparada num só processo, com cada imunogénico aumentando a eficácia do outro.

A proteína "741" é revelada como "NMB1870" na referência 39 (GenBank: AAF42204, GI:7227128). É também revelado nas referências 40 e 41. Provoca forte anticorpos bactericidas. Descobriu-se que a proteína "741" é parcialmente removida em vesículas preparadas por métodos baseados em detergente da técnica anterior. De acordo com a presente invenção, contudo, a "741" pode ser retida nas vesículas. Tais vesículas 741^{+ve} são vantajosas porque uma combinação de dois imunogénicos potentes conhecidos (i.e. vesículas +741) é preparada num único processo, com cada imunogénico aumentando a eficácia do outro.

A proteína "287" é revelada como "NMB2132" na referência 39 (GenBank: AAF42440, GI:7227388). É também revelado nas referências 40 e 42. Provoca fortes anticorpos bactericidas. A proteína "287" não está tipicamente presente nas vesículas preparadas pelos métodos baseados em detergente da técnica anterior e, para fazer face a esta remoção, foi previamente proposto que as preparações de OMV podem ser suplementadas com 287 [43]. De acordo com a presente invenção, contudo "287" pode ser retida em vesículas. Tais vesículas 287^{+ve} são

vantajosas porque uma combinação de dois imunogénicos potentes conhecidos (*i.e.* vesículas +287) é preparada num único processo, com cada imunogénico aumentando a eficácia do outro.

A NspA preferida (a) tem, pelo menos, uma % de identidade de sequência, para a sequência de aminoácido GI:1518522 e/ou (b) compreende um fragmento de, pelo menos, x aminoácidos da sequência de aminoácido GI:1518522. A "741" preferida (a) tem pelo menos a % de identidade de sequência b, para a sequência de aminoácido GI:7227128, e/ou (b) compreende um fragmento de, pelo menos x aminoácidos a partir da sequência de aminoácido GI:7227128. O "287" preferido (a) tem, pelo menos, a % de identidade de sequência c, para a sequência de aminoácido GI:7227388, e/ou (b) compreende um fragmento de, pelo menos, x aminoácidos da sequência de aminoácidos GI:7227388. Os valores de a, b e c são independentes uns dos outros, mas cada valor é de, pelo menos, 70 (*e.g.* 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, ou 100). Os valores de x, y e z são independentes uns dos outros, mas cada valor é de, pelo menos, 8 (*e.g.* 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 *etc.*). Os fragmentos compreendem, preferivelmente, epitopos.

A NspA preferida, as proteínas 287 e 741, retêm substancialmente a capacidade das proteínas do tipo selvagem (como encontrado na bactéria intacta) para criar anticorpos bactericidas nos pacientes.

Composições Farmacêuticas Imunogénicas

O processo da invenção fornece uma preparação de vesícula. Para administração a um paciente, as vesículas são preferivelmente formuladas como composições imunogénicas, e mais preferivelmente como composições adequadas para uso como vacinas em seres humanos (*e.g.* crianças ou adultos). As vacinas da invenção podem ser profiláticas (*i.e.* para prevenir

infecções) ou terapêuticas (*i.e.* para tratar as doenças após a infecção), mas serão tipicamente profiláticas.

A composição da invenção é, preferivelmente estéril.

A composição da invenção é, preferivelmente isenta de pirogénios.

A composição da invenção tem geralmente um pH entre 6,0 e 7,0, mais preferivelmente entre 6,3 a 6,9, *e.g.* 6,6 \pm 0,2. A composição está preferivelmente tamponada a este pH.

Outros componentes adequados para a administração humana são revelados na referência 44.

A composição compreenderá, geralmente, um adjuvante. Os adjuvantes preferidos para aumentar a eficácia da composição incluem, mas não se limitam a: (A) MF59 (5% de Esqualeno, 0,5% Tween 80, e 0,5% de Span 85, formulado em partículas sub-micrónicas utilizando um microfluidizador) [ver Capítulo 10 da ref. 45; ver também ref. 46]; (B) micropartículas (*i.e.* uma partícula de ~100nm a ~ μ 150m de diâmetro, mais preferivelmente ~200nm a ~30 μ m de diâmetro, e mais preferivelmente ~500nm a ~10 μ m de diâmetro), formado de materiais que são biodegradáveis e não tóxicos (*e.g.* poli(α -ácido hidróxido), um ácido polihidroxibutírico, um poliortoéster, um polianidrido, uma policaprolactona, etc.), sendo preferido um poli(lactide-co-glicólido), sendo opcionalmente carregado na superfície (*e.g.* adicionando um detergente catiónico, aniónico ou não iónico, tal com SDS (negativo) ou CTAB (positivo) [*e.g.* refs. 47 & 48]); (C) lipossomas [ver Capítulos 13 e 14 da ref. 45]; (D) ICOMs [ver Capítulo 23 da ref. 45], que podem estar destituídas de detergente adicional [49]; (E) SAF, contendo 10% de Esqualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero plurónico em bloco L121 e thr-MDP, que microfluidizado numa emulsão microfluidizada ou em vórtex para gerar uma emulsão de tamanho de partícula maior [ver Capítulo 12 da ref.45]; (F) sistema adjuvante RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem), contendo 2% de

Esqualeno, 0,2% de Tween 80, e um ou mais componentes de parede celular bacterianos, a partir do grupo consistindo em monofosfolípido A (MPL), dimicolato de trealose (TDM), e esqueleto de parede celular (CWS), preferivelmente MPL + CWS (DetoxTM); (G) adjuvantes de saponina, tais como QuilA ou QS21 [ver Capítulo 22 ou ref.45], também conhecido como StimulonTM; (H) chitosano [e.g. 50]; (I) adjuvante completo de Freund (CFA) e adjuvante incompleto de Freund (IFA); (J) citoquinas, tais como interleucinas (e.g. IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferões (e.g. interferão- γ), factor de estimulação de macrófago, factor de necrose tumoral, etc. [ver Capítulos 27 & 28 da referência 45]; (K) uma saponina (e.g. QS21)+ 3Dmpl + IL-12 (opcionalmente + um esteroide)[51]; (L) monofosforil lípido A (MPL) ou 3-O-MPL desacilado (3Dmpl) [e.g. capítulo 21 da ref. 45]; (M) combinações de 3dMPL com, por exemplo, QS21 e/ou emulsões de óleo-em-água [52]; (N)oligonucleótidos compreendendo motivos CpG [53], i.e. contendo pelo menos um dinucleótido CG, com 5-metilcitosina, sendo opcionalmente usada em vez da citosina; (O) um éter de polioxietileno ou um éster de polioxietileno [54]; (P) um surfactante de éster de polioxietileno de sorbitano em combinação com um octoxinol [55] ou um éter de polioxietileno de alquilo ou um surfactante de éster, em combinação com, pelo menos, um surfactante não iónico adicional tal como um octoxinol [56]; (Q) um oligonucleótido imunoestimulante (e.g. um oligonucleótido CpG) e um saponina [57]; (R) um imunoestimulante e uma partícula de sal metálico [58]; (S) uma saponina e uma emulsão de óleo em água [59]; (T) enterotoxina de *E.coli* sensível ao calor ("LT"), ou mutantes destoxificados da mesma, tais como K63 ou mutantes R72 [e.g. capítulo 5 da ref. 60]; (U) toxina da cólera ("CT"), ou mutantes destoxificados da mesma [e.g. Capítulo 5 da ref.60]; (V) RNA de cadeia dupla;(W) sais de alumínio, tais como hidróxidos de

alumínio (incluindo oxihidróxidos), fosfatos de alumínio (incluindo hidroxifosfatos), sulfato de alumínio, etc.[Capítulos 8 & 9 na ref. 61]; (X) mímicas de monofosforil lípido A, tais como derivados de aminoalquil glucosaminida fosfato, e.g. RC-529 [64] ou um mucoadesivo seleccionado do grupo consistindo em derivados cruzados de ácido poli(acrílico), álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, polissacáridos, e carboximetilcelulose. Outras substâncias que actuam como agentes imunoestimulantes para aumentar a eficácia da composição [e.g. ver Capítulo 7 da ref.45] podem ser também usados. Os sais de alumínio (especialmente fosfatos de alumínio e/ou hidróxidos) são os adjuvantes preferidos para a imunização parentérica. As toxinas mutantes são os adjuvantes de mucosas preferidos.

As vesículas nas composições da invenção estarão presentes em "quantidades imunologicamente eficazes" i.e. a administração desta quantidade a um indivíduo, quer numa única dose ou como parte de uma série, é eficaz para o tratamento ou prevenção da doença. Esta quantidade varia dependendo da saúde e da condição física do indivíduo a ser tratado, da sua idade, do grupo taxonómico (e.g. primata não humano, primata, etc.), da capacidade do sistema imune do indivíduo para sintetizar anticorpos, do grau de protecção desejado, da formulação da vacina, do conhecimento do médico assistente da situação médica do indivíduo e de outros factores relevantes. Espera-se que esta quantidade esteja dentro dum limite relativamente alargado que pode ser determinado através de experiências de rotina. O tratamento com a dosagem pode ser num esquema de dose única ou de dose múltiplas (i.e. incluindo doses de reforço). A vacina pode ser administrada em conjunto com outros agentes imunorreguladores.

Tipicamente, as composições da invenção são preparadas como injectáveis. A libertação directa das composições será,

geralmente, parentérica (i.e. por injeção, quer subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, ou intramuscularmente ou podem ser libertadas para o espaço intersticial dum tecido) ou nas mucosas (e.g. oral ou intranasal [65, 66]. A composição também pode ser administrada numa lesão.

Quando formuladas, as composições da invenção podem ser administradas directamente ao sujeito. Os sujeitos a serem tratados podem ser animais; em particular, podem ser tratados humanos. As vacinas são particularmente úteis na vacinação de crianças e adolescentes.

A composição pode compreender vesículas de um ou mais serotipo de *N. meningitidis* [28]. Da mesma forma, a composição pode compreender mais de um tipo de vesículas e.g., tanto MVs como OMVs.

Da mesma forma que as vesículas, a composição da invenção pode compreender antigénios adicionais. Por exemplo, a composição pode compreender um ou mais dos seguintes antigénios adicionais:

- antigénios de *Helicobacter pylori* tais como CagA [67 a 70], VacA [71, 72], NAP [73, 74, 75], HopX [e.g. 76], HopY [e.g.76] e/ou urease.
- um antigénio de sacárido do serogrupo A, C W135 e/ou Y de *N. meningitidis*, tal como o oligossacárido revelado na ref.77 do serogrupo C [ver também a ref. 78] ou os oligossacáridos da ref. 79.
- um antigénio de sacárido do *Streptococcus pneumoniae* [e.g. 80, 81, 82].
- um antigénio do vírus da hepatite A, tal como o vírus inactivado [e.g. 83, 84].
- um antigénio do vírus da hepatite B, tais como os antigénios de superfície e/ou de núcleo [e.g. 84, 85].

- um antígeno de *Bordetella pertussis*, tais como pertussis holotoxina (PT) e haemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente também em combinação com pertactina e/ou aglutinogénios 2 e 3 [e.g. refs. 86 & 87].

- um antígeno de difteria, tal como um toxóide de difteria [e.g. capítulo 3 da ref.88] e.g. o mutante CRM₁₉₇ [e.g. 89].

- um antígeno de tétano, tal como um toxóide de tétano [e.g. capítulo 4 da ref. 108].

- um antígeno de sacárido do *Haemophilus influenzae B* [e.g. 78].

- um antígeno do vírus da hepatite C [e.g. 90].

- um antígeno do *N. gonorrhoeae* [e.g. 91, 92, 93, 94].

- um antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [e.g. refs 95 101].

- um antígeno de *Chlamydia trachomatis* [e.g. 102].

- um antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [e.g. 103].

- antígeno(s) de polio [e.g. 104, 105] tal como OPV ou, preferivelmente, IPV.

- antígeno(s) da raiva [e.g. 106] tal como vírus inactivado liofilizado [e.g. 107, RabAvertTM].

- antígenos de vírus da papeira, sarampo e/ou rubéola [e.g. capítulos 9, 10 & 11 da ref. 108].

- antígenos de influenza [e.g. capítulo 19 da ref. 108], tal como as proteínas de superfície da hemaglutinina e/ou da neuraminidase.

- um antígeno da *Moraxella catarrhalis* [e.g. 109].

- um antígeno de proteína de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos do grupo B) [e.g. 110, 111].

- um antígeno de sacárido de *Streptococcus agalactiae* (estreptococos do grupo B).

- um antígeno de *Streptococcus pyrogenes* (estreptococos do grupo A) [e.g. 111, 112, 113].

- um antígeno de *Staphylococcus aureus* [e.g. 114].

- um antígeno de *Bacillus anthracis* [e.g. 115, 116, 117].
- um antígeno dum vírus da família flaviviridae (género flavivirus), tal como o vírus da febre amarela, o vírus da encefalite japonesa, quatro serotipos dos vírus do Dengue, vírus da encefalite transmitidos pela carraça, vírus do Nilo de Oeste.
- um antígeno do pestivirus, tais como o proveniente do vírus da febre porcino, o vírus da diarreia viral bovina, e/ou o vírus da doença congénita de ovinos.
- um antígeno do parvovirus, e.g. do parvovirus B19.
- uma proteína do prião (e.g. a proteína do prião CJD).
- uma proteína amilóide, tal como o péptido beta [118].
- um antígeno do cancro, tais como os referidos na Tabela 1 da ref. 119 ou nas tabelas 3 & 4 da ref. 120.

A composição pode compreender uma ou mais desses antígenos adicionais.

Os antígenos proteicos tóxicos podem ser destoxificados quando necessário (e.g. a destoxificação da toxina *pertussis* por meios químicos e/ou genéticos [87]).

Quando um antígeno de difteria é incluído na composição é preferido também incluir o antígeno do tétano e antígenos *pertussis*. Similarmente, quando um antígeno de tétano é incluído é preferível também incluir antígenos da difteria e do tétano. As combinações DTP são, por isso, as preferidas.

Os antígenos sacáridos estão, preferivelmente, sob a forma de conjugados. As proteínas transportadoras para os conjugados incluem a proteína da membrana exterior de *N. meningitidis* [121], péptidos sintéticos [122, 123], proteínas de choque ao calor [124, 125], proteínas de *pertussis* [126, 127], proteína D de *H. influenzae* [128], citoquinas [129], linfoquinas [129], hormonas [129], factores de crescimento [129], toxina A ou B de *C. difficile* [130], proteínas de

levantamento de ferro [131], etc. Uma proteína transportadora preferida é o toxóide de difteria CRM197 [132].

Os antígenos do serogrupo B de *N. meningitidis* podem ser também adicionados às composições de OMV. Em particular, pode ser adicionado um antígeno de proteína tal como revelado nas refs. 133 a 139.

Os antígenos na composição estarão tipicamente presentes numa concentração de, pelo menos, 1µg/ml cada. Em geral, a concentração de qualquer antígeno será suficiente para promover uma resposta imune contra aquele antígeno.

Como uma alternativa para usar antígenos de proteína na composição na invenção, pode ser usado ácido nucleico codificando o antígeno. Composições de proteína das composições da invenção podem ser assim substituídas por ácido nucleico (preferivelmente DNA e.g. sob a forma de plasmídeo) que codifica a proteína.

Métodos de Tratamento dos Pacientes

A invenção fornece vesículas da invenção para uso como medicamentos.

As vesículas da invenção podem ser usadas num método de criar uma resposta imune num paciente, compreendendo a administração a um paciente duma composição da invenção. A resposta imune é preferivelmente protectora contra a doença meningocócica, e pode compreender uma resposta imune humoral e/ou uma resposta imune celular. O paciente é preferivelmente uma criança.

O método pode criar uma resposta reforço, num paciente que já foi imunizado contra *N.meningitidis*. Os regimes de imunização/reforço subcutâneos e intranasais para as OMVs são revelados na ref. 65.

A invenção também fornece o uso de uma vesícula da invenção no fabrico de um medicamento para criar uma resposta

imune num paciente. O medicamento é, preferivelmente, uma composição imunogénica (e.g. uma vacina). O medicamento destina-se preferivelmente à prevenção e/ou tratamento de uma doença causada por uma *Neisseria* (e.g. meningite, septicémia, gonorreia, etc.).

Estes métodos e utilizações podem envolver a administração de vesículas de mais do que um soro dos subtipos de *N. meningitidis* [e.g. ref.28].

Formulação OMV

A invenção fornece uma composição compreendendo vesículas de membrana externa meningocócicas, um adjuvante de hidróxido de alumínio, um tampão de histidina e cloreto de sódio, na qual: (a) a concentração de cloreto de sódio é superior a 7,5 mg/ml; e/ou (b) a concentração de OMVs é inferior a 100µg/ml.

A concentração de cloreto de sódio é preferivelmente maior que 8 mg/ml, e é, preferivelmente, superior a cerca de 9 mg/ml.

A concentração de OMVs é preferivelmente inferior a cerca de 75 mg/ml, e.g. cerca de 50 mg/ml.

O tampão histidina encontra-se preferivelmente entre um pH de 6,3 e 6,7, e.g. pH 6,5.

O adjuvante pode ser usado a cerca de 3,3 mg/ml (expresso como uma concentração Al^{3+}).

Definições

As referências a uma identidade de sequência percentual entre duas sequências de aminoácido significa que, quando alinhadas, essa percentagem de aminoácidos é a mesma que em comparação com as duas sequências. Este alinhamento e a homologia percentual ou identidade de sequência podem ser determinados utilizando programas de software conhecidos no ramo, por exemplo, os descritos na secção 7.7.18 da referência

140. Um alinhamento preferido é determinado pelo algoritmo de busca de homologia Smith-Waterman, utilizando uma busca de descontinuidade relacionada com uma falta aberta de lacuna de 12, falta de extensão de lacuna de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de busca de homologia Smith-Waterman é bem conhecido e é revelado na referência 141.

O termo "compreendendo" significa "incluindo" bem assim como "consistindo", e.g. uma composição "compreendendo" X pode consistir exclusivamente em X ou pode incluir algo adicional, e.g. Y + X.

O termo "cerca" em relação a um valor numérico x significa, por exemplo, $x \pm 10\%$.

O termo "substancialmente" não exclui "completamente", e.g. uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Quando necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1 e 2 mostram a presença/ausência de (1) proteína "287" e (2) proteína "741" em bactérias ("TOT") e vesículas de membrana externa ("OMV") preparadas de estirpes MC58, H4476 e 394/98 de *N. meningitidis*. A seta mostra a posição de "287" na Figura 1 e "741" na Figura 2.

A Figura 3 mostra as sequências de aminoácido das entradas de GenBank GI:7227128, GI:7227388 e GI:1518522, da mesma forma que em 29 de Agosto de 2002.

FORMAS DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

Preparação de OMV

As OMVs foram preparadas quer pelos métodos "Noruegueses" da técnica anterior (estirpes H4476 e 394/98) ou pelos seguintes processos (estirpe MC58):

- Bactérias de 2-5 discos foram colhidas para 10ml de um tampão Tris-HCl 10mM (pH 8,0) e mortas pelo calor a 56°C durante 45 min. As amostras foram então sonicadas em gelo (ciclo de trabalho 50 durante 10 minutos com a ponta a 6/7) para romper as membranas.
- Os desperdícios celulares foram removidos por centrifugação a 5000g durante 30 minutos a 4°C, ou 10000g durante 10 minutos.
- O sobrenadante foi recentrifugado a 50000g durante 75 minutos a 4°C.
- O pellet foi ressuspensionado em 7 ml de N-lauroil sarcosinato a 2% (Sarkosyl) em Tris-HCl a 10 mM (pH 8,0) durante 20 minutos à temperatura ambiente para solubilizar as membranas citoplasmáticas.
- A amostra foi centrifugada a 10000g durante 10 minutos para remover os particulados e o sobrenadante foi centrifugado a 75000g durante 75 minutos a 4°C. A amostra foi lavada em Tris-HCl 10mM (pH 8,0) e centrifugada a 75000g durante 75 minutos.
- O pellet foi ressuspensionado em Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) ou água destilada.

As bactérias e as preparações foram testadas por Western blot quanto à presença de NspA, 287 e 741 (Figuras 1 & 2) e os resultados foram resumidos na tabela seguinte:

Estirpe	Detergente	NspA		287		741	
		Bactéria	OMV	Bactéria	OMV	Bactéria	OMV
MC58	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
H44/76	+	+++	- ⁽²⁰⁾	+++	-	+++	+
394/98	+	+++	n.d.	+++	++	+++	+

Em contraste com os métodos baseados em detergente da técnica anterior, portanto a ausência de detergente resulta na retenção de NspA nos OMVs e evita a perda de 287 & 741.

Formulação de OMVs preparada a partir da Estirpe de MenB da Nova Zelândia

As OMVs foram preparadas da estirpe 394/98 do serogrupo B de *N. meningitidis*. Estas foram formuladas de duas formas diferentes, com os componentes possuindo as seguintes concentrações:

	Formulação "A"	Formulação "B"
OMVs	50 µg/ml	50µg/ml
Adjuvante de Hidróxido de Alumínio	3,3 µg.ml	3,3 µg.ml
Sacarose	3%	-
Tampão Histidina, pH 6,5	-	5 mM
Cloreto de Sódio	-	9 mg/ml

Descobriu-se que a formulação "B" era imunologicamente superior à formulação "A". A formulação "B" difere da revelada na referência 142 porque possui metade da concentração de OMV e uma concentração superior de NaCl, e uma pH ligeiramente diferente.

Compreender-se-á que a invenção foi descrita apenas como exemplo e que se podem fazer modificações enquanto permanecem dentro do âmbito da invenção.

REFERÊNCIAS

- [1] Bjune et al. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- [2] de Kleijn et al. (2001) *Vaccine* 20:352-358.
- [3] US patents 5,597,572 & 5,747,653; Ver também European patent 0301992.
- [4] European patent 0449958 (concedida a partir da WO0/06696).
- [5] US patent 5,705,161; Ver também WO4/08021.
- [6] International patent application WO00/25811.
- [7] International patent application WO01/52885.
- [8] International patent application WO98/56901.
- [9] International patent application WO01/91788.
- [10] Parmar et al. (1997) *Vaccine* 15:1641-1651.
- [11] International patent application WO99/59625.
- [12] International patent application WO00/50074.
- [13] US patents 5,552,146, 5,981,213 & 5,993,826; Ver também WO93/03761.
- [14] Zhou et al. (1998) *FEMS Microbiol Lett* 163:223-228.
- [15] Kadurugamuwa & Beveridge (1999) *Microbiology* 145:2051-2060.

- [16] International patent application WO97/05899.
- [17] Kesavalu et al. (1992) *Infect. Immun.* 60:1455-1464.
- [18] Blanco et al. (1999) *J Immunol* 163:2741-2746.
- [19] International patent application WO01/09350.
- [20] International patent application WO02/09746.
- [21] Keenan et al. (1998) *FEMS Microbiol Lett* 161:21-27.
- [22] European patent 0011243.
- [23] International patent application WO99/10497.
- [24] International patent application WO02/07763.
- [25] European patent 0624376.
- [26] Claassen et al. (1996) *Vaccine* 14:1001-1008.
- [27] Peeters et al. (1996) *Vaccine* 14:1009-1015.
- [28] International patent application WO02/09643.
- [29] US patent 6,180,111.
- [30] International patent application WO01/34642.
- [31] Martin et al. (1997) *J. Exp. Med.* 185:1173-1183.
- [32] Plante et al. (1999) *Infect. Immun.* 67:2855-2861.
- [33] Cadieux et al. (1999) *Infect. Immun.* 67:4955-4959.
- [34] Moe et al. (1999) *Infect. Immun.* 67:5664-5675.
- [35] Martin et al. (2000) *J. Biotechnol.* 83:27-31.
- [36] Moe et al. (2001) *Infect. Immun.* 69:3762-3771.
- [37] International patent application WO96/29412.
- [38] International patent application WO00/71725.
- [39] Tettelin et al. (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [40] International patent application WO9/57280.
- [41] International patent application WO3/020756 (SEQ IDs 1-22 em particular).
- [42] International patent application WO00/66741.
- [43] International patent application WO01/52885.
- [44] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [45] *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [46] WO90/14837.
- [47] WO02/26212.
- [48] WO98/33487.
- [49] WO00/07621.
- [50] WO9/27960.
- [51] WO98/57659.
- [52] European patent applications 0835318, 0735898 e 0761231.
- [53] Krieg (2000) *Vaccine* 19:618-622; Krieg (2001) *Curr opin Mol Ther* 2001 3:15-24; WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100 WO98/55495, WO98/37919 e WO98/52581 etc.
- [54] WO99/52549.
- [55] WO01/2120
- [56] WO01/21152.
- [57] WO00/8280
- [58] WO00/23105.
- [59] WO9/11241.
- [60] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, n° 1.
- [61] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [62] Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [63] International patent application WO00/50078.
- [64] Singh et al. (2001) *J. Cont. Rel.* 70:267-276.
- [65] Bakke et al. (2001) *Infect. Immun.* 69:5010-5015.
- [66] Katial et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:702-707.
- [67] Covacci & Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.
- [68] WO3/18150.
- [69] Coacci et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
- [70] Tummuru et al. (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
- [71] Marchetti et al. (1998) *Vaccine* 16:33-37.

- [72] Telford et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
- [73] Evans et al. (1995) *Gene* 153:123-127.
- [74] WO96/01272 & WO96/01273, especialmente SEQ ID NO:6.
- [75] WO97/25429.
- [76] WO98/04702.
- [77] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [78] Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [79] International patent application WO03/007985.
- [80] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [81] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [82] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [83] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [84] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [85] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [86] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [87] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [88] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [89] Del Giudice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- [90] Hsu et al. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- [91] International patent application WO99/24578.
- [92] International patent application WO99/36544.
- [93] International patent application WO99/57280.
- [94] International patent application WO02/07924.
- [95] International patent application WO02/02606.
- [96] Kalman et al. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [97] Read et al. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- [98] Shirai et al. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
- [99] International patent application WO99/27105.
- [100] International patent application WO00/27994.
- [101] International patent application WO00/37494.
- [102] International patent application WO99/28475.
- [103] Ross et al. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [104] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [105] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [106] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
- [107] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
- [108] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [109] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [110] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- [111] International patent application WO02/34771.
- [112] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [113] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [114] Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; ver también págs. 1218-1219.
- [115] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.
- [116] Demicheli et al. (1998) *Vaccine* 16:880-884.
- [117] Stepanov et al. (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.
- [118] Ingram (2001) *Trends Neurosci* 24:305-307.
- [119] Rosenberg (2001) *Nature* 411:380-384.
- [120] Moingeon (2001) *Vaccine* 19:1305-1326.
- [121] EP-A-0372501
- [122] EP-A-0378881
- [123] EP-A-0427347
- [124] WO93/17712
- [125] WO94/03208
- [126] WO8/58668
- [127] EP-A-0471177
- [128] WO00/56360
- [129] WO1/01146

- [130] WO00/81761
- [131] WO01/723
- [132] Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
- [133] WO99/24578.
- [134] WO9/36544.
- [135] WO99/57280.
- [136] WO00/22430.
- [137] Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
- [138] WO96/29412.
- [139] Pizza et al. (2000) Science 287:1816-1820.
- [140] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30.
- [141] Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482-489.
- [142] WO03/009869.

Lisboa, 4 de Outubro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1- Um processo para a manufatura de uma preparação de vesícula de membrana externa a partir de uma bactéria, caracterizado por a membrana bacteriana ser substancialmente rompida na ausência de detergente de desoxicolato, e por a bactéria sobre-expressar TbpA.

2- O processo, de acordo com a Reivindicação N°.1, caracterizado por a membrana bacteriana ser substancialmente rompida na ausência de um detergente qualquer.

3- O processo, de acordo com a Reivindicação N°.1 ou N°.2, caracterizado por compreender os seguintes passos básicos: (a) tratamento de células bacterianas na ausência substancial de detergente; (b) centrifugação da composição a partir do passo (a) para separar as vesículas de membrana externa das células tratadas e detritos celulares, e recolha do sobrenadante; (c) realização duma centrifugação de alta velocidade do sobrenadante a partir do passo (b) e recolha das vesículas de membrana externa num pellet; (d) redispersão do pellet a partir do passo (c) num tampão; (e) realização de uma segunda centrifugação de alta velocidade de acordo com o passo (c), recolhendo as vesículas de membrana externa num pellet; (f) redispersão do pellet do passo (e) num meio aquoso.

4- O processo, de acordo com a Reivindicação N°.3, caracterizado por compreender ainda os seguintes passos: (g) realização da filtração estéril através de, pelo menos dois filtros de redução do tamanho do poro, da composição redispersada a partir do passo (f); e (h) incluindo, opcionalmente a composição proveniente do passo (g) num transportador farmacêuticamente aceitável e/ou uma composição adjuvante.

5- O processo, de acordo com as reivindicações N°. 3 ou N°.4, caracterizado por o passo (b) compreender a

centrifugação a cerca de 5000-10000 g até cerca de 1 hora, e compreendendo os passos (c) e (e) a centrifugação a cerca 35000-100000 g até cerca de 2 horas.

6- O processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado a disrupção da membrana ser efectuada por sonicação, homogeneização, microfluidização, cavitação, choque osmótico, trituração, prensa francesa, mistura, ou qualquer outra técnica física.

7- O processo, de acordo com qualquer reivindicação precedente, caracterizado por o tampão usado no passo (d) e/ou no passo (f) ser um tampão Tris, um tampão fosfato, ou um tampão histidina.

8- O processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.5 a N°.7, caracterizado por o passo (g) finalizar como um tamanho de poro de cerca de 0,2µm.

9- O processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por a bactéria a partir da qual são preparadas as OMVs ser dum género de *Moraxella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Helicobacter* ou *Neisseria*.

10- O processo, de acordo com a reivindicação N°.9, caracterizado por a bactéria ser a *N. meningitidis* ou *N. gonorrhoeae*.

11- O processo, de acordo com a reivindicação N°.10, caracterizado por a *N. meningitidis* ser do serogrupo B.

12- O processo, de acordo com a reivindicação N°.11, caracterizado por a bactéria ser a estirpe H4476 do serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.

13- O processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por compreender o passo de formulação duma quantidade imunologicamente eficaz dos OMVs como uma composição imunogénica.

14- Uma composição de OMV, caracterizada por ser obtida pelo processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes.

15- Uma composição de vesícula de *Neisseria meningitidis*, **caracterizada por** as vesículas incluírem (i) uma proteína NspA, (ii) uma proteína "287", e (iii) uma proteína "741".

16- Uma composição, de acordo com a reivindicação N°.14 ou N°.15, caracterizada por a composição ser estéril e/ou livre de pirogénicos e/ou tamponada a um pH de cerca de 6,0 e 7,0.

17- A composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.14 a N°.16, caracterizada por ser utilizada como um medicamento.

18- O uso de uma composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações N°.14 a N°.16, caracterizado por ser utilizado no fabrico dum medicamento para aumentar uma resposta imune num paciente.

Lisboa, 4 de Outubro de 2007

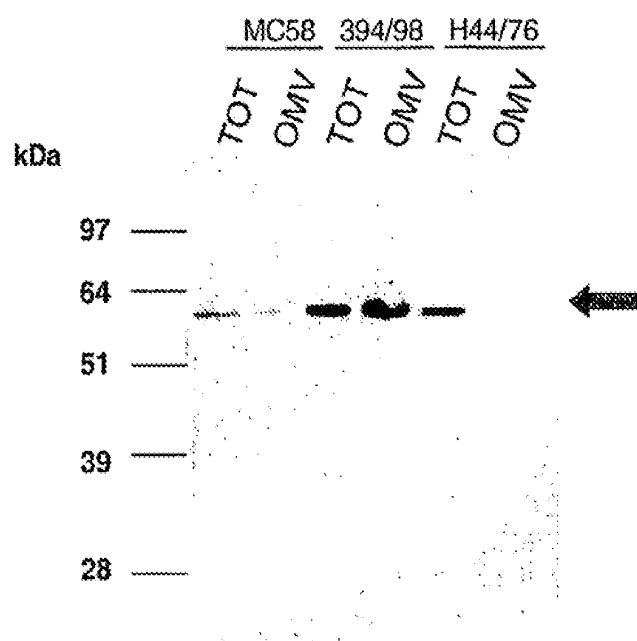
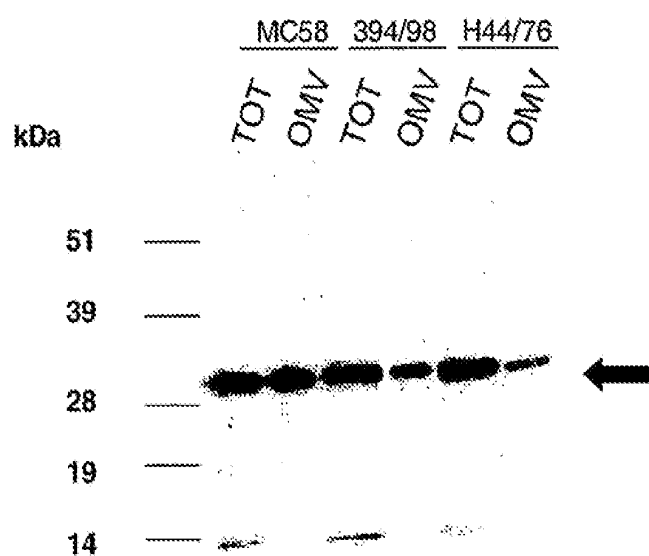
FIGURA 1**FIGURA 2**

FIGURA 3**GI 7227128:**

MPSEPPFGRH LIFASLTCLI DAVCKKRYHN QNVYILSILR MTRSKPVNRT AFCCLSLTTA
 LILTACSSGG GGVAADIGAG LADALTAPLD HKDKGLQSLT LDQSVRKNEK LKLAAGAEK
 TYNGGDSLNT GKLNKDVSR FDFIRQIEVD GQLITLESGE FQVYKQSHSA LTAFTQEQIQ
 DSEHSGKMVA KRQFRIGDIA GEHTSFDKLP EGGRATYRGT AFGSDDAGGK LTYTIDFAAK
 QGNGKIEHLK SPELNVDLAA ADIKPDGKRH AVISGSVLYN QAEKGSYSLG IFGGKAQEVA
 GSAEVKTVNG IRHIGLAAKQ

GI 7227388:

MFKRSVIAMA CIFALSACGG GGGGSPDVKS ADTLKPAAP VVSEKETEAK EDAPQAGSQG
 QGAPSAQGSQ DMAAVSEENT GNGGAVTADN PKNEDEVAQN DMPQNAAGTD SSTPNHTPDP
 NMLAGNMENQ ATDAGESSQP ANQPDMAAA DGMQGGDDPSA GGQNAAGNTAA QGANQAGNNQ
 AAGSSDPIPA SNPAPANGGS NFGRVDLANG VLIDGPSQNI TLTHCKGDSC SGNNFLDEEV
 QLKSEFEKLS DADKISNYKK DGKNDKFVGL VADSVQMKGI NQYIIFYKPK PTSFARFRRS
 ARSRRLPAE MPLIPVNQAD TLIVDGEAVS LTGHSGNIFA PEGNYRYLTY GAEKLPGGSY
 ALRVQGEPAK GEMLAGAAVY NGEVLHFHTE NGRPYPTRGR FAAKVDFGSK SVDGIIDSGD
 DLHMGTOKEK AAIDGNGEKG TWTENGSGDV SGKFYGPAGE EVAGKYSIRP TDAEKGGFGV
 FAGKKEQD

GI 1518522:

MKKALATLIA LALPAAALAE GASGFYVQAD AAHAKASSSL GSAKGFSPRI SAGYRINDLR
 FAVDYTRYKN YKAPSTDFKL YSIGASAIYD FDTQSPVKPY LGARLSLNRA SVDLGGSDSF
 SOTSIGLGLV TGVSYAVTPN VDLDAGYRYN YIGKVNTVKN VRSGELSVGV RVKF