

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

(21) **PI0608455-9 A2**



(22) Data de Depósito: 17/03/2006
(43) Data da Publicação: 05/01/2010
(RPI 2035)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/35 (2009.01)
A61P 37/08 (2009.01)

(54) Título: **COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO CONJUGADOS DE ALÉRGENOS DE GATO BEM COMO VACINAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MEDICAMENTOS CONTENDO A MESMA, E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO**

(30) Prioridade Unionista: 18/03/2005 US 60/662,918

(73) Titular(es): CYTOS BIOTECHNOLOGY AG

(72) Inventor(es): KLAUS DIETMEIER, MARTIN BACHMANN, MONIKA BAUER, NICOLE SCHMITZ, STEPHAN UTZINGER

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006060845 de 17/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/097530 de 21/09/2006

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO CONJUGADOS DE ALÉRGENOS DE GATO BEM COMO VACINAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MEDICAMENTOS CONTENDO A MESMA, E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO. A presente invenção refere-se aos campos de medicina, saúde pública, imunologia, biologia molecular e virologia. A invenção fornece composições compreendendo uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral e, pelo menos, um antígeno, particularmente, pelo menos um antígeno felino, e mais particularmente pelo menos um antígeno felino que é um alérgeno humano. Em certas concretizações, o antígeno é um antígeno da Fel dl, ou fragmento da mesma, ligado covalentemente à VLP. A invenção fornece também processos para produção das composições. As composições da invenção induzem respostas imunológicas eficientes, particularmente respostas de anticorpos, em mamíferos, particularmente em seres humanos. As composições e processos da invenção são úteis na produção de vacinas, particularmente para o tratamento e/ou prevenção de alergias à caspa de gato e a outros antígenos e alérgenos de gatos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"CONJUGADOS DE ALÉRGENOS DE GATO E USOS DOS MESMOS"**.

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se aos campos de medicina, saúde pública, imunologia, biologia molecular e virologia. A invenção fornece composições compreendendo uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula de vírus e, pelo menos, um antígeno, particularmente, pelo menos, um antígeno felino e, mais particularmente, pelo menos um antígeno felino
10 que é um alérgeno humano. Em certas concretizações, o antígeno é um antígeno Fel d1, ou um fragmento do mesmo, ligado covalentemente à VLP. A invenção fornece também processos para a produção das composições. As composições da invenção induzem respostas imunológicas eficientes, em particular, respostas de anticorpos, em mamíferos, particularmente, humanos. As composições e processos da invenção são úteis na produção de
15 vacinas, em particular para o tratamento e/ou prevenção de alergias à capsa de gatos e a outros antígenos e alérgenos de gatos.

Técnica relacionada

O gato doméstico (*Felis domesticus*) é uma fonte importante de
20 alérgenos internos (Lau, S. *et al.* (2000) *Lancet* 356, 1392-1397). De fato, gatos são encontrados em aproximadamente 25% das casas nos países ocidentais e a alergia a gatos é encontrada em grande parte da população. A gravidade dos sintomas varia de rinite leve e conjuntivite à asma exacerbada com risco de vida.

25 Embora os pacientes sejam ocasionalmente sensibilizados por diversas moléculas diferentes presentes na caspa e pelos de gato, o principal alérgeno é o Fel d 1 (isto é, alérgeno 1 do *Felis domesticus*, antigo Cat 1, isto é, alérgeno Cat 1). A importância deste alérgeno foi realçada em inúmeros estudos. De fato, mais de 80% dos pacientes alérgicos a gatos exibem
30 anticorpos IgE contra este potente alérgeno (van Ree, R. *et al.* (1999) *J. Allergy Clin Immunol* 104, 1223-1230).

O Fel d1 é uma glicoproteína ácida com 35-39 kDa contendo 10-

20% de carboidratos ligados a N, estando presente no pêlo, saliva e glândulas lacrimais de gatos. Ela é formada por dois heterodímeros ligados de modo não covalente. Cada heterodímero é constituído por um peptídeo com 70 resíduos (conhecido como "cadeia 1") e um peptídeo com 78, 85, 90 ou 92 resíduos (conhecido como "cadeia 2"), que são codificados por genes diferentes (consultar Duffort, O. A. *et al.* (1991) *Mol Immunol* 28, 301-309; Morgenstern, J. P. *et al.* (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9690-9694 and Griffith, I. J. *et al.* (1992) *Gene* 113, 263-268).

O tratamento de pacientes alérgicos a gatos é efetuado atualmente por terapia dessensibilizante envolvendo injeções repetidas com doses crescentes de um extrato bruto de caspa de gatos ou de peptídeos curtos derivados da Fel d1. Lilja *et al* e Hedlin *et al* descreveram um esquema para dessensibilização durante o qual foram fornecidos extratos brutos de caspa de gato a pacientes alérgicos a gatos (Lilja, Q *et al.* (1989) *J Allergy Clin Immunol* 83, 37-44 and Hedlin *et al.* (1991) *J Allergy Clin Immunol* 87, 955-964). Este esquema levou pelo menos de dois a três anos e os pacientes após o tratamento de três anos ainda apresentaram sintomas sistêmicos. O uso de peptídeos curtos, derivados da Fel d1, para a dessensibilização resultou em diferenças não significantes entre o grupo do peptídeo e o grupo do placebo (Oldfield, W. L. *et al.* (2002) *Lancet* 360, 47-53). A eficácia foi somente observada quando uma quantidade grande (750 µg) do peptídeo curto foi fornecida aos pacientes (Norman, P. S. *et al.* (1996) *Am J Respir Crit Care Med* 154, 1623-1628).

Os efeitos colaterais alérgicos como, reações asmáticas tardias, foram relatados tanto no tratamento com extrato bruto de caspa de gato como no tratamento com peptídeo curto. Por conseguinte, o choque anafilático decorrente de alérgeno injetado é uma questão importante de segurança em qualquer esquema para dessensibilização. No entanto, a prevenção deste efeito, pela redução da quantidade de alérgeno injetado, ou reduz a eficácia do tratamento ou prolonga o tratamento. Dessa forma, há uma grande necessidade na área de tratamento de alergia a gato para regimes alternativos de dessensibilização que sejam capazes de reduzir os sintomas alérgicos,

porém que não desencadeiem a reação alérgica colateral.

Sumário da Invenção

Descobriu-se surpreendentemente agora que as composições e vacinas da invenção compreendendo, respectivamente, pelo menos um antígeno da Fel d1, ou fragmento da mesma da invenção, são não só capazes de induzir respostas imunológicas contra o Fel d1, e, pela presente, em particular respostas de anticorpos, capazes de dessensibilizar pacientes que sofrem de alergia a gato e, pela presente, em particular, dentro de um curto período de tempo, indicando a alta eficácia das composições e vacinas da invenção, respectivamente. Ademais, descobriu-se surpreendentemente que o Fel d1 da invenção, quando ligado covalentemente à VLP, de acordo com a invenção, reduziu dramaticamente a atividade anafilática, quando comparado ao Fel d1 da invenção que estava ligado covalentemente à VLP, embora mantendo um alto grau de antigenicidade e imunogenicidade. Esse fato representa uma grande vantagem sobre tratamentos contra alergia a gato da técnica anterior uma vez que as composições e vacinas da invenção, respectivamente, reduzem dramaticamente o risco de provocar choque anafilático em animais e seres humanos a serem imunizados. Além disso, as composições e vacinas da invenção, respectivamente, permitem que o antígeno seja fornecido em doses muito mais altas em comparação a tratamentos contra alergia a gatos da técnica anterior, o que por seu turno melhora a eficácia e/ou encurta a duração do esquema total de dessensibilização. Dessa forma, as composições e vacinas da invenção, respectivamente, induzem respostas imunológicas potentes contra o Fel d1, porém, sem desencadear uma reação alérgica.

Dessa forma, na primeira característica, a presente invenção fornece uma composição que compreende (a) uma partícula central com pelo menos um sítio de fixação, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral, e (b) pelo menos um antígeno com pelo menos um segundo sítio de fixação, em que o referido pelo menos único antígeno é uma proteína Fel d1, ou fragmento da Fel d1, e em que (a) e (b) são ligados covalentemente por meio de pelo menos

de um primeiro sítio de fixação referido e pelo menos um segundo sítio de fixação referido, para formar de preferência um arranjo antigênico ordenado e repetido.

5 Em outra característica, a presente invenção fornece uma composição de vacina. Além disso, a presente invenção fornece um processo para administração da composição da vacina para um ser humano ou mamífero não humano como um cachorro alérgico a gato, de preferência ao Fel d1 de gato. Em uma concretização preferida, a composição da vacina compreende ainda pelo menos um adjuvante. A composição da vacina da invenção é, no entanto, capaz de induzir uma forte resposta imunológica, particularmente resposta de anticorpos, sem a presença de pelo menos um adjuvante. Dessa forma, em uma concretização de preferência, a vacina é desprovida de um adjuvante. A prevenção do uso de adjuvante pode reduzir uma possível ocorrência de efeitos colaterais, relativos ao uso de adjuvantes.

10

15

Em uma concretização preferida, a VLP incluída na composição e na composição da vacina, respectivamente, é produzida por recombinação em um hospedeiro e a VLP é essencialmente livre do RNA do hospedeiro, de preferência, livre de ácidos nucleicos do hospedeiro. O mesmo é vantajoso para reduzir, ou de preferência, eliminar a quantidade de hospedeiro, preferencialmente livre de ácidos nucleicos do hospedeiro, para evitar respostas não desejadas de célula T, bem como outros efeitos colaterais não desejados como, por exemplo, febre.

20

Em uma concretização preferida, a composição da invenção compreende ainda pelo menos uma substância imunoestimuladora, de preferência, pelo menos um ácido nucleico imunoestimulador. Em ainda outra concretização de preferência, o ácido nucleico imunoestimulador está contido na VLP da invenção. A inclusão de substâncias imunoestimuladoras, preferencialmente, ácidos nucleicos imunoestimuladores, na composição da invenção pode direcionar as respostas imunológicas para respostas Th1 e, pelo mesmo, suprimir as respostas Th2 e, dessa forma, suprimir a produção de IgE.

25

30

Em um aspecto, a presente invenção fornece um método para o tratamento de alergia a gato pela administração da composição ou vacina da invenção, respectivamente, a um alvo alérgico a gato, de preferência humano.

5 Em ainda um outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo a composição da invenção e um veículo farmacêutico aceitável.

Em mais um aspecto, a presente invenção fornece um processo para produção da composição da invenção compreendendo (a) uma partícula central com pelo menos um sítio de fixação, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral; (b) provendo pelo menos um antígeno com pelo menos um segundo sítio de fixação, em que o referido antígeno é uma proteína Fel d1 ou fragmento da Fel d1; e (c) combinando a referida partícula central e o referido pelo menos
10 único antígeno para a produção da referida composição, em que o referido pelo menos único antígeno e a referida partícula central estão ligados por meio de pelo menos o referido primeiro e, pelo menos, o referido segundo sítios de fixação.

Em um aspecto, a invenção fornece uma proteína de fusão da Fel d1, compreendendo a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1, fundida por meio de um espaçador aminoácido, que liga o N-terminal de uma cadeia ao C-terminal da outra cadeia, em que o referido espaçador aminoácido é constituído por uma seqüência de aminoácidos com 10-30 resíduos de aminoácidos e em que a referida proteína de fusão é produzida em E.coli ou em
20 que a referida proteína de fusão não é glicosilada.

Breve Descrição das Figuras

A FIG 1 mostra as proteínas de fusão com Fel d1, renaturadas e purificadas, coradas por Coumassie em gel não redutor de SDS-PAGE. As amostras na faixa 1 usaram DTT como agente redutor. As amostras na faixa
30 2 não usaram DTT.

A FIG 2 mostra a desgranulação de basófilos pelas proteínas de fusão com Fel d1 isoladas ou pelas proteínas de fusão com Fel d1 acopla-

das a Q β . O eixo X representa a concentração da proteína Fed d1 correspondente. O eixo Y representa o percentual de basófilos que foram desgranulados.

5 A FIG 3 mostra os resultados do teste de puntura na pele ("prick test") de um voluntário alérgico a gatos que recebeu Q β -FELD1 no dia 0, 7 e 14 e os testes foram também conduzidos nos dias 0, 14 e 21.

A FIG 4A mostra a pontuação de escalonamento de dose nasal e pontuação global nasal (FIG 4B) de um voluntário alérgico a gatos que recebeu Q β -FELD 1 no dito 0, 7 e 14 e os testes foram conduzidos no dia 0,
10 14 e 21.

Descrição Detalhada da Invenção

Salvo se definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados no presente têm os mesmos significados conforme habitualmente entendidos por aqueles com habilidade comum na técnica a qual
15 pertence esta invenção.

Adjuvante: O termo "adjuvante", conforme utilizado no presente, refere-se a estimuladores não específicos da resposta imunológica ou substâncias que possibilitam a geração de um acúmulo no hospedeiro, o qual quando combinado à vacina e composição farmacêutica, respectivamente,
20 da presente invenção pode fornecer uma resposta imunológica ainda mais acentuada. Pode ser utilizada uma variedade de adjuvantes. Os exemplos incluem adjuvante de Freund completo e incompleto, hidróxido de alumínio e muramildipeptídeo modificado. Outros adjuvantes são géis minerais como hidróxido de alumínio, substâncias de superfície ativa como lisolecitina, polí-
25 óis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões oleosas, hemocianina do molusco *keyhole limpet*, dinitrofenol e adjuvantes humanos potencialmente úteis como BCG (bacilo Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Estes adjuvantes são também bastante conhecidos na técnica. Outros adjuvantes que podem ser administrados junto às composições da invenção incluem,
30 porém sem restrição, imunoestimulantes de monofosforil lipídeos, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, sais de alumínio (Alum), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294 e adjuvantes de tecnologia virossomal. Os adjuvantes po-

dem compreender também uma mistura destas substâncias. A VLP foi descrita, de uma maneira geral, como um adjuvante. Contudo, o termo "adjuvante", conforme utilizado no contexto deste pedido, refere-se a adjuvantes diferentes da VLP que está sendo utilizada para as composições da invenção,
5 mais em acréscimo à referida VLP.

Antígeno: Conforme utilizado no presente, o termo "antígeno" refere-se a uma molécula capaz de se ligar a um anticorpo ou a um receptor da célula T (TCR), se apresentada por moléculas MHC. O termo "antígeno", conforme utilizado no presente, engloba também epítopos de células T. Um
10 antígeno é capaz ainda de ser reconhecido pelo sistema imunológico e/ou ou de induzir uma resposta imunológica humoral e/ou resposta imunológica celular que leva à ativação de linfócitos B e/ou T. Esta pode, contudo, requerer que, pelo menos em certos casos, o antígeno contenha ou esteja ligado a um epítipo de célula Th e seja fornecido em adjuvante. Um antígeno pode
15 ter um ou mais epítopos (epítopos B e T). A reação específica, referida acima, visa indicar que o antígeno reagirá de preferência, tipicamente de maneira altamente seletiva, com o seu anticorpo correspondente ou TCR e não com a multiplicidade de outros anticorpos ou TCRs que poderão ser incitados por outros antígenos. Antígenos, conforme utilizados no presente, podem
20 ser misturas de diversos antígenos individualizados.

Sítio antigênico: O termo "sítio antigênico" e o termo "epítipo antigênico", que são utilizados no presente alternadamente, referem-se a partes contínuas ou descontínuas de um polipeptídeo, que podem se ligar a um anticorpo ou um receptor de célula T, no contexto de uma molécula
25 MHC. Ligação imuno específica exclui ligação não específica, porém não exclui necessariamente reatividade cruzada. O sítio antigênico compreende tipicamente 5-10 aminoácidos em uma conformação especial exclusiva para o sítio antigênico.

Associado: O termo "associado" (ou o seu substantivo, associação), conforme utilizado no presente, refere-se a todas as maneiras possíveis, de preferência por interações químicas, pelas quais duas moléculas
30 estão unidas. As interações químicas incluem interações covalentes e não

covalentes. Exemplos típicos de interações não covalentes são interações iônicas, interações hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio, enquanto que interações covalentes têm como base, a título de exemplo, ligações covalentes como ligações éster, éter, éster fosfato, amida, peptídica, carbono-fósforo e carbono-enxofre, como ligações tioéter ou imida.

Sítio de fixação, Primeiro: Conforme utilizado no presente, a expressão "primeiro sítio de fixação" refere-se a um elemento que ocorre naturalmente com a VLP ou que é artificialmente acrescentado à VLP, e ao qual o segundo sítio de fixação pode estar ligado. O primeiro sítio de fixação pode ser uma proteína, um aminoácido, um peptídeo, um açúcar, polinucleotídeo, um polímero natural ou sintético, um metabólito ou composto secundário (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, íons metálicos, fenilmetil sulfonil fluoreto) ou um grupo quimicamente reativo como um grupo amina, um grupo carboxila, um grupo sulfidril, um grupo hidroxila, um grupo guanidina, um grupo histidina ou uma combinação dos mesmos. Uma concretização de preferência do primeiro sítio de fixação sendo um grupo quimicamente reativo é o grupo amina de um aminoácido como a lisina. O primeiro sítio de fixação está localizado tipicamente na superfície e, de preferência, na superfície externa da VLP. Existem diversos primeiros sítios de fixação na superfície, de preferência na superfície externa, da partícula semente a vírus, em uma configuração repetida. Em uma concretização preferida, o primeiro sítio de fixação é associado à VLP por meio de pelo menos uma ligação covalente, de preferência por meio de pelo menos uma ligação peptídica. Em uma outra concretização, o primeiro sítio de fixação ocorre naturalmente com a VLP. Alternativamente, em uma concretização de preferência, o primeiro sítio de fixação é acrescentado artificialmente à VLP.

Sítio de Fixação, Segundo: Conforme utilizada no presente, a expressão "segundo sítio de fixação" refere-se a um elemento que ocorre naturalmente ou que é acrescentado artificialmente ao Fel d1 da invenção e ao qual o primeiro sítio de fixação pode se ligar. O segundo sítio de fixação da Fel d1 da invenção pode ser uma proteína, um polipeptídeo, um aminoácido, um açúcar, um polinucleotídeo, um polímero natural ou sintético, um

metabólito ou composto secundário (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, íons metálicos, fenilmetil sulfonil fluoreto) ou um grupo quimicamente reativo como um grupo amina, um grupo carboxila, um grupo sulfidrina, um grupo hidroxila, um grupo guanidina, um grupo hitidina ou uma combinação dos mesmos. Uma concretização de preferência de um segundo sítio de fixação sendo um grupo quimicamente reativo é o grupo sulfidrina, preferencialmente de um aminoácido da cisteína. Os termos "Fel d1 da invenção com pelo menos um segundo sítio de fixação" referem-se, por conseguinte, a um constructo compreendendo o Fel d1 da invenção e pelo menos um segundo sítio de fixação. No entanto, particularmente para um segundo sítio de fixação que não ocorra naturalmente no Fel d1 da invenção, este constructo compreende ainda típica e preferencialmente um "ligador". Em outra concretização de preferência, o segundo sítio de fixação é associado ao Fel d1 da invenção por meio de pelo menos uma ligação covalente, preferencialmente por meio de pelo menos uma ligação peptídica. Em ainda outra concretização, o segundo sítio de fixação ocorre naturalmente no Fel d1 da invenção. Em mais uma outra concretização de preferência, o segundo sítio de fixação é acrescentado artificialmente ao Fel d1 da invenção por meio de um ligador, em que o referido ligador compreende ou é constituído, alternativamente, por uma cisteína. Preferencialmente, o ligador é fundido ao Fel d1 da invenção por uma ligação peptídica.

Proteína de revestimento: O termo "proteína de revestimento" e o termo "proteína de capsídeo", utilizado alternadamente neste pedido, refere-se a uma proteína viral, preferencialmente uma subunidade de um capsídeo natural de um vírus, preferencialmente de RNA de um fago, que é capaz de ser incorporado em um capsídeo viral ou em uma VLP.

Fel d1 da invenção: O termo "Fel d1 da invenção", conforme utilizado no presente, refere-se à pelo menos uma proteína Fel d1 ou pelo menos um fragmento da Fel d1.

Cadeia 1 da Fel d1: O termo "cadeia 1 da Fel d1", conforme utilizado no presente, refere-se a um polipeptídeo compreendendo ou, alternativamente, constituído por uma sequência de aminoácidos como a SEQ ID

NO:22 o uma seqüência homóloga da mesma. O termo "seqüência homóloga da SEQ ID NO:22", conforme utilizado no presente, refere-se a um polipeptídeo que tenha uma identificação, em relação à SEQ ID NO:22, superior a 70%, preferencialmente, superior a 80%, mais preferencialmente superior a 90%, e ainda mais preferencialmente superior a 95%. O termo "cadeia 1 da Fel d1", conforme utilizado no presente, deve referir-se também a um polipeptídeo que abranja pelo menos uma modificação pós-translacional, incluindo, mas sem restrição, pelo menos uma glicosilação, da cadeia 1 da Fel d1, conforme definida no presente. Preferencialmente, a cadeia 1 Fel d1, conforme definida no presente, é constituída por no máximo 130, sendo ainda mais preferencialmente, por no máximo 100 aminoácidos no total.

Cadeia 2 da Fel d1: O termo "cadeia 2 da Fel d1", conforme utilizada no presente, refere-se a um polipeptídeo compreendendo ou, alternativamente, sendo constituído por uma seqüência de aminoácidos como as SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26, ou uma seqüência homóloga das mesmas. O termo "seqüência homóloga da SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26", conforme utilizado no presente, refere-se a um polipeptídeo que tenha uma identificação, em relação à SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26, superior a 70%, preferencialmente superior a 80%, mais preferencialmente superior a 90%, e ainda mais preferencialmente superior a 95%. O termo "cadeia 2 da Fel d1", conforme utilizado no presente, deve referir-se também a um polipeptídeo que abranja pelo menos uma modificação pós-translacional, incluindo, mas sem restrição, pelo menos uma glicosilação da cadeia 2 da Fel d1, conforme utilizado no presente. Preferencialmente, a cadeia 2 da Fel d1, conforme definida no presente, é constituída por no máximo 150, mais preferencialmente de no máximo 130, sendo ainda mais preferencialmente de no máximo 100 aminoácidos no total.

Proteína Fel d1: O termo "proteína Fel d1", conforme utilizado no presente, refere-se a uma proteína que compreende ou, alternativamente, é constituída pela cadeia 1 da Fel d1 e cadeia 2 da Fel d1. Preferencialmente, a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1 estão ligadas covalentemente.

Em uma concretização de preferência, a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1 estão ligadas por meio de, pelo menos, uma ligação dissulfeto. Em outra concretização de preferência, a cadeia 1 e a cadeia 2 estão fundidas diretamente ou por meio de um espaçador, em cujo caso, a referida proteína Fel d1 compreende ainda ou é constituída por um espaçador. Preferencialmente, a proteína Fel d1, conforme definida no presente, é constituída por, no máximo 300, ainda mais preferencialmente por no máximo 200, aminoácidos no total. Típica e preferencialmente, a proteína Fel d1, de acordo com a invenção, é capaz de induzir *in vivo* a produção de anticorpos que se ligam especificamente à proteína natural Fel d1 ou a Fel d1 recombinante, conforme produzida segundo o EXEMPLO 5 da presente invenção.

Fragmento da Fel d1: O termo "fragmento da Fel d1", conforme utilizado no presente, refere-se a um polipeptídeo compreendendo ou, alternativamente, sendo constituído por, pelo menos, um sítio antigênico da Fel d1. Típica e preferencialmente, o termo "fragmento da Fel d1", conforme utilizado no presente, refere-se a um polipeptídeo compreendendo ou, alternativamente, sendo constituído por pelo menos dois sítios antigênicos da Fel d1. Preferencialmente, os sítios antigênicos são ligados covalentemente, mais preferencialmente, os sítios antigênicos são ligados por pelo menos uma ligação peptídica, e em cujo caso, poderá ser necessário um espaçador entre os sítios antigênicos. De preferência, os pelo menos dois sítios antigênicos derivam da cadeia 1 da Fel d1 e da cadeia 2 da Fel d1. De preferência, o fragmento da Fel d1, conforme definido no presente, é constituído por no máximo 130, mais preferencialmente por no máximo 100 e ainda mais preferencialmente por 60 aminoácidos no total. Típica e preferencialmente, o fragmento da Fel d1 é capaz de induzir *in vivo* a produção de anticorpos que se ligam especificamente à proteína natural Fel d1 ou a Fel d1 recombinante, conforme produzida segundo o EXEMPLO 5 da presente invenção.

Ligado: O termo "ligado" (ou o seu substantivo: ligação), conforme utilizado no presente, refere-se a todas maneiras possíveis, de preferência, interações químicas, pelas quais pelo menos um primeiro sítio de fixação e o pelo menos segundo sítio de fixação são unidos. Interações químicas

cas incluem interações covalentes e não covalentes. Exemplos típicos para interações não covalentes são interações iônicas, interações hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio, enquanto que interações covalentes têm como base, a título de exemplo, ligações covalentes como ligações éster, éter, éster fosfato, amida, peptídica, carbono-fósforo e carbono-enxofre como ligações tio-éter ou imida. Em certas concretizações de preferência, o primeiro sítio de fixação e o segundo sítio de fixação são ligados por meio de uma ligação covalente, preferencialmente, por meio de, pelo menos, uma ligação não peptídica, e ainda mais preferencialmente por meio exclusivamente de ligações não peptídicas. O termo "ligado", conforme utilizado no presente, no entanto, abrangerá não só uma ligação direta do, pelo menos, primeiro sítio de fixação e do, pelo menos, segundo sítio de fixação, mas também, alternativa e preferencialmente, uma ligação indireta do, pelo menos, primeiro sítio de fixação e do, pelo menos, segundo sítio de fixação, por meio de molécula(s) intermediária(s) e, pelo presente, típica e preferencialmente, utilizando, pelo menos, um ligador cruzado heterobifuncional.

Ligador: Um "ligador", conforme utilizado no presente, associa o segundo sítio de fixação à Fel d1 da invenção ou já compreende, é constituído essencialmente ou é constituído pelo segundo sítio de fixação. De preferência, um "ligador", conforme utilizado no presente, já compreende o segundo sítio de fixação, típica e preferencialmente – porém, não necessariamente – sob a forma de um resíduo de aminoácido, de preferência um resíduo de cisteína. Um "ligador", conforme utilizado no presente, também é denominado "ligador de aminoácido", particularmente quando um ligador, segundo a invenção, contém pelo menos um resíduo de aminoácido. Dessa forma, os termos "ligador" e "ligador de aminoácido" são utilizados alternadamente no presente. No entanto, esse fato não implica que um ligador seja constituído exclusivamente por resíduos de aminoácidos, apesar de um ligador constituído por resíduos de aminoácidos ser uma concretização preferida da presente invenção. Os resíduos de aminoácidos são compostos, de preferência, por aminoácidos que ocorrem naturalmente ou aminoácidos não naturais conhecidos na técnica, todos os L ou todos os D ou misturas dos

mesmos. Concretizações adicionais de preferência de um ligador, de acordo com esta invenção, são moléculas compreendendo um grupo sulfidríla ou um resíduo de cisteína e estas moléculas são, por conseguindo, abrangidas também nesta invenção. Outros ligadores úteis para a presente invenção são moléculas compreendendo uma metade C1-C6 alquila, uma cicloalquila como uma ciclopentila ou ciclohexila, arila ou metade heteroarila. Ademais, ligadores compreendendo, preferencialmente, uma metade C1-C6 alquila, cicloalquila (C5, C6), arila ou heteroarila e aminoácido(s) adicional(is) podem também ser utilizadas como ligadores para a presente invenção e serão abrangidas no escopo da invenção. A associação do ligador com a Fel d1 da presente invenção é de preferência por meio de, pelo menos, uma ligação covalente, mais preferencialmente, por meio de, pelo menos, uma ligação peptídica.

Arranjo antigênico ordenado e repetido: Conforme utilizado no presente, o termo "arranjo antigênico ordenado e repetido" refere-se geralmente a um padrão de antígeno que se repete ou categorizado, típica e preferencialmente, por um alto grau de uniformidade na disposição espacial dos antígenos em relação à partícula semelhante a vírus, respectivamente. Em uma concretização da invenção, o padrão repetido pode ser um padrão geométrico. Certas concretizações da invenção, como antígenos acoplados a RNA de fagos, são exemplos típicos e preferidos de arranjos antigênicos ordenados e repetidos adequados, os quais, além disso, possuem ordens paracristalina rigorosamente repetidas de antígenos, de preferência com espaços de 1 a 30 nanômetros, preferencialmente de 2 a 15 nanômetros, ainda mais preferencialmente de 2 a 10 nanômetros, e, mais uma vez, ainda mais preferencialmente de 2 a 8 nanômetros e ainda mais preferencialmente de 1,6 a 7 nanômetros.

Empacotado: O termo "empacotado", conforme utilizado no presente, refere-se ao estado de uma macromolécula polianiônica ou substâncias imunoestimulantes em relação à VLP. O termo "empacotado", conforme utilizado no presente, inclui ligação que poderá ser covalente, por exemplo, por acoplamento químico, ou não covalente, por exemplo, interações iôni-

cas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, etc. O termo inclui também o confinamento, ou confinamento parcial, de uma macromolécula polianiônica. Dessa forma, a macromolécula polianiônica ou substâncias imunoestimulantes podem ser confinadas pela VLP, sem a existência efetivamente de uma ligação, particularmente de uma ligação covalente. Em concretizações de preferência, a, pelo menos, única macromolécula polianiônica ou substâncias imunoestimulantes estão empacotadas dentro da VLP, mais preferencialmente de maneira não covalente.

Espaçador: o termo "espaçador", bem como o seu termo igualmente utilizado "espaçador de aminoácido", conforme utilizado no presente, refere-se a um segmento de seqüência de aminoácido que não possui mais de 30 aminoácidos e que liga o N-terminal de uma cadeia com o C-terminal de outra cadeia da Fel d1.

Partícula viral: O termo "partícula viral", conforme utilizado no presente, refere-se à forma morfológica de um vírus. Em alguns tipos de vírus, ele compreende um genoma envolvido por um capsídeo protéico; outros possuem estruturas adicionais (por exemplo, envelopes, caudas, etc.).

Partícula semelhante a vírus (VLP), conforme utilizado no presente, refere-se a um vírus não replicante ou não infeccioso, de preferência uma partícula viral não replicante e não infecciosa, ou refere-se a uma partícula que se assemelhe a vírus não replicante e não infeccioso, de preferência uma estrutura que se assemelhe a vírus não replicante e não infeccioso, preferencialmente um capsídeo de um vírus. O termo "não replicante", conforme utilizado no presente, refere-se a ser incapaz de replicar o genoma incluído na VLP. O termo "não infeccioso", conforme utilizado no presente, refere-se a ser incapaz de entrar na célula hospedeira. De preferência, uma partícula semelhante a vírus, de acordo com a invenção, é não replicante e/ou não infecciosa uma vez que ela carece de todo ou parte do genoma viral ou de função genômica. Em uma concretização, uma partícula semelhante a vírus é uma partícula viral em que o genoma viral foi física ou quimicamente inativado. Tipicamente e mais preferencialmente, uma partícula semelhante a vírus não possui todos ou parte dos elementos replicantes e

infecciosos do genoma viral. Uma partícula semelhante a vírus, de acordo com a invenção, pode conter ácido nucléico distinto de seu genoma. Uma concretização típica e preferida de uma partícula semelhante a vírus, de acordo com a presente invenção, é um capsídeo viral, como o capsídeo viral do vírus correspondente, bacteriófago, de preferência RNA fago. O termo "capsídeo viral" ou "capsídeo" referem-se à montagem macromolecular composta por subunidades de proteínas virais. Tipicamente, há 60, 120, 180, 240, 300, 360 e mais de 360 subunidades de proteínas virais. Típica e preferencialmente, as interações destas subunidades levam à formação de capsídeo viral ou de estrutura semelhante a capsídeo viral com uma organização inerente repetitiva, em que a referida estrutura é, tipicamente, esférica ou tubular. Por exemplo, os capsídeos de RNA fagos ou HBcAgs possuem uma forma esférica de simetria icosaédrica. O termo "estrutura semelhante a capsídeo", conforme utilizado no presente, refere-se a uma montagem macromolecular composta por subunidades de proteínas virais que se assemelha à morfologia do capsídeo, no sentido definido acima, porém se desvia da montagem simétrica típica ao mesmo tempo em que mantém um grau suficiente de ordem e de repetição.

Uma característica comum de partícula viral e partícula semelhante a vírus é o arranjo altamente ordenado e repetitivo de suas subunidades.

Partícula semelhante a vírus de um RNA fago: Conforme utilizado no presente, o termo "partícula semelhante a vírus de um RNA fago" refere-se a uma partícula semelhante a vírus que compreende ou, de preferência, é constituída essencialmente ou é constituída por proteínas de revestimento, mutantes ou fragmentos das mesmas, de um RNA fago. Além disso, partícula semelhante a vírus de um RNA fago assemelha-se à estrutura de um RNA fago, sendo não replicante e/ou não infecciosa e desprovida, pelo menos, do gene ou genes que codificam o mecanismo de replicação do RNA fago e, tipicamente, e desprovida também do gene ou genes que codificam a proteína ou proteínas responsáveis pela fixação ou entrada no hospedeiro. Esta definição deve, contudo, abranger também partículas semelhantes a

vírus de RNA fagos, em que o gene ou os genes supramencionados ainda está presente, porém são inativos, e, por conseguinte, levando também a partículas semelhantes a vírus de um RNA fago, não replicante e/ou não infeccioso. VLPs de preferência, derivadas de RNA fagos, exibem simetria 5 icosaedrica e consistem em 180 subunidades. Nesta divulgação, o termo "subunidade" e "monômero" são utilizados alternadamente e igualmente dentro deste contexto. Neste pedido, o termo "RNA fago" e o termo "RNA bacteriófago" são utilizados alternadamente. Processos utilizados de preferência para produção de uma partícula semelhante a vírus de um RNA fago 10 não replicante e/ou não infeccioso é por inativação física e química como, radiação por UV, tratamento com formaldeído e, tipicamente e preferencialmente, por manipulação genética.

Um ou uma: quando os termos "um" ou "uma" são utilizados nesta divulgação, eles significam "pelo menos um" ou "um ou mais", salvo se 15 indicado de outra forma.

A identificação da seqüência de aminoácidos pode ser terminada pelo processo tradicional, utilizando programas conhecidos de computador, como o programa Bestfit. Ao utilizar o programa Bestfit ou qualquer outro de alinhamento de seqüência, de preferência utilizando o Bestfit, para determi- 20 nar se uma seqüência específica é, por exemplo, idêntica em 95% a uma seqüência de aminoácidos de referência, os parâmetros são definidos de forma que o percentual da identificação é calculado sobre toda a extensão da seqüência de aminoácidos de referência e para que falhas de até 5% na homologia do número total de resíduos de aminoácidos, na seqüência de 25 referência, sejam permitidas. Este processo supramencionado, para determinação do percentual de identificação entre polipeptídeos pode ser aplicado a todas as proteínas, polipeptídeos ou a um fragmento dos mesmos, descritos nesta invenção.

Neste pedido de patente, anticorpos são definidos como sendo 30 especificamente ligados se eles se ligarem ao antígeno com uma afinidade de ligação (K_a) de 10^6 M^{-1} ou mais alta, de preferência 10^7 M^{-1} ou mais alta, mais preferencialmente de 10^8 M^{-1} ou mais alta e, ainda mais preferencial-

mente, de 10^9 M^{-1} ou mais alta. A afinidade de um anticorpo pode ser determinada rapidamente por alguém que possua habilidade comum na técnica (por exemplo, pela análise de Scatchard).

Esta invenção fornece composições da invenção compreendendo: (a) uma partícula central com pelo menos um primeiro sítio de fixação, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral; e (b) pelo menos um antígeno com pelo menos um segundo sítio de fixação, em que o, pelo menos, único antígeno é uma proteína Fel d1, ou fragmento da Fel d1, e em que (a) e (b) estão ligados covalentemente por meio do, pelo menos, único primeiro sítio de fixação e o, pelo menos, segundo único sítio de fixação. De preferência, uma proteína Fel d1 ou um fragmento da Fel d1 está ligado à partícula central, de forma a permitir que um arranjo ordenado e repetido de antígeno-VLP seja formado. Em concretizações de preferência da invenção, pelo menos 20, preferencialmente pelo menos 30, mais preferencialmente, pelo menos, 60 e, uma vez mais, mais preferencialmente, pelo menos 120 e ainda mais preferencialmente, pelo menos 180 de proteína Fel d1 ou fragmento da Fel d1 estão ligados à partícula central.

Qualquer vírus conhecido na técnica, o qual tenha uma estrutura ordenada e repetida pode ser selecionado como uma VLP ou uma partícula viral da invenção. Exemplos de vírus com DNA ou RNA, da proteína de revestimento ou de capsídeo que podem ser utilizados para o preparo de VLPs foram expostos na linha 10-21 da página 25, linha 11-28 da página 26 e linha 4 da página 39 à linha 4 da página 31 da Patente WO 2004/009124. Essas exposições são aqui incorporadas por referência.

Vírus ou partícula semelhante a vírus podem ser produzidos e purificados a partir de culturas de células infectadas por vírus. O vírus ou partícula semelhante a vírus resultante para ser utilizado em vacinas deve, de preferência, ser não replicante ou não infeccioso e mais preferencialmente não é replicante nem infeccioso. Radiação por UV, tratamento químico, como com o formaldeído ou clorofórmio, são os processos geralmente conhecidos por pessoa capacitada na técnica para inativar vírus.

Em uma concretização de preferência, a partícula central é uma partícula viral em que de preferência a partícula viral é uma partícula viral de um bacteriófago e, em que ainda preferencialmente, o referido bacteriófago é um RNA fago e, em que ainda mais preferencialmente o referido RNA fago é um RNA selecionado de Q β , fr, GA ou AP205.

Em uma outra concretização preferida, a VLP é uma VLP recombinante. Praticamente todos os vírus comumente conhecidos foram seqüenciados e estão disponíveis facilmente para o público. O gene que codifica a proteína de revestimento pode ser facilmente identificado por um artesão capacitado. O preparo de VLPs, pela expressão recombinante da proteína de revestimento em um hospedeiro, faz parte do conhecimento comum de um artesão capacitado.

Em uma concretização de preferência, a partícula semelhante a vírus compreende, ou alternativamente é constituída por proteínas recombinantes, mutantes ou fragmentos das mesmas, de um vírus selecionado do grupo composto por: a) RNA fagos; b) bacteriófagos; c) vírus de hepatite B, preferencialmente a proteína de seu capsídeo (Ulrich et al., Virus Res 50:141-182 (1998)) ou sua proteína de superfície (WO 92/11291); d) vírus de sarampo (Warnes, et al., Gene 160:173-178 (1995)); e) vírus Sindbis; f) rotavírus (US 5,071,651 e US 5,374,426); g) vírus da doença pé-boca (Twomey, et al., Vaccine 13:1603 1610, (1995)); h) vírus Norwalk (Jiang, X. et al., Science 250:1580 1583 (1990), Matsui, S.M., et al., J. Clin. Invest. 87:1456 1461 (1991); i) Alfavírus; j) retrovírus, preferencialmente sua proteína GAG (WO 96/30523); k) retrotransposon Ty, preferencialmente a proteína p1; l) vírus do papiloma humano (WO 98/15631); m) vírus polioma; n) vírus do mosaico do tabaco e o) vírus Flock House.

Em uma concretização de preferência, a VLP compreende, ou é constituída por mais de uma seqüência de aminoácidos, de preferência, duas seqüências de aminoácidos, das proteínas recombinantes, mutantes ou fragmentos das mesmas. A VLP que compreende ou é constituída por mais de uma seqüência de aminoácidos é referida, neste pedido, como VLP de mosaico.

O termo "fragmento de uma proteína recombinante" ou o termo "fragmento de uma proteína de revestimento", conforme utilizado no presente, é definido como um polipeptídeo que tenha pelo menos 70%, preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 90% e ainda mais preferencialmente pelo menos 95% da extensão da proteína recombinante do tipo natural, ou proteína de revestimento, respectivamente, e que preferencialmente conserve a capacidade de formar VLP. Preferencialmente o fragmento é obtido por pelo menos uma exclusão interna, pelo menos uma truncagem ou pelo menos uma combinação dos mesmos. O termo "fragmento de uma proteína recombinante" ou "fragmento de uma proteína de revestimento" abrangerá ainda polipeptídeo que tenha pelo menos 80%, preferencialmente 90% e ainda mais preferencialmente 95% da identificação de sequência de aminoácidos com o "fragmento de uma proteína recombinante" ou "fragmento de uma proteína de revestimento", conforme definido acima, e que de preferência seja capaz de ser montada em uma partícula semelhante a vírus.

O termo "proteína recombinante mutante" ou o termo "mutante de uma proteína recombinante", conforme utilizados alternadamente nesta invenção, ou o termo "proteína de revestimento mutante" ou o termo "mutante de uma proteína de revestimento", conforme utilizados alternadamente nesta invenção, referem-se a um polipeptídeo que tenha uma sequência de aminoácidos derivada da proteína recombinante do tipo natural, ou da proteína de revestimento, respectivamente, no qual a sequência de aminoácidos é pelo menos 80%, preferencialmente, pelo menos, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% idêntica à sequência do tipo natural e de preferência que conserve a capacidade para ser montado em uma VLP.

Em uma concretização de preferência, a partícula semelhante a vírus da invenção é do vírus da hepatite B. O preparo de partículas semelhantes a vírus da hepatite B foi exposto, entre outras, nas Patentes WO 00/32227, WO 01/8508 e na WO 02/056905. Todos os três documentos são explicitamente incorporados aqui por referência. Outras variantes de HbcAg, adequadas para o uso prático da presente invenção foram expostas na pá-

gina 34-39 da WO 02/056905.

Em ainda outras concretizações de preferência da invenção, um resíduo de lisina é introduzido no polipeptídeo do HBcAg para mediar a ligação da Fel d1 da invenção à VLP do HBcAg. Em concretizações de preferência, as VLPs e composições da invenção são preparadas utilizando um HBcAg que compreende, ou alternativamente é constituído por aminoácidos 1-144 ou 1-149, 1-185 da SEQ ID NO:20, a qual é modificada para que os aminoácidos nas posições 79 e 80 sejam substituídos por um peptídeo que tenha a seqüência de aminoácidos de Gli-Gli-Lis-Gli-Gli. Essa modificação altera a SEQ ID NO:20 para SEQ ID NO:21. Em ainda outras concretizações de preferência, os resíduos de cisteína, nas posições 48 e 110 da SEQ ID NO:21, ou seus fragmentos correspondentes, preferencialmente 1-144 ou 1-149, sofrem uma mutação para serina. A invenção inclui ainda composições que compreendem proteínas mutantes do núcleo do Hepatite B que tenham as alterações de aminoácido correspondentes, observadas acima. A invenção inclui ainda composições e vacinas, respectivamente, que compreendam polipeptídeos do HbcAg, os quais compreendem ou, alternativamente, são constituídos por seqüências de aminoácidos que sejam pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% idênticas à SEQ ID NO:21.

Em uma concretização de preferência da invenção, a partícula semelhante a vírus da invenção, compreende, ou é essencialmente constituída ou, alternativamente, é constituída por proteínas de revestimento recombinantes, mutantes ou fragmentos das mesmas, de um RNA fago. Preferencialmente o RNA fago é selecionado do grupo composto por a) bacteriófago Q β ; b) bacteriófago R17; c) bacteriófago fr; d) bacteriófago GA; e) bacteriófago SP; f) bacteriófago MS2; g) bacteriófago M11; h) bacteriófago MX1; i) bacteriófago NL95; k) bacteriófago f2; l) bacteriófago PP7 e m) bacteriófago AP205.

Em uma concretização de preferência da invenção, a composição compreende uma proteína de revestimento, ou mutantes ou fragmentos desta, de RNA fagos, em que a proteína de revestimento possui uma seqüência de aminoácidos, selecionada do grupo composto por (a) SEQ ID

NO:1; referente a Q β CP; (b) uma mistura da SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2 (referente a proteína Q β A1); (c) SEQ ID NO:3; (d) SEQ ID NO:4; (e) SEQ ID NO:5; (f) SEQ ID NO:6, (g) uma mistura da SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7; (h) SEQ ID NO:8; (i) SEQ ID NO:9; (j) SEQ ID NO:10; (k) SEQ ID NO:11; (l) SEQ ID NO:12; (m) SEQ ID NO:13; e (n) SEQ ID NO:14.

Em uma concretização de preferência da invenção, a VLP é uma VLP de mosaico compreendendo ou, alternativamente, sendo constituída por mais de uma seqüência de aminoácidos, de preferência por duas seqüências de aminoácidos de proteínas de revestimentos, ou mutantes ou fragmentos das mesmas, de um RNA fago.

Em uma concretização muito preferida, a VLP compreende ou, alternativamente, é constituída por duas proteínas de revestimento diferentes de um RNA fago, as duas referidas proteínas de revestimento possuindo uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO:2, ou da SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7.

Em uma concretização de preferência da invenção, a partícula semelhante a vírus, da invenção, compreende, é essencialmente constituída ou, alternativamente, é constituída por proteínas de revestimento recombinantes, ou mutantes ou fragmentos das mesmas, de RNA bacteriófago Q β , fr, AP205 ou GA. Em uma concretização preferida, a VLP é de um RNA bacteriófago, preferencialmente de um RNA bacteriófago Q β , fr, AP205 ou GA.

Em uma concretização preferida, a VLP da invenção é uma VLP do RNA fago Q β . O capsídeo ou partícula semelhante a vírus do Q β exibiu uma estrutura icosaédrica semelhante a capsídeo de fago com um diâmetro de 25 nm e T=3 de quase simetria. O capsídeo contém 180 cópias da proteína de revestimento, as quais estão ligadas em pentâmeros e hexâmeros covalentes por pontes de dissulfetos (Golmohammadi, R. et al., Structure 4:543-5554 (1996)), levando a uma estabilidade notável do capsídeo Q β . Capsídeos ou VLPs construídos a partir de proteína de revestimento Q β recombinante pode conter, no entanto, subunidades que não estão ligadas por meio de ligações dissulfeto a outras subunidades no capsídeo, ou não estarão completamente ligadas. O capsídeo ou VLP de Q β exibe uma resistên-

cia incomum a solventes orgânicos e agentes de desnaturação. Surpreendentemente, observou-se que concentrações de DMSO e acetonitrila, em concentrações tão altas quanto de 30%, e concentrações de guanidina tão altas quanto de 1 M não afetam a estabilidade do capsídeo. A alta estabilidade do capsídeo ou VLP de Q β é uma característica vantajosa, particularmente, para o seu uso em imunização e vacinação de mamíferos e humanos, de acordo com a presente invenção.

Outras partículas semelhantes a vírus, de RNA fagos, particularmente de Q β e fr, de acordo com esta invenção, estão expostas no WO 02/056905, cuja exposição é aqui incorporada em sua totalidade por referência. O exemplo 18, principalmente, do WO 02/056905 fornece uma descrição detalhada do preparado de partículas VLP de Q β .

Em uma concretização preferida, a VLP da invenção é uma VLP do RNA fago AP205. Formas mutantes, montadas competentemente, de VLPs de AP205, incluindo proteína de revestimento de AP205 com substituição de prolina no aminoácido 5 para treonina, podem também ser utilizadas na prática da invenção e levar a outras concretizações preferidas da invenção. O WO 2004/007538 descreve, particularmente no Exemplo 1 e Exemplo 2, como obter VLP compreendendo proteínas de revestimento de AP205 e, pelo presente, a expressão e a purificação das mesmas. O WO 2004/007538 é aqui incorporado por referência. VLPs de AP205 são altamente imunogênicas e podem estar ligadas a Fel d1 da invenção para gerar, típica e preferencialmente, constructos de vacinas exibindo a Fel d1 da invenção, orientada de maneira repetitiva. É extrato um título alto de anticorpo é extraído com a assim exibida Fel d1 das invenções, demonstrando que a Fel d1 das invenções provêem acesso para interação com moléculas de anticorpos e são imunogênicas.

Em uma concretização preferida, a VLP da invenção compreende ou é constituída por uma proteína de revestimento mutante de um vírus, preferencialmente de um RNA fago, em que a proteína de revestimento mutante foi modificada pela remoção de, pelo menos, um resíduo de lisina por substituição e/ou por exclusão. Em uma concretização preferida, a VLP da

invenção compreende, ou é constituída, uma proteína de revestimento mutante de um vírus, preferencialmente de um RNA fago, em que a proteína de revestimento mutante foi modificada pelo acréscimo de, pelo menos, um resíduo de lisina por substituição e/ou por exclusão. A exclusão, substituição ou acréscimo de, pelo menos, um resíduo de lisina permite variar o nível de acoplamento, ou seja, a quantidade de Fel d1 da invenção por subunidades da VLP de um vírus, preferencialmente de RNA fagos, particularmente, para combinar e se adequar às exigências da vacina.

Em uma concretização preferida, as composições e vacinas da invenção possuem uma densidade antigênica de 0,5 a 4,0. O termo "densidade antigênica", conforme utilizado no presente, refere-se ao número médio de Fel d1 da invenção, ligado por subunidade, preferencialmente, por proteína de revestimento, da VLP, e, pelo presente, preferencialmente da VLP de um RNA fago. Dessa forma, esse valor é calculado como uma média sobre todas as subunidades ou monômeros da VLP, preferencialmente da VLP do RNA fago, na composição ou vacinas da invenção.

VLPs ou capsídeos de proteína de revestimento de Q β exibem um número definido de resíduos de lisina em sua superfície, com uma topologia definida de três resíduos de lisina apontados em direção ao interior do capsídeo e interagindo com o RNA, e quatro outros resíduos de lisina expostos para o exterior do capsídeo. Preferencialmente, o, pelo menos, primeiro sítio de fixação é um resíduo de lisina, apontado ou na parte externa da VLP.

Mutantes de Q β , dos quais resíduos de lisina são substituídos por argininas podem ser utilizados para a presente invenção. Dessa forma, em outra concretização preferida da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende, é essencialmente constituída ou é, alternativamente, constituída por proteínas de revestimento mutantes de Q β . Preferencialmente estas proteínas de revestimento mutantes compreendem ou, alternativamente, são constituídas por uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo de a) Q β -240 (SEQ ID NO:15, Lis13-Arg da SEQ ID NO: 1) b) Q β -243 (SEQ ID NO:16, Asn10-Lis da SEQ ID NO:1); c) Q β -250 (SEQ ID NO:17, Lis2-Arg da SEQ ID NO:1) d) Q β -251 (SEQ ID NO:18, Lis16-Arg da

SEQ ID NO:1); e e) Q β -259" (SEQ ID NO:19, Lis2-Arg, Lis16-Arg da SEQ ID NO:1. A construção, expressão e purificação das VLPs e capsídeos de proteínas de revestimento de Q β , proteína de revestimento mutante de Q β , respectivamente, acima indicadas, estão descritas em WO 02/056905. Particularmente é aqui referido o Exemplo 18 do pedido supramencionado.

Em outra concretização de preferência da presente invenção, a partícula semelhante a vírus compreende ou, alternativamente, é essencialmente constituída, ou ainda alternativamente é constituída por proteína de revestimento mutante de Q β , ou mutantes ou fragmentos da mesma, e pela proteína A1 correspondente. Em ainda outra concretização de preferência, a partícula semelhante a vírus compreende ou, alternativamente, é essencialmente constituída, ou ainda alternativamente é constituída por proteína de revestimento mutante com sequência de aminoácido da SEQ ID NO:15, 16, 17, 18 ou 19 e pela proteína A1 correspondente.

Outras proteínas de revestimento de RNA fagos demonstraram também se automontarem mediante expressão em um hospedeiro bacteriano (Kastelein, RA. et al., Gene 23:245-254 (1983), Kozlovskaya, TM. et al., Dokl. Akad. Nauk SSSR 287:452-455 (1986), Adhin, MR. et al., Virology 170:238-242 (1989), Priano, C. et al., J. Mol. Biol. 249:283-297 (1995)). Particularmente, foram expostas as propriedades biológicas e bioquímicas de GA (Ni, CZ., et al., Protein Sci. 5:2485-2493 (1996), Tars, K et al., J. Mol.Biol. 271:759-773(1997)) e de fr (Pushko P. et al., Prot. Eng. 6:883-891 (1993), Liljas, L et al. J Mol. Biol. 244:279-290, (1994)). Foi determinada a estrutura em cristal de diversos RNA bacteriófagos (Golmohammadi, R. et al., Structure 4:543-554 (1996)). Utilizando estas informações, resíduos de superfície expostos podem ser identificados e, dessa forma, proteínas de revestimento de RNA fagos podem ser modificadas de forma que um ou mais resíduos reativos de aminoácidos possam ser inseridos por meio de inserção ou substituição. Outra vantagem das VLPs, derivadas de RNA fagos, é o alto nível de expressão obtido em bactérias, possibilitando a produção de grandes quantidades de material em um custo acessível.

Em uma concretização de preferência, a composição da inven-

ção compreende, pelo menos, um antígeno, em que o referido pelo menos um antígeno é uma proteína Fel d1.

Em outra concretização de preferência, a proteína Fed d1 compreende ou, alternativamente, é constituída por Fel d1 que ocorre naturalmente. A estrutura primária da cadeia 1 é a seqüência da SEQ ID NO 22. Variantes relatadas da cadeia 1 são Lis29-Arg ou Asn, Val133-Ser, Val60-Leu. A estrutura primária da cadeia 2 é a seqüência da SEQ ID NO 23, 25 ou 26. Variantes relatadas da cadeia 2 são Cis7-Fe, Fe15-Tr, Asn19-Ser, Gli20-Leu, Ile55-Val, Arg57-Lis, Val58-Fe da SEQ ID NO:23, 25 ou 26. Outras variantes da cadeia 2 são Glu69-Val, Tir70-Asp, Met72-Tr, Gln-77-Glu e Asn86-Lis da SEQ ID NO:25; Met74-Tr, Gln79-Glu e Asn88-Lis da SEQ ID NO:23. (Griffith I.J. et al, Gene 113:263-268 (1992); Morgenstern J.P. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:9690-9694 (1991) Duffort O.A., et al Mol. Immunol. 28:301-309 (1991); Leitermann K., et al, J. Allergy Clin. Immunol. 74:147-153 (1984); Kristensen, A. K, et al. (1997) Biol Chem 378, 899-908). A Fel d1 que ocorre naturalmente é obtida pela purificação de, por exemplo, saliva de gato, caspa de gato, poeira doméstica de uma casa em que vive um gato, etc.

Em uma concretização preferida, a Fel d1 da invenção é uma proteína recombinante Fel d1 ou um fragmento recombinante de Fel d1. Proteína recombinante Fel d1 ou fragmento recombinante de Fel d1, conforme utilizado no presente, refere-se a uma proteína Fel d1 ou um fragmento de Fel d1 que é obtido por um processo que compreende, pelo menos, uma etapa da técnica de recombinação de DNA. Os termos "proteína recombinante Fel d1 ou fragmento recombinante de Fel d1" e "proteína Fel d1 produzida por recombinação ou fragmento de Fel d1 produzido por recombinação" são utilizados alternadamente no presente e devem ter o mesmo significado. Proteína recombinante Fel d1 ou seu fragmento podem ser produzidos em sistemas procarióticos de expressão, como *E. coli* (WO 2004/094639) ou em sistemas eucarióticos de expressão, como baculovírus (WO 00/20032) Seppälä *et al* expuseram, simultaneamente, a expressão da cadeia 1 e da cadeia 2 da Fel d1 por promotor bicistrônico em baculovírus (J.

Biol. Chem. Nov, 2004). Proteína Fel d1 ou fragmento, produzidos por recombinação, pode ser por glicosilação ou não, dependendo da célula hospedeira utilizada para produzir a proteína recombinante.

Em uma concretização, a proteína Fel d1 recombinante compreende ou, alternativamente, é constituída pela cadeia 1 da Fel d1 e cadeia 2 da Fel d1, em que a referida cadeia 1 da Fel d1 está ligada à cadeia 2 da Fel d1, exclusivamente por ligação não covalente, como interações hidrofóbicas.

Em uma concretização, a proteína Fel d1 recombinante compreende ou, alternativamente, é constituída pela cadeia 1 da Fel d1 e cadeia 2 da Fel d1, em que a referida cadeia 1 da Fel d1 está ligada à cadeia 2 da Fel d1 por pelo menos uma ligação covalente. Em uma concretização de preferência, a, pelo menos, uma ligação covalente é uma ligação não peptídica, em que a referida ligação não peptídica é uma ligação dissulfeto ou em que, preferencialmente, a referida ligação não peptídica é uma ligação dissulfeto. Por exemplo, a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1 podem ser expressadas separadamente e combinadas em seguida em condições que permitam a formação correta da ligação dissulfeto, como um processo de misturas repetidas.

Alternativamente, a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1 podem ser expressadas simultaneamente em um hospedeiro, por exemplo, pela clonagem dos genes que codificam a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1, respectivamente, de acordo com dois promotores em um plasmídeo. Em sistemas eucarióticos de expressão, a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1 podem ser transcritas em um mRNA e traduzidas separadamente por sítio de entrada interno de ribossomo (IRES).

Em uma concretização de preferência, a proteína Fel d1 compreende ou, alternativamente, é constituída por uma proteína de fusão, em que a referida proteína de fusão compreende a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1. Em uma concretização de preferência, a referida cadeia 1 da Fel d1 e a referida cadeia 2 da Fel d1 são diretamente fundidas por uma ligação peptídica, ligando o N-terminal de uma cadeia ao C-terminal da outra cadeia. Em uma concretização de preferência, a referida cadeia 1 da Fel d1

e a referida cadeia 2 da Fel d1 são diretamente fundidas por meio de um espaçador, ligando o N-terminal de uma cadeia ao C-terminal da outra cadeia. Preferencialmente, o referido espaçador possui de 1-30, preferencialmente de 1-25, preferencialmente de 1-20, preferencialmente de 1-15, preferencialmente de 1-9, preferencialmente de 1-5 e preferencialmente de 1-3 aminoácidos. Alternativamente, o referido espaçador possui de 10-30, preferencialmente de 10-25, mais preferencialmente de 10-20, mais preferencialmente de 13-20, mais preferencialmente de 15-20, mais preferencial de 13-17 e mais preferencialmente de 15-17 aminoácidos. Preferencialmente o referido espaçador é constituído por uma seqüência de aminoácidos com 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 resíduos de aminoácidos. Em uma concretização de preferência, o referido espaçador possui 15 aminoácidos. Em ainda outra concretização de preferência, o referido espaçador é (GGGGS).

Em uma concretização de preferência, a proteína de fusão compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo composto por: (a) SEQ ID NO:24; (b) SEQ ID NO:54; (c) SEQ ID NO:55; (d) SEQ ID NO:56; e (e) SEQ ID NO:57.

Em uma concretização de preferência, a referida cadeia 2 da Fel d1 é fundida por seu C-terminal ao N-terminal da cadeia 1 da Fel d1, seja diretamente ou por meio de um espaçador.

Em ainda outra concretização de preferência, a referida proteína Fel d1 compreende ou, alternativamente, é constituída por uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO:24.

O WO 2004/094639 expôs uma Fel d1 recombinante dobrada com propriedades moleculares e biológicas semelhantes à sua espécime natural e, especificamente, um código genético sintético para fusão direta do N-terminal da cadeia 2 à cadeia 1 da Fel d1. A expressão em *E. coli* resultou em um homodímero, ligado não covalentemente, com um peso molecular aparente de 30 kDa, definido por cromatografia de exclusão por tamanho, cada subunidade de 19177 Da exibindo um padrão dissulfeto idêntico ao encontrado na Fel d1 natural e a Fel d1 e a recombinante possuindo dobras

idênticas. A Fel d1 recombinante reagiu com a IgE, do soro de pacientes alérgicos a gato, da mesma forma que a Fel d1 natural. Dessa forma, esta proteína de fusão da Fel d1 mimetiza a antigenicidade da Fel d1 natural.

Em uma concretização de preferência, a cadeia 1 da Fel d1 é fundida por seu C-terminal ao N-terminal da cadeia 2 da Fel d1, seja diretamente ou por meio de um espaçador.

Em uma concretização de preferência, a cadeia 1 da Fel d1 compreende ou, alternativamente, é constituída por sequência da SEQ ID NO:22 ou uma sequência homóloga da mesma, em que a referida sequência homóloga possui uma identificação em relação à SEQ ID NO:22 superior a 80%, preferencialmente superior a 90%, ou ainda mais preferencialmente superior a 95%.

Em uma concretização de preferência, a cadeia 2 da Fel d1 compreende ou, alternativamente, é constituída por sequência da SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 ou SEQ ID NO:26 ou uma sequência homóloga da mesma, em que a referida sequência homóloga possui uma identificação em relação à SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 ou SEQ ID NO:26 superior a 80%, preferencialmente superior a 90%, ou ainda mais preferencialmente superior a 95%.

Em uma concretização preferida, a proteína Fel d1 é uma proteína Fel d1 recombinante, em que pelo menos uma ligação dissulfeto é desfeita, preferencialmente por mutação, mais preferencialmente por substituição conservadora, como de Cis para Ser. Três pontes dissulfeto entre cadeias, ligando os dois peptídeos nativos da Fel d1 foram identificadas, ou seja, Cis3(1)-Cis73(2), Cis44(1)-48Cis(2) e Cis70(I)-Cis7(2), sugerindo uma orientação antiparalela de peptídeos da Fel d1. (Kristensen, A. K., et al. (1997) Biol Chem 378, 899-908). Em outra concretização preferida, uma ligação dissulfeto da proteína Fel d1 é desfeita. Em outra concretização preferida ainda, duas destas ligações dissulfeto da proteína Fel d1 são desfeitas. E, ainda em uma outra concretização preferida, todas as três destas ligações dissulfeto da proteína Fel d1 são desfeitas. Em uma concretização preferida, a Cis70 da cadeia 1 é excluída ou sofre mutação. Em uma outra concretiza-

ção preferida, a Cis73 da cadeia é excluída ou sofre mutação. Em uma concretização preferida, a referida proteína Fel d1 é uma proteína de fusão compreendendo a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1, fundidas diretamente ou por meio de um espaçador, em que todas as três destas ligações dissulfeto são desfeitas. Em uma outra concretização preferida, a referida proteína Fel d1, compreendendo ou, alternativamente, sendo constituída por seqüência de aminoácido conforme a SEQ ID NO:24, 55 ou 57, em que, pelo menos uma, preferencialmente, pelo menos, três, e ainda mais preferencialmente, pelo menos, cinco cisteínas são removidas por substituição ou exclusão.

Em uma concretização de preferência, o antígeno da invenção compreende ou, alternativamente, é constituído por um fragmento da Fel d1. É fato conhecido que a posse de imunogenicidade não requer geralmente a extensão completa de uma proteína e que uma proteína geralmente contém mais de um epítipo antigênico, isto é, sítio antigênico. Um fragmento ou um peptídeo curto pode ser suficiente para conter, pelo menos, um sítio antigênico que possa se ligar imuno especificamente a um anticorpo ou um receptor de célula T, no contexto de uma molécula MHC. Sítio ou sítios antigênicos podem ser determinados por algumas técnicas conhecidas geralmente da pessoa capacitada na técnica. Essa determinação pode ser efetuada por alinhamento de seqüência e predição de estrutura. A título de exemplo, é possível prever possíveis α -hélices, voltas, ligações dissulfeto intra e entre cadeias, etc., utilizando um programa como o Rasmol. É possível ainda prever seqüências que estão inseridas na molécula ou seqüências que estão expostas na superfície da molécula. Seqüências expostas na superfície da molécula são mais possíveis de compreender sítio(s) natural(is) antigênico(s) e, dessa forma, são úteis na indução de anticorpos terapêuticos. Após uma seqüência de peptídeo de superfície ter sido determinada, o sítio antigênico nesta seqüência pode ainda ser definido, por exemplo, por processos intensos de mutagênese (como mutagênese de seleção de alanina, Cunningham BC, Wells JA. Science 1989 Jun 2; 244(4908):1081-5). Resumidamente, aminoácidos nesta seqüência sofrem mutações, uma a uma, para alanina

e os aminoácidos cujas mutações de alanina mostram, respectivamente, redução da capacidade de ligação a um anticorpo (cultivado contra a sequência do tipo natural), ou a perda total da capacidade de ligação, são possivelmente componentes do sítio antigênico. Outro processo para determinar sítio(s) antigênico(s) é gerar superposição de peptídeos que cobrem a extensão toda da sequência da Fel d1 (Geysen, PNAS Vol 81: 3998-4002, (1984) e Sloodstra, J. W. et al., (1996) Mol. Divers. 1, 87-96).

Em uma concretização de preferência, o antígeno da invenção compreende ou, alternativamente, é constituído por pelo menos um, preferencialmente por pelo menos dois epítomos da Fel d1, mais preferencialmente por pelo menos um epítopo que derive da cadeia 1 da Fel d1 e, pelo menos, um epítopo que derive da cadeia 2 da Fel d1.

Os epítomos reativos de célula T da Fel d1 foram mapeados em toda a proteína Fel d1 e foram expostos em técnicas anteriores, como no quarto parágrafo da coluna 14 da US 6120769 e na coluna 130 e 131 da US6025162, sendo estas exposições incorporadas aqui por referência. Em uma concretização de preferência, o epítopo de célula T da Fel d1 é selecionado de um grupo composto por: SEQ ID NO: 27-32.

A presente invenção provê um processo para produção da composição da invenção compreendendo (a) fornecimento de uma VLP com pelo menos um sítio de fixação; (b) fornecendo pelo menos um antígeno, em que o referido antígeno é uma proteína Fel d1 ou um fragmento de Fel d1, com pelo menos um segundo sítio de fixação; e (c) a combinação da referida VLP e o referido, pelo menos, um antígeno, para produção da referida composição, em que o referido, pelo menos, um antígeno e a referida VLP estão ligados pelo primeiro e o segundo sítio de fixação. Em uma concretização de preferência, o fornecimento do, pelo menos, único antígeno, isto é, uma proteína Fel d1 ou um fragmento de Fel d1 com o, pelo menos, único segundo sítio de fixação ocorre por expressão, preferencialmente, por expressão em um sistema bacteriano, preferencialmente em *E. coli*. Geralmente um códon de parada (*tag*), como His tag, Mic tag é acrescentado para facilitar o processo de purificação. Em ainda outra abordagem específica, os fragmentos

de Fel d1, com menos de 50 aminoácidos, podem ser quimicamente sintetizados.

Em uma concretização preferida da invenção, a VLP com pelo menos um único primeiro sítio de fixação é ligada à Fel d1 da invenção, com pelo menos um único segundo sítio de fixação, por meio de pelo menos uma
5 ligação peptídica. O gene que codifica a Fel d1 da invenção, preferencialmente o fragmento de Fel d1, mais preferencialmente um fragmento com no máximo 50 aminoácidos e ainda mais preferencialmente com menos de 30 aminoácidos, é ligado dentro da estrutura (*in-frame*), seja internamente ou
10 preferencialmente ao N ou C-terminal do gene que codifica a proteína de revestimento da VLP. Concretizações do uso do antígeno da invenção para proteína de revestimento, ou mutantes ou fragmentos da mesma, para uma proteína de revestimento de um vírus, foram descritas na linha 20 da página 62 à linha 17 da página 68 do WO 2004/009124, sendo estas aqui incorporadas por referência.
15

Em uma concretização de preferência, um fragmento de Fel d1 é fundido ao N ou C-terminal de uma proteína de revestimento, ou mutantes ou fragmentos da mesma, de RNA fago AP205. Em ainda outra concretização de preferência, a proteína de fusão compreende ainda um espaçador,
20 em que o referido espaçador é fundido à proteína de revestimento, ou fragmentos ou mutantes da mesma, de AP205 e a um fragmento de Fel d1.

Em uma concretização preferida da presente invenção, a composição compreende ou, alternativamente, é constituída essencialmente por uma partícula semelhante a vírus com, pelo menos, um primeiro sítio de
25 fixação ligado a uma pelo menos Fel d1 da invenção, com pelo menos um segundo sítio de fixação por meio de, pelo menos, uma ligação covalente, e preferencialmente esta ligação covalente é uma ligação não peptídica. Em uma concretização preferida da presente invenção, o primeiro sítio de fixação compreende ou, preferencialmente, é um grupo amina e, preferencialmente, o grupo amina é um resíduo de lisina. Em outra concretização prefe-
30 rida da presente invenção, o segundo sítio de fixação compreende ou, preferencialmente, é um grupo sulfidril e, preferencialmente, um grupo sulfidril

de uma cisteína.

Em uma concretização muito preferida da invenção, o, pelo menos, único primeiro sítio de fixação é um grupo amino, preferencialmente um grupo amina de um resíduo de lisina e o, pelo menos, único segundo sítio de fixação é um grupo sulfidril, preferencialmente um grupo sulfidril de uma cisteína.

Em uma concretização de preferência da invenção, a Fel d1 da invenção é ligada à VLP por meio de uma ligação química cruzada, típica e preferencialmente utilizando um ligador cruzado heterobifuncional. Em concretizações preferidas, o ligador cruzado heterobifuncional contém um grupo funcional que pode reagir com os primeiros sítios de fixação preferidos, preferencialmente com o grupo amina, mais preferencialmente com os grupos aminas de resíduo(s) de lisina da VLP e ainda um outro grupo funcional que pode reagir com o segundo sítio de fixação preferido, isto é, um grupo sulfidril, preferencialmente de resíduo de cisteína(s), inerentes ou artificialmente acrescentadas à Fel d1 da invenção, e opcionalmente também disponibilizadas para reação por redução. Diversos ligadores cruzados heterobifuncinais são conhecidos na técnica. Eles incluem os ligadores cruzados preferidos SMPH (Pierce), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCS, Sulfo-GMBS, Sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo-SMCC, SVSB, SIA e outros ligadores cruzados disponíveis, por exemplo, da Pierce Chemical Company, e que possuem um grupo funcional reativo para grupos amina e um grupo funcional reativo para grupos sulfidril. Todos os ligadores cruzados mencionados acima levam à formação de uma ligação amida após reação com o grupo amina e uma ligação tioéter com os grupos sulfidril. Outra classe de ligadores cruzados, adequados na prática da invenção, é caracterizada pela introdução de uma ligação dissulfeto entre a Fel d1 da invenção e a VLP no acoplamento. Ligadores cruzados de preferência pertencem a esta classe e incluem, por exemplo, SPDP e Sulfo-LC-SPDP (Pierce).

Em uma concretização preferida, a composição da invenção compreende ainda um ligador. A engenharia de um segundo sítio de fixação na Fel d1 da invenção é obtida pela associação de um ligador, o qual conte-

nha preferencialmente, pelo menos, um aminoácido adequado como segundo sítio de fixação, de acordo com as exposições desta invenção. Por conseguinte, em uma concretização preferida da presente invenção, um ligador é associado à Fel d1 da invenção por, pelo menos, uma ligação covalente, preferencialmente por, pelo menos, tipicamente uma ligação peptídica. Preferencialmente, o ligador compreende ou, alternativamente, é constituído pelo segundo sítio de fixação. Em ainda outra concretização preferida, o ligador compreende um grupo sulfidrila, preferencialmente de um resíduo de cisteína. Em uma outra concretização preferida, o ligador aminoácido é um resíduo de cisteína.

A seleção de um ligador dependerá da natureza da Fel d1 da invenção, de suas propriedades bioquímica, como pl, distribuição de carga e glicosilação. De uma maneira geral, ligadores aminoácidos flexíveis são os preferidos. Em ainda outra concretização preferida da presente invenção, o ligador consiste em aminoácidos, em que, ainda preferencialmente, o ligador consiste em, no máximo, 25, preferencialmente em, no máximo, 20 e ainda mais preferencialmente em no máximo 15 aminoácidos. Em uma, mais uma vez preferida, concretização da invenção, o ligador aminoácido não contém mais de 10 aminoácidos. Concretizações preferidas do ligador são selecionadas do grupo composto por: (a) CGG; (b) ligador N-terminal gama 1 (por exemplo, CGDKTHTSPP, SEQ ID NO:58); (c) ligador N-terminal gama 3 (por exemplo, CGGPKPSTPPGSSGGAP, SEQ ID NO:69); (d) regiões articuladas de Ig; (e) ligadores N-terminal glicina (por exemplo, GCGGGG, SEQ ID NO:59); (f) (G)kC(G)n com n=0-12 e k=0-5; (g) ligadores N-terminal glicina-serina ((GGGGS)n, n=1-3, com ainda outra cisteína, (por exemplo, SEQ ID NO:60, que corresponde a uma concretização em que n=1); (h) (G)kC(G)m(S)l(GGGGS)n, com n=0-3, k=0-5, m=0-10, l=0-2 (por exemplo, SEQ ID NO:61, que corresponde a uma concretização em que n=1, k=1, l=1 e m=1); (i) GGC; (k) GGC-NH₂; (l) ligador C-terminal gama 1 (por exemplo, DKTHTSPPCG, SEQ ID NO:62); (m) ligador C-terminal gama 3 (por exemplo, PKPSTPPGSSGGAPGGCG, SEQ ID NO:63); (n) ligadores C-terminal glicina (GGGGCG, SEQ ID NO:64); (o) (G)nC(G)k, com n=0-12 e k=0-5; (p)

ligadores C-terminal glicina-serina ((SGGGG)_n, $n=1-3$ com uma cisteína adicional (por exemplo, SEQ ID NO:65, que corresponde a uma concretização, em que $n=1$)); (q) (G)_m(S)l(GGGGS)_n(G)oC(G)_k, com $n=0-3$, $k=0-5$, $m=0-10$, $l=0-2$, e $o=0-8$ (por exemplo, SEQ ID NO:66, que corresponde a uma concretização, em que $n=1$, $k=1$, $l=1$, $o=1$ e $m=1$). Em ainda uma outra concretização preferida, o ligador é acrescentado ao N-terminal da Fel d1 da invenção. Em ainda outra concretização preferida da invenção, o ligador é acrescentado ao C-terminal da Fel d1 da invenção.

Ligadores preferidos, de acordo com esta invenção, são ligadores de glicina (G)_n, contendo ainda um resíduo de cisteína como segundo sítio de fixação, como o ligador N-terminal glicina (GCGGGG) e ligador C-terminal glicina (GGGGCG). Outras concretizações preferidas são o ligador C-terminal glicina-lisina (GGKKGC, SEQ ID NO:67) e ligador N-terminal glicina-lisina (CGKKGG, SEQ ID NO:68), ligadores GGCG a GGC ou GGC-NH₂ ("NH₂" designando amidação) no C-terminal do peptídeo ou CGG em seu N-terminal. Geralmente, resíduos de glicina serão inseridos entre aminoácidos a granel e a cisteína a serem utilizados como segundo sítio de fixação, de forma a evitar impedimento estérico do aminoácido a granel na reação de acoplamento.

Em uma concretização de preferência, o ligador é fundido ao N-terminal da proteína Fel d1 ou fragmento de Fel d1. Em ainda outra concretização preferida, o ligador é GCGG. Em outra concretização de preferência, o ligador é fundido ao C-terminal da proteína Fel d1 ou fragmento de Fel d1. Em ainda outra concretização preferida, o ligador é GGC. No caso da proteína Fel d1 ou fragmento de Fel d1 serem constituídos por duas cadeias de polipeptídeos, esta proteína Fel d1 ou o fragmento de Fel d1 possui duas porções N-terminal e duas porções C-terminal. O ligador pode ser fundido às duas porções N-terminal ou as duas porções C-terminal. Preferencialmente, o ligador é fundido a somente uma das duas porções N-terminal ou a somente uma das duas porções C-terminal.

A ligação da Fel d1 da invenção à VLP, usando um ligador cruzado heterobifuncional, de acordo com os processos preferidos descritos

acima, permite o acoplamento da Fel d1 da invenção à VLP de maneira orientada. Outros processos de ligação da Fel d1 da invenção à VLP incluem processos em que a Fel d1 da invenção é ligada cruzada à VLP, utilizando o carbodiimida EDC e NHS. A Fel d1 da invenção pode ser também inicialmente tiolada, por meio de reação, por exemplo, com SATA, SATP ou imino-tiolano. A Fel d1 da invenção, após ter sido retirada a proteção, pode ser em seguida acoplada à VLP da forma como segue. Após a separação do excesso do reagente de tiolação, a Fel d1 da invenção reage com a VLP, previamente ativada com um ligador cruzado heterobifuncional, compreendendo uma porção reativa de cisteína e exibindo, por conseguinte, pelo menos um ou diversos grupos funcionais reativos para resíduos de cisteína, com os quais a Fel d1 tiolada da invenção pode reagir, conforme descrito acima. Opcionalmente, quantidades baixas de um agente redutor são incluídas na mistura da reação. Em ainda outros processos, a Fel d1 da invenção é anexada à VLP, utilizando um ligador cruzado homobifuncional, como glutaraldeído, DSG, BM[PEO]4, BS3, (Pierce) ou outros ligadores cruzados homobifuncionais conhecidos com grupos funcionais reativos para grupos amina ou grupos carboxila da VLP.

Em ainda outras concretizações da presente invenção, a composição compreende ou, alternativamente, é essencialmente constituída por uma partícula semelhante a vírus ligada à Fel d1 da invenção por meio de interações químicas, em que, pelo menos, uma destas interações não é uma ligação covalente. Por exemplo, a ligação da VLP à Fel d1 da invenção pode ser efetuada por biotinilação da VLP e expressão da Fel d1 da invenção sob a forma de uma proteína de fusão-estreptavidina.

Uma ou diversas moléculas de antígeno, isto é, a Fel d1 da invenção, pode ser anexada a uma subunidade da VLP, preferencialmente de proteínas de revestimento de RNA fago, preferencialmente pelos resíduos de lisina expostos das proteínas de revestimento da VLP de RNA fago, se estericamente possível. Uma característica específica de VLPs de RNA fago e, particularmente de VLP com proteína de revestimento Q β é possibilitar, dessa forma, o acoplamento de diversos antígenos por subunidade. Isso

permite a geração de um arranjo repleto de antígeno.

Em concretizações muito preferidas da invenção, a Fel d1 da invenção é ligada, por meio de um resíduo de cisteína, que foi acrescentado ao N-terminal ou o C-terminal da Fel d1 da invenção, ou resíduo natural de cisteína contido na Fel d1 da invenção, a resíduos de lisina de proteínas de revestimento das VLPs de RNA fago e, particularmente, à proteína de revestimento de Q β .

Como descrito acima, há quatro resíduos de lisina expostos na superfície da VLP de proteína de revestimento de Q β . Típica e preferencialmente, estes resíduos são derivatizados ao reagirem com uma molécula de um ligador cruzado. Caso nem todos os resíduos de lisina expostos possam ser acoplados a um antígeno, os resíduos de lisina que reagiram com o ligador cruzado são deixados com uma molécula do ligador cruzado, anexada ao grupo ϵ -amina após a etapa de derivatização. Isso leva ao desaparecimento de uma ou diversas cargas positivas, podendo prejudicar a solubilidade e estabilidade da VLP. Pela substituição de alguns dos resíduos de lisina com argininas, conforme nos mutantes de proteína de revestimento Q β , impedimos o desaparecimento excessivo de cargas positivas uma vez que os resíduos de arginina não reagem com os ligadores cruzados de preferência. Ademais, a substituição de resíduos de lisina por resíduos de arginina pode levar a arranjos antigênicos mais definidos, uma vez que um número menos de sítios está disponível para reação com o antígeno.

De acordo com o precedente, resíduos de lisina expostos foram substituídos por argininas nos seguintes mutantes de proteína de revestimento Q β : Q β -240 (Lis13-Arg; SEQ ID NO:15), Q β -250 (Lis 2-Arg, Lis13-Arg; SEQ ID NO:17), Q β -259 (Lis 2-Arg, Lis16-Arg; SEQ ID NO:19) e Q β -251; (Lis16-Arg, SEQ ID NO:18). Em ainda outra concretização, expomos uma proteína de revestimento Q β mutante com um resíduo adicional de lisina Q β -243 (Asn 10-Lis; SEQ ID NO:16), adequado para se obter arranjos antigênicos com uma densidade mais alta.

Em uma concretização preferida da invenção, a VLP da invenção é produzida por recombinação por um hospedeiro em que a referida

VLP é essencialmente livre do RNA do hospedeiro, preferencialmente de ácidos nucleicos do hospedeiro. Em ainda outra concretização preferida, a composição compreende ainda, pelo menos, uma macromolécula polianiônica ligada, preferencialmente empacotada ou inserida na VLP. Em ainda outra concretização preferida, a macromolécula polianiônica é o ácido poliglú-
5 tâmico e/ou ácido poliaspártico.

Essencialmente livre de RNA do hospedeiro, preferencialmente de ácidos nucleicos do hospedeiro. O termo "essencialmente livre de RNA do hospedeiro, preferencialmente de ácidos nucleicos do hospedeiro", con-
10 forme utilizado no presente, refere-se à quantidade de RNA do hospedeiro, preferencialmente de ácidos nucleicos do hospedeiro, compreendido pela VLP, sendo esta quantidade típica e preferencialmente inferior a 30 µg, preferencialmente inferior a 20 µg, mais preferencialmente inferior a 10 µg, ainda mais preferencialmente inferior a 8 µg, ainda mais preferencialmente infe-
15 rior a 6 µg, ainda mais preferencialmente inferior a 4 µg e mais preferencialmente ainda inferior a 2 µg por mg da VLP. Hospedeiro, conforme utilizado no contexto precedente, refere-se ao hospedeiro no qual a VPL é produzida por recombinação. Métodos convencionais para determinação da quantidade RNA, preferencialmente de ácidos nucleicos, são conhecidos pela pessoa
20 capacitada na técnica. O método típico e preferido para determinar a quantidade de RNA, preferencialmente de ácidos nucleicos, de acordo com a presente invenção, é descrito no Exemplo 17 do PCT/EP2005/055009, protocolizado em 05 de outubro de 2005, pelo mesmo designador. Condições idênticas, semelhantes ou análogas são típica e preferencialmente utilizadas pa-
25 ra a determinação da quantidade de RNA, preferencialmente de ácidos nucleicos, para composições da invenção, compreendendo VLPs diferentes da Qβ. As modificações das condições eventualmente necessárias fazem parte do conhecimento da pessoa capacitada na técnica. O valor numérico das quantidades determinadas deve típica e preferencialmente ser entendido
30 como compreendendo valores que distanciem ± 10%, preferencialmente que se distanciem ± 5% do valor numérico indicado.

Molécula polianiônica: O termo "macromolécula polianiônica",

conforme utilizado no presente, refere-se a uma molécula de alta massa molecular relativa que compreenda grupos repetidos de carga negativa, a estrutura da qual essencialmente compreendendo a repetição múltipla de unidades que são derivadas, realmente efetiva ou conceitualmente, de moléculas de baixa massa molecular relativa. Uma macromolécula polianiônica deve possuir um peso molecular de pelo menos 2000 Dálton, mais preferencialmente de, pelo menos, 3000 Dálton e ainda mais preferencialmente de, pelo menos, 5000 Dálton. O termo "macromolécula polianiônica", conforme utilizado no presente, refere-se típica e preferencialmente a uma molécula que não é capaz de ativar receptores Toll-like. Dessa forma, o termo "macromolécula polianiônica" típica e preferencialmente exclui ligantes de receptores Toll-like e, ainda mais preferencialmente, exclui substâncias imunoestimulantes como ligantes de receptores Toll-like, ácidos nucleicos imunoestimulantes e lipopolissacarídeos (LPS). Mais preferencialmente, o termo "macromolécula polianiônica", conforme utilizado no presente, refere-se a uma molécula que não é capaz de induzir produção de citocina. Ainda mais preferencialmente, o termo "macromolécula polianiônica" exclui substâncias imunoestimulantes. O termo "substância imunoestimulante", conforme utilizado no presente, refere-se a uma molécula que é capaz de induzir e/ou aprimorar resposta imunológica especificamente contra o antígeno compreendido na presente invenção.

RNA de hospedeiro, preferencialmente ácidos nucleicos de hospedeiro: O termo "RNA de hospedeiro, preferencialmente ácidos nucleicos de hospedeiro" ou o termo "RNA de hospedeiro, preferencialmente ácidos nucleicos de hospedeiro com estrutura secundária", conforme utilizados no presente, refere-se ao RNA, preferencialmente ácidos nucleicos que são sintetizados originalmente pelo hospedeiro. O RNA, preferencialmente ácidos nucleicos, pode, no entanto, ser submetidos a alterações químicas e/ou físicas, durante o processo para reduzir ou suprimir a quantidade de RNA, preferencialmente de ácidos nucleicos, típica e preferencialmente por meio dos processos da invenção, por exemplo, o tamanho do RNA, preferencialmente de ácidos nucleicos, pode ser encurtado ou a estrutura secundária do

mesmo pode ser alterada. No entanto, mesmo este RNA ou ácidos nucléicos resultantes são ainda considerados RNA de hospedeiro ou ácidos nucléicos de hospedeiro.

Métodos para determinar a quantidade de RNA e para reduzir a
5 quantidade de RNA compreendido pela VLP, foram descritos no
PCT/EP2005/055009, protocolizado pelo mesmo designador em 05 de outubro de 2005, e, dessa forma, o pedido em sua totalidade é aqui incorporado por referência. A redução ou eliminação da quantidade de RNA do hospedeiro, preferencialmente ácido nucléico do hospedeiro, minimiza ou reduz res-
10 postas não desejadas de células T, como resposta inflamatória de célula R e resposta citotóxica de célula T, e outros efeitos colaterais não desejados, como febre, enquanto mantém forte resposta de anticorpo especificamente contra a Fel d1.

Em uma concretização de preferência, esta invenção provê um
15 processo para o preparo das composições da invenção e de VLP de um RNA bacteriófago – Fel d1 da invenção, em que a referida VLP é produzida por recombinação por um hospedeiro e em que a referida VLP é essencialmente livre de RNA do hospedeiro, preferencialmente de ácidos nucléicos do hospedeiro, compreendendo as etapas de: a) produção por recombinação
20 de uma partícula semelhante a vírus (VLP), com pelo menos um primeiro sítio de fixação, por um hospedeiro, em que a referida VLP compreende proteínas de revestimento, variantes ou fragmentos das mesmas, de um RNA bacteriófago; b) desmontagem da referida partícula semelhante a vírus para as referidas proteínas de revestimento, variantes ou fragmentos das mes-
25 mas, do referido RNA bacteriófago; c) purificação das referidas proteínas de revestimento, variantes ou fragmentos das mesmas, do referido RNA bacteriófago para uma partícula semelhante a vírus, em que a referida partícula semelhante a vírus é essencialmente livre de RNA do hospedeiro, preferencialmente de ácidos nucléicos do hospedeiro; e e) a ligação de pelo menos
30 um antígeno da invenção com pelo menos um segundo sítio de fixação com a referida VLP obtida da etapa (d). Em ainda outra concretização de preferência, a remontagem das referidas proteínas de revestimento purificadas,

variantes ou fragmentos das mesmas, é efetuada na presença de pelo menos uma macromolécula polianiônica.

Em uma concretização preferida, a composição da invenção compreende ainda pelo menos uma substância imunoestimulante capaz de induzir e/o aprimorar uma resposta imunológica. Preferencialmente a substância imunoestimulante é um ligante do receptor Toll-like, preferencialmente selecionada do grupo composto por: (a) ácidos nucleicos imunoestimulantes; (b) peptídeoglicanos; (c) lipopolissacarídeos; (d) ácidos lipoteicônicos; (e) compostos imidazoquinolinas; (f) flagelinas; (g) lipoproteínas; (h) moléculas orgânicas imunoestimulantes; (i) oligonucleotídeos contendo CpG não metilado; e (j) quaisquer misturas de (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i).

Em ainda outra concretização preferida, o ácido nucleico imunoestimulante é preferencialmente selecionado do grupo composto por: (a) um ácido nucleico de origem bacteriana; (b) um ácido nucleico de origem viral; (c) um ácido nucleico compreendendo um motivo CpG não metilado; (d) um RNA dupla fita; (e) um RNA fita simples; e (g) um ácido nucleico livre de motivo CpG não metilado. Ácidos nucleicos imunoestimulantes que não contêm motivo CpG não metilado foram descritos na técnica anterior, por exemplo, na WO01/22972. O termo "ácido nucleico", conforme utilizado no presente, refere-se a uma molécula composta por monômeros (nucleotídeos) lineares ligados covalentemente. Ele indica uma cadeia molecular de nucleotídeos e não se refere a uma extensão específica do produto. Dessa forma, oligonucleotídeos estão incluídos na definição de ácido nucleico. A ligação entre os nucleotídeos é típica e preferencialmente uma ligação fosfodiéster. Também são abrangidos por esta invenção, ácidos nucleicos que compreendam modificações de ligação como, por exemplo, uma ligação fosforotioato.

Em uma concretização preferida, a substância imunoestimulante é misturada com a VLP recombinante. Em ainda outra concretização preferida, a substância imunoestimulante está ligada, preferencialmente inserida, a VLP da invenção.

Descrições detalhadas de substância imunoestimulante, particularmente ácido nucleico imunoestimulante, mais particularmente, oligonucle-

otídeos compreendendo CpG não metilada foram expostas no WO 03/024480, 03/024481 e PCT/EP/04/003165. Métodos para mistura de substâncias imunoestimulantes com a VLP-antígeno foram expostos no WO 03/024480. Métodos de empacotamento de substâncias imunoestimulantes no interior da VLP foram expostos no WO 03/024481. Os pedidos WO 03/024480, 03/024481 e a PCT/EP/04/003165 em sua totalidade são aqui incorporados por referência. VLP pode geralmente induzir e/ou aprimorar o sistema imunológico. No entanto, o termo "substância imunoestimulante", conforme utilizado no contexto deste pedido, refere-se a uma substância imunoestimulante diferente da VLP utilizada para as composições da invenção, em vez de se acrescentar à referida VLP.

A inclusão de substâncias imunoestimulantes, preferencialmente ácidos nucleicos imunoestimulantes, na composição da invenção pode direcionar as respostas imunológicas para respostas Th1 e, pelo mesmo, suprimir as respostas Th2.

Em uma característica, a invenção fornece uma vacina compreendendo a composição da invenção. Em uma característica, a invenção fornece uma vacina compreendendo a composição da invenção e um tampão adequado. Em uma concretização preferida, a composição da vacina compreende ainda um adjuvante. A administração de, pelo menos, o único adjuvante pode, pelo presente, ocorrer antes, simultaneamente ou após a administração da composição da invenção. O termo "adjuvante", conforme utilizado no presente, refere-se a estimulantes não específicos da resposta imunológica que permitem a geração de um acúmulo no hospedeiro, o qual quando combinado com a vacina e uma composição farmacêutica, respectivamente, da presente invenção pode proporcionar uma resposta imunológica ainda mais aprimorada.

Em outra concretização preferida, a composição da vacina é desprovida de adjuvante. Uma característica vantajosa da presente invenção é a alta imunogenicidade da composição, mesmo na ausência de adjuvantes. O uso evitado de adjuvantes pode reduzir uma possível ocorrência de efeitos colaterais, relativos ao uso de adjuvantes. Dessa forma, a adminis-

tração da vacina da invenção para um pacientes ocorrerá preferencialmente sem a administração de, pelo menos um adjuvante para o mesmo paciente antes, simultaneamente ou após a administração da vacina.

5 A invenção descreve ainda um método para imunização compreendendo a administração da vacina da presente invenção para um mamífero humano ou não humano, como um cachorro ou gato. Sem pretender limitar a presente invenção pela teoria, a injeção da composição da vacina para um gato pode neutralizar a Fel d1 e, por conseguinte, reduzir a quantidade de Fel d1 na saliva do gato.

10 A vacina pode ser administrada por diversos modos conhecidos na técnica, porém será normalmente administrada por injeção, infusão, inalação, administração oral ou outros modos físicos adequados. Os conjugados poderão ser alternativamente administrados pelas vias intramuscular, intravenosa, transmucosa, transcutânea, intranasal, intraperitoneal ou subcu-
15 tânea. Componentes de conjugados para administração incluem soluções estéreis aquosas (por exemplo, solução salina fisiológica) e não aquosas e suspensões. Exemplos de solventes não aquosos são o propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais, como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, como etil oleato. Veículos ou curativos oclusivos podem ser utilizados
20 para aumentar a permeabilidade cutânea e melhorar a absorção do antígeno.

Vacinas da invenção são consideradas como "farmacologicamente aceitáveis" se a sua administração puder ser tolerada por um recipiente individual. E ainda, as vacinas da invenção serão administradas em
25 uma "quantidade terapeuticamente eficaz" (isto é, uma quantidade que produza um efeito fisiológico desejado). A natureza ou tipo de resposta imunológica não é um fator limitante desta exposição. Sem pretender limitar a presente invenção pela explicação do mecanismo seguinte, a vacina da invenção talvez induza anticorpos, presumivelmente subtipos de IgG, os quais se
30 ligam à Fel d1, impedindo dessa forma que a Fel d1 seja vista pelo IgE ligado a mastócitos e basófilos. Alternativa ou simultaneamente, a composição da presente invenção direciona as respostas imunológicas para respostas

Th1, suprimindo o desenvolvimento de respostas Th2 e, por conseguinte, a produção de anticorpos IgE, um dos principais componentes em reações alérgicas.

Em um aspecto, a invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo a composição, conforme descrita na presente invenção, e um veículo farmacêutico aceitável. Quando a vacina da invenção é administrada a um indivíduo, ela pode estar em uma forma que contenha sais, tampões, adjuvantes ou outras substâncias que são convenientes para melhorar a eficácia do conjugado. Exemplos de materiais adequados para uso no preparo de composições farmacêuticas são fornecidos em diversas fontes, incluindo REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Osol, A, ed., Mack Publishing Co., (1990)).

A invenção ensina um processo para a produção da composição da invenção compreendo as etapas de: a) fornecimento de uma partícula central com pelo menos um sítio de fixação, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus ou uma partícula viral; (b) fornecimento de pelo menos um antígeno, em que o referido antígeno é uma proteína Fel d1 ou um fragmento de Fel d1, com pelo menos um segundo sítio de fixação; e (c) a combinação da referida partícula central e o referido, pelo menos, um antígeno, para produção da referida composição, em que o referido, pelo menos, um antígeno e a referida VLP estão ligados pelo primeiro e o segundo sítio de fixação.

Em uma outra concretização de preferência, a etapa para o fornecimento de partícula central, com pelo menos um único primeiro sítio de fixação, compreende ainda as etapas: (a) desmontagem da referida partícula central para proteínas de revestimento, mutantes ou fragmentos das mesmas, da referida partícula central; (b) purificação das referidas proteínas de revestimento, mutantes ou fragmentos das mesmas; (c) remontagem das referidas proteínas de revestimento purificadas, da referida partícula central, em que a referida partícula central é essencialmente livre de RNA do hospedeiro, preferencialmente de ácidos nucleicos do hospedeiro. Em ainda uma outra concretização preferida, a remontagem das referidas proteínas de re-

vestimento purificadas é efetuada na presença de pelo menos uma macromolécula polianiônica ou, pelo menos, um ácido nucléico imunoestimulante.

Em um aspecto, a invenção provê um método de uso das composições da invenção para prevenção e/ou tratamento de alergia a gatos em um mamífero, em que preferencialmente o referido mamífero é humano ou um cachorro.

Em um aspecto, a invenção expõe uso da composição da invenção como um medicamento. Em outro aspecto, a invenção provê o uso da composição da invenção para a fabricação de um medicamento para tratamento de alergia a gato em um mamífero, em que preferencialmente o referido mamífero é um ser humano ou um cachorro.

Em um aspecto, esta invenção fornece uma proteína de fusão da Fel d1, compreendendo a cadeia 1 da Fel d1 e a cadeia 2 da Fel d1 fundidas por meio de um espaçador de aminoácidos que liga o N-terminal de uma cadeia ao C-terminal da outra cadeia, em que o referido espaçador é constituído por uma seqüência de aminoácidos com 10-30, preferencialmente 10-25, preferencialmente 10-20, preferencialmente 13-20, preferencialmente 15-20, preferencialmente 13-17 e preferencialmente 15-17 aminoácidos e, em que a referida proteína de fusão não é uma proteína de fusão que compreenda a cadeia 1 da SEQ ID NO:22 fundida através de (GGGGS)₃ ao N-terminal da cadeia 2 da SEQ ID NO:23, 25 ou 26, e em que a referida proteína de fusão recusada é expressada em sistema de expressão de baculovírus.

A WO2004094639 descreve uma proteína de fusão Fel d1 pela ligação da cadeia 1 e cadeia 2 com um ligador selecionado de uma ligação carbono-nitrogênio e um peptídeo curto, isto é, com de 1 a 9, preferencialmente de 1 a 5 e, particularmente preferível de 1 a 3 aminoácidos. Ele ainda afirma que surpreendentemente uma ligação ou peptídeo curto não induz restrições ou desdobramentos relevantes. No entanto o WO2004094639 deixa de mencionar um ligador mais extenso do que 9 aminoácidos.

O WO 00/20032 descreve a Fel D1 recombinante, expressada pelo baculovírus, compreendendo cadeia 1 e cadeia 2, expressadas em sé-

rie e unidas por um ligador glicina/serina (GGGGS)₃. A WO 00/20032 relatou também que a imunorreatividade da rFel d1 para anticorpo IgG e IgE é expressivamente aprimorada pela expressão do alérgeno no baculovírus, comparado ao alérgeno expressado em *E. coli*.

5 A proteína de fusão Fel d1 da invenção pode ser produzida em um sistema de expressão procariótico ou em um sistema de expressão eucariótico, como um sistema baculovírus. Em uma concretização de preferência, a referida proteína de fusão Fel d1 da invenção é produzida a partir do *E. coli*.

10 Em uma concretização de preferência, o espaçador, compreendido pela proteína de fusão Fel d1, é constituído por uma seqüência de aminoácidos com 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 resíduos de aminoácidos.

Em uma concretização preferida, o espaçador, compreendido pela proteína de fusão Fel d1, é constituído por uma seqüência de aminoácidos com 2, 3 ou 4 quatro repetições de GGGGS.

Em uma concretização preferida, a cadeia 2 da Fel d1 está no N-terminal da proteína de fusão da invenção.

Em outra concretização preferida, a cadeia 1 da Fel d1 está no N-terminal da proteína de fusão da invenção. Em uma outra concretização preferida, a proteína de fusão é produzida a partir do *E. coli*.

Em uma concretização muito preferida, a proteína de fusão Fel d1 da invenção compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo composto por: (a) SEQ ID NO:54; (b) SEQ ID NO:55; e (c) SEQ ID NO:57. A invenção fornece ainda a seqüência de nucleotídeo que codifica a proteína de fusão Fel d1 da invenção. Em uma concretização de preferência, a invenção fornece uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína de fusão da invenção, selecionada do grupo composto por: (a) SEQ ID NO:54; (b) SEQ ID NO:55; e (c) SEQ ID NO:57. Em ainda uma outra concretização de preferência, a proteína de fusão Fel d1 da invenção é produzida em *E. coli*. Em outra concretização de preferência, a proteína de fusão Fel d1 da invenção compreende ou, alternativamente, é constituída por uma se-

qüência de aminoácidos da SEQ ID NO:57, em que a referida proteína de fusão da invenção é produzida em *E. coli*.

Em um aspecto, a invenção proporciona um uso da proteína de fusão Fel d1 da invenção para diagnóstico e tratamento de alergia a gato.

5 EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Preparo de VLPs de Q β da invenção por desmontagem/remontagem na presença de macromoléculas polianiónicas diferentes, resultando em VLPS de Q β remontados.

10 (A) Desmontagem de VLP de Q β de técnica anterior

45 mg de VLP Q β da técnica anterior (2,5 mg/ml, conforme determinado por análise de Bradford) em PBS (Fosfato a 20 mM, NaCl a 150 mM NaCl, pH 7,5), purificado de lisado de *E. coli*, foi reduzido com DTT a 10 mM por 15 min em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, foi acrescentado cloreto de magnésio até uma concentração final de 0,7 M e a incubação continuou por 15 min em temperatura ambiente, sob agitação, levando à precipitação do RNA encapsulado da célula hospedeira. A solução foi centrifugada por 10 min, a 4000 rpm, a 4 °C (Eppendorf 5810 R, em rotor de ângulo fixo A-4-62, utilizada em todas as etapas seguintes), para remover o RNA precipitado da solução. O sobrenadante, contendo a proteína de revestimento Q β dimérica liberada, foi utilizado para as etapas de purificação por cromatografia.

(B) Purificação da proteína de revestimento Q β , por cromatografia por troca catiónica e por cromatografia de exclusão por tamanho. O sobrenadante da reação de desmontagem, contendo a proteína de revestimento dimérica, proteínas celulares do hospedeiro e resíduos do RNA celular do hospedeiro, foi diluído em uma proporção de 1:15 em água para ajustar a condutividade para abaixo de 10 ms/cm, sendo injetada em uma coluna SP-Sefarose FF (xk16/20, 6 ml, Amersham Bioscience). A coluna foi equilibrada de antemão com tampão sódio fosfato a 20 mM, pH7. A eluição da proteína de revestimento ligada foi atingida por gradiente em etapa fosfato de sódio a 20 mM / cloreto de sódio a 500 mM, e a proteína foi coletada em um volume

de fração de aproximadamente. A cromatografia foi conduzida em temperatura ambiente com uma vazão de 5 ml/min, e a absorbância foi monitorada em 260 nm a 280 nm.

Na segunda etapa, a proteína de revestimento Q β isolada (a fração eluída da coluna de troca catiônica) foi carregada (em duas etapas) em uma coluna Sefacril S-100 HR (xk26/60, 320ml, Amersham Bioscience), equilibrada com fosfato de sódio a 20 mM / cloreto de sódio a 250 mM, pH 6,5. A cromatografia foi conduzida em temperatura ambiente com uma vazão de 2,5 ml/min, e a absorbância foi monitorada em 260 nm a 280 nm. Foram coletadas frações de 5 ml.

(C1) Remontagem da VLP Q β por diálise

Proteína de revestimento Q β purificada (2,2 mg/ml em fosfato de sódio a 20 mM, pH 6,5), uma macromolécula polianiônica (2 mg/ml em água), uréia (7,2 M em água) e DTT (0,5 M em água) foram misturados até as concentrações finais de 1,4 mg/ml de proteína de revestimento, 0,14 mg/ml da macromolécula correspondente, uréia a 1 M e DTT a 2,5 mM. As misturas (1 ml, cada) foram dialisadas por dois dias a 5 °C em TrisHCL a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 8, utilizando membranas com limite de 3,5 kDa. As moléculas polianiônicas eram: ácido poligalacturônico (25000-50000, Fluka), dextrano sulfato (PM 5000 e 10000, Sigma), ácido poli-L-aspartico (PM 11000 e 33400, Sigma), ácido poli-L-glutâmico (PM 3000, 13600 e 84600, Sigma) e tRNAs de leveduras e germe de trigo.

(C2) Remontagem da VLP Q β por diafiltração

33 ml de proteína de revestimento Q β purificada (1,5 mg/ml em fosfato de sódio a 20 mM, pH 6,5, NaCl a 250 mM) foram misturados com água e uréia (7,2 mM em água), NaCl (5 M em água) e ácido poli-L-glutâmico (2 mg/ml em água, PM: 84600). O volume da mistura foi de 50 ml e as concentrações finais dos componentes foram 1 mg/ml de proteína de revestimento, NaCl a 300 mM, uréia a 1,0 mM e 0,2 mg/ml de ácido poli-L-glutâmico. A mistura foi diafiltrada em seguida em temperatura ambiente, contra 500 ml de TrisHCl a 20 mM, pH8, NaCl a 50 mM, aplicado uma vazão cruzada de 10 ml/min e uma taxa de permeabilidade de fluxo de 2,5 ml/min,

em um aparelho de filtração tangencial de fluxo, usando um compartimento de membrana Pellicon XL (Biomax 5K, Millipore).

EXEMPLO 2

Montagem *in vitro* de VPLs AP205

5 (A) Purificação de proteína de revestimento AP205

Desmontagem: 20 ml de solução contendo VLP AP205 (1,6 mg/ml em PBS, purificada de extrato de *E.coli*) foram misturados com 0,2 ml de DTT a 0,5 M e incubados por 30 min em temperatura ambiente. 5 ml de NaCl a 5 M foram acrescentados e a mistura foi então incubada por 15 min a 10 60°C, provocando precipitação das proteínas de revestimento, reduzidas pelo DTT. A mistura turva foi centrifugada (rotor Sorvall SS34, 10000 g, 10 min, 20°C) e o sobrenadante foi descartado e o pelete, dispersado em 20 ml de uréia a 1 M/Citrato de NA a 20 mM, pH 3,2. Após agitação por 30 min em temperatura ambiente, a dispersão foi ajustada para pH 6,5 pelo acréscimo 15 de Na_2HPO_4 a 1,5 M e, em seguida, centrifugada (rotor Sorvall SS34, 10000 g, 10 min, 20 °C) para obter um sobrenadante contendo proteína de revestimento dimérica.

Cromatografia por troca catiônica: O sobrenadante (vide acima) foi diluído com 20 ml de água para ajustar a condutividade de aproximada- 20 mente 5 ms/cm. A solução resultante foi injetada em uma coluna de 6 ml SP Sefarose FF (Amersham Bioscience), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio a 20 mM, pH 6,5. Após a carga, a coluna foi lavada com 48 ml de tampão fosfato de sódio a 20 mM, pH 6,5, seguido por eluição da proteína de revestimento ligada por gradiente linear até NaCl a 1 M sobre 20 25 volumes da coluna. As frações do pico principal foram reunidas e analisadas por SDS-PAGE e espectroscopia por UV. De acordo com a análise por SDS-PAGE, a proteína de revestimento isolada estava essencialmente pura de outras contaminações protéicas. De acordo com a espectroscopia por UV, a concentração protéica foi de 0,6 mg/ml (quantidade total: 12 mg), considerando que 1 unidade de A280 reflete 1,01 mg/ml de proteína de revestimento 30 AP205. Ademais, o valor de A280 (0,5999) sobre o valor de A260 (0,291) é 2, indicando que o preparado é essencialmente livre de ácidos nucleicos.

(B) Montagem de VLPs AP205

Montagem na ausência de qualquer macromolécula polianiônica:

A fração de proteína eluída da etapa precedente foi diafiltrada e concentrada por TFF para uma concentração protéica de 1 mg/ml em fosfato de sódio a 20 mM, pH 6,5. 500 µl desta solução foram misturados a 50 µl de uma solução de NaCl a 5 M e incubados por 48 h em temperatura ambiente. A formação de VLPs remontados na mistura foi mostrada por SDS-Page não redutor e por HPLC de exclusão por tamanho. Uma coluna TSKgel G5000 PWXL (Tosoh Bioscience), equilibrada com fosfato de sódio a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2, foi utilizada para a análise por HPLC.

Montagem na presença de ácido poliglutâmico: 375 µl de proteína de revestimento AP205 purificada (1 mg/ml em fosfato de sódio a 20 mM, pH 6,5) foram misturados com 50 µl de solução estoque de NaCl (5 M em água), 50 µl de solução estoque de ácido poliglutâmico (2 mg/ml em água, PM: 86400, Sigma) e 25 µl de água. A mistura foi incubada por 48 h em temperatura ambiente. A formação de VLPs remontados na mistura foi mostrada por SDS-Page não redutor e por HPLC de exclusão por tamanho. A proteína de revestimento na mistura foi quase que completamente incorporada nas VLPs, mostrando uma eficiência de montagem mais alta do que a para a proteína de revestimento AP205 montada na ausência de qualquer macromolécula polianiônica.

EXEMPLO 3Clonagem de proteínas de fusão Fel d1

Genes que codificam a cadeia 1 e cadeia 2 da Fel d1, respectivamente, foram produzidos por amplificação-PCR, utilizando iniciadores sobrepostos de DNA, conforme mostrado abaixo. Estão indicados iniciadores *forward* (F) e reversos (R). Os fragmentos foram ligados em um vetor pCRIT-TOPO (Invitrogen) e transformados em XL1-Azul. A sequência de insertos da cadeia 1 e cadeia 2 da Fel d1 foi verificada.

Sequência do Iniciador 1F: SEQ ID NO:34;
Sequência do Iniciador 2R: SEQ ID NO:35
Sequência do Iniciador 3F: SEQ ID NO:36

Seqüência do Iniciador 4R: SEQ ID NO:37

Seqüência do Iniciador 5F: SEQ ID NO:38

Seqüência do Iniciador 6R: SEQ ID NO:39

Seqüência do Iniciador 7F: SEQ ID NO:40

5 Seqüência do Iniciador 8R: SEQ ID NO:41

Seqüência do Iniciador 9F: SEQ ID NO:42

Seqüência do Iniciador 10R: SEQ ID NO:43

Construtos de fusão de Fel d1:

10 FELD1 refere-se à proteína com a cadeia 2 no N-terminal fundida diretamente com a cadeia 1. As seqüências de nucleotídeos que codificaram a FELD 1 foram criadas pela técnica de PCR-*splicing overlap extension* (SOE), utilizando o ligador do iniciador 11 (SEQ ID NO:44).

15 FD12 refere-se à proteína com a cadeia 1 no N-terminal fundida diretamente com a cadeia 2. A seqüência de nucleotídeo que codificou a FD12 foi criada pela técnica de PCR- *splicing overlap extension* (SOE), utilizando os iniciadores 12-1 (SEQ ID NO:45), 12-3 (SEQ ID NO:46) e 12-2-1 (SEQ ID NO:47).

20 FELD1-10aa e FELD1-15aa referem-se a proteínas com cadeia 2 no N-terminal fundida por meio de um espaçador de 10 (GGGGS)₂ ou 15 (GGGGS)₃ aminoácidos, respectivamente, com a cadeia 1 no C-terminal. Foi utilizado o plasmídeo contendo a seqüência de nucleotídeos que codifica a FELD1, como modelo, para criar os espaçadores de 10 ou 15 aminoácidos por mutagênese reversa-PCR (IPCRM). Para o espaçador 1-15, foram utilizados dois iniciadores (iniciador 1-10aa, SEQ ID NO:48 e iniciador 2-5aa, SEQ ID NO:49). Para o espaçador 1-10, foram utilizados dois iniciadores (iniciador 1-5aa, SEQ ID NO:50 e iniciador 2-5aa). O fragmento resultante da PCR foi anelado por ligação. Ele é resistente à digestão por Dpn I, que somente reconhece a seqüência contendo adenina metilada, enquanto o plasmídeo modelo foi digerido por DpnI.

30 FELD1-10aa e FELD1-15aa referem-se a proteínas com cadeia 2 no N-terminal fundida por meio de um espaçador de 10 (GGGGS)₂ ou 15 (GGGGS)₃ aminoácidos, respectivamente, com a cadeia 2 no C-terminal. A

fusão de FD12-10aa e FD12-15aa foi produzida de forma semelhante à descrita acima. Para o espaçador de 15 aminoácidos, foi utilizado o iniciador FD2-10aa (SEQ ID NO:51) e o iniciador FD1-5 aa (SEQ ID NO:52). Para o espaçador de 10 aminoácidos, foi utilizado o iniciador FD1-5aa e o iniciador FD2-5 aa (SEQ ID NO:53).

EXEMPLO 4

Expressão bacteriana e purificação de proteínas de fusão Fel d1 com His-tag

As seqüências de nucleotídeos que codificam diversos constructos de fusão de Fel d1, conforme descritos no EXEMPLO 3, foram subclonadas em um sistema de expressão pET-42T(+) a base de T7, modificado do plasmídeo pET-42a(+) (Novagen). O C-terminal dos constructos de fusão foi fundido a uma seqüência de His-tag, seguida por GGC, um ligador de aminoácido contendo cisteína como o segundo sítio de fixação. Os constructos resultantes recebem denominados de acordo, pelo acréscimo de "-HC", em seu final.

FELD1-HC, FELD1-10aa-HC e FELD1-15aa-HC e FD12-15aa-HC foram expressas e purificadas da seguinte maneira: O plasmídeo foi transformado em BL21(DE3). A expressão foi induzida pelo acréscimo de IPTG a 1 mM à cultura em OD600 de aproximadamente. A cultura foi cultivada por 30 horas adicionais a 20 °C, recolhida e submetida à lise por sonicação em tampão nativo de lise (NaH₂PO₄ a 50 mM, NaCl a 300 mM, imidazol a 10 mM, pH 8,0).

O lisado bacteriano clarificado foi levado a 50 ml com o tampão de lise nativo. 5 ml de agarose de ácido de níquel-nitrilo-tri-acético (Ni-NTA) (Qiagen) foram acrescentados e o lisado foi incubado, invertido, por uma hora a 4 °C. Proteínas ligadas inespecificamente foram removidas por lavagem, repetida quatro vezes, em tampão de lise nativo. A proteína ligada foi eluída por ressuspensão do agarose Ni-NTA em 2 ml de tampão de eluição (NaH₂PO₄ a 50 mM, NaCl a 300 mM, imidazol a 250 mM, pH 8,0).

EXEMPLO 5

Ligações dissulfeto dobradas oxidativas em proteínas de fusão Fel d1

FELD1-HC purificada com afinidade com Ni²⁺ consiste em uma

variedade de espécies com pontes misturadas de dissulfeto de 15 kD a 20 kD. O dobramento natural da FELD1-HC foi obtido pela mistura intramolecular repetida das ligações dissulfeto com glutathion oxidado (GSSG, Appli-chem) e glutathion reduzido (GSH, Appli-chem) em uma razão molar de 1:1. A
 5 reação ocorreu por 24 horas, imediatamente após a eluição de FELD1 no tampão de eluição pelo acréscimo de GSSG a 2,5 mM e de GSH a 2,5 mM em temperatura ambiente. A FELD1-HC redobrada exibiu uma única faixa em um peso molecular de 15 kD, sob condições não redutoras (FIG.1, o primeiro painel, faixa 2). Os grupos sulfidril de potencial livre da FELD1-HC
 10 foram transformados em alquilas, utilizando iodoacetamida (Sigma). As sondas foram tratadas com iodoacetamida a 5 mM em bicarbonato de amônia a 20 mM, em pH 8,0 por 15 minutos em temperatura ambiente.

A FELD1-HC redobrada foi ainda purificada até a homogeneidade por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) (Superdex 75 pg, Amersham Pharmacia Biosciences), equilibrada em PBS.
 15

A FELD1-10aa-HC e a FELD1-15aa-HC foram renaturadas por um processo fundamentalmente igual ao do descrito acima (FIG.1, os dois painéis do meio).

O dobramento natural da FD12-15aa-HC foi obtido igualmente
 20 pela mistura repetida de ligações dissulfeto com glutathion oxidado e glutathion reduzido em uma razão molar de 10:1. Após a eluição, a FD12-15aa foi diluída vinte vezes no tampão de dobramento de FD12-15aa (Tris-Cl a 50 mM, pH 8,5, NaCl a 240 mM, KCl a 10 mM, EDTA a 1 mM, PEG 3,550 a 0,05%, GSH a 0,1 mM, GSSH a 0,1 mM) e incubada a 4 °C por 24 horas. A FD12-
 25 15aa redobrada apresentou uma fita única em um peso molecular de 20 kD, comparado a forma reduzida correndo em 23 kD (FIG. 1, ultimo painel).

EXEMPLO 6

As proteínas de fusão Fel d1 são reconhecidas por anticorpos monoclonais específicos de epítomos.

30 A ligação de proteínas de fusão Fel d1, em comparação à Fel d1 natural (nFel d1), com anticorpos monoclonais epítipo-específicos (mAB) foi determinada por um teste ELISA tipo sanduiche, utilizando o kit ELISA de

Fel d1 (6F9/3E4) da Indoor biotechnologies (Cardiff, Reino Unido).

Resumidamente, o anti-Fel d1 mAB 6F9, fornecido sob a forma de solução estoque de 2 mg/ml, foi diluído para 1:1000 em tampão carbonato-bicarbonato a 50 mM, pH 9,6. Os poços de microtitulação foram revestidos com 100 µl do mAB 6F9 diluído por poço em 4^a durante a noite. As placas foram lavadas três vezes com PBS-0,05% Tween20 (PBS-T) e, em seguida, bloqueadas com 100 µl de tampão bloqueador (BSA a 1% (Sigma) em PBS-T). Os poços de microtitulação foram incubados por uma hora com 100 µl de proteínas de fusão Fel d1 ou nFel d1 padrão (Indoors technologies; Reino Unido), utilizando diluições duplas de 80-0,16 ng/ml. A nFel d1 de referência foi subpadronizada da referência E10 de caspa de gato CBER, a qual contém 13,47 U/ml Fel d1 (1 unidade = 4 mg de proteína).

As placas foram lavadas em seguida e 100 µl diluídos (1:1000 em BSA/PBS-T a 1) de anticorpo anti-Fel d1 mAB 3E4 contendo biotina foram acrescentados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T, utilizando 100 µl diluídos (1:1000 em BSA/PBS-T a 1%) de Estreptavidina-Peroxidase (Sigma S5512, 0,25 mg reconstituídas em 1 ml de água destilada). Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, os poços foram lavados três vezes com PBS-T. A detecção foi efetuada com solução de substrato OPD e H₂SO₄ a 5%, como solução de parada. A absorbância foi determinada, utilizando um aparelho de leitura de ELISA (BioRad) em 450 nm e para cálculo de médias aritméticas e erro padrão da média (SEM), o programa EXCEL (MS Office; Microsoft) foi utilizado. Os resultados são apresentados na TABELA 1. Dessa forma, o reconhecimento de proteínas de fusão Fel d1 e de nFel d1 por mABs epítipo-específicos reflete a alta semelhança de antigenicidade de ambas as proteínas.

TABELA 1

Proteínas testadas	FELD1-HC	FELD1-10aa-HC	FELD1-15aa-HC	Fel d1 natural
Fel d1 (ng/ml) em OD50%	8,4	6,7	7,9	7,2

EXEMPLO 7

Acoplamento de proteínas de fusão Fel d1 a VLPs, derivadas de Q β

Uma solução a 143 μ M de VLP Q β em tampão HEPES (HEPES a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2) reagiu com excedente molar 5 vezes maior (715 μ M) de SMPH (Pierce) por 30 minutos em 25 °C, sob agitação. O SMPH foi retirado de um estoque a 50 mM, dissolvido em sulfóxido de dimetila. Os produtos da reação foram dialisados em relação a duas mudanças de PBS, utilizando uma unidade de diálise com um limite de corte de 10,000 Da de peso molecular (Slide-A-Lyzer, Pierce. A diálise foi conduzida a 4 °C em temperatura ambiente, com um tampão mais de >1000 vezes o da mistura da reação.

Antes de acoplar as proteínas de fusão Fel d1 para VLP Q β , derivatizadas por SMPH, as FELD1, FELD1-10aa, FELD1-15aa e FD12-15aa, respectivamente, conforme obtidas, segundo o EXEMPLO 5, foram incubadas com TCEP (Pierce, Perbio Science) em quantidades equimolares por 30 minutos em temperatura ambiente.

As proteínas de fusão Fel d1 foram acrescentadas em excedente molar 5 vezes maior ao da solução a 143 μ M de VLPs Q β , derivatizadas por SMPH. O volume de reação foi de 650 μ l e reações múltiplas foram realizadas em paralelo. As reações foram incubadas por 4 horas em temperatura ambiente, sob agitação. Após o acoplamento, as alíquotas foram centrifugadas em 16.000 x g por 3 minutos em 4 °C até serem transformadas em material insolúvel peletizado. Os sobrenadantes foram reunidos em novos tubos. O acoplamento de proteínas de fusão Fel d1 à VLP de Q β foi avaliado por SDS-PAGE redutor.

O acoplamento de proteínas de fusão Fel d1 à VLP remontada de Q β (obtida do EXEMPLO 1) ocorre substancialmente da mesma forma conforme o descrito acima.

EXEMPLO 8

Acoplamento de FELD1, FELD1-15aa e FD12-15aa a HBcAg1-185-Lis

A construção de HBcAg1-185-Lis, sua expressão e purificação foram substancialmente descritas no EXEMPLO 2-5 do WO 03/040164. Uma

solução de VLP HBcAg1-185-Lis VLP a 120 μ M em Hepes a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2, reage por 30 minutos com um excedente molar, 25 vezes maior de SMPH (Pierce), diluído da solução estoque em DMSO, a 25 °C em um agitador rotativo. A solução de reação é duas vezes dialisada subsequentemente por duas horas contra 1 litro de Hepes a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,2, em 4 °C. A mistura dialisada de HBcAg1-185-Lis reage, em seguida, com a Fel d1 recombinante obtida no EXEMPLO 5. Na reação de acoplamento, a FELD1, FELD1-15aa a FD12-15aa, respectivamente, estão presentes em um excedente molar duas vezes maior do que o da VLP HBcAg1-185-Lis derivatizada. A reação de acoplamento prossegue por quatro horas em 25°C em um agitador rotativo.

EXEMPLO 9

Acoplamento de FELD1, FELD1-15aa e FD12-15aa com VLPs derivadas de AP205

O preparo de VLP de AP205 VLP foi descrito no EXEMPLO 1 e 2 no WO 2004/007538. A derivatização de VLP de AP205 é substancialmente a mesma da descrita no EXEMPLO 7 para VLP Q β . Antes de acoplar as proteínas de fusão Fel d1 para VPL AP205, derivatizadas por SMPH, as FELD1, FELD1-10aa, FELD1-15aa e FD12-15aa, respectivamente, conforme obtidas, segundo o EXEMPLO 5, foram incubadas com TCEP (Pierce, Perbio Science) em quantidades equimolares por 30 minutos em temperatura ambiente.

As proteínas de fusão Fel d1 são acrescentadas em excedente molar 5 vezes maior do que o da solução a 143 μ M de VLPs AP205, derivatizadas por SMPH. As reações foram incubadas por 4 horas em temperatura ambiente, sob agitação.

O acoplamento de proteínas de fusão Fel d1 com VLP remontada de AP205 (obtida do EXEMPLO 2) ocorre substancialmente da mesma forma conforme o descrito acima.

EXEMPLO 10

Produção da composição da invenção baseada em bacteriófago Q β .

Uma cultura com 601 E. coli AB259 (5×10^7 células/ml) foi culti-

vada por 2-3 horas a 37 °C, sob intensa aeração (1 volume de ar / volume of minuto em cultura) para que fosse obtida uma cultura de aproximadamente 2-4x10⁹ células/ml. O lisado clarificado de Q β fago foi inoculado em um múltiplo de infecção de 5 e CaCl₂ foi acrescentado para uma concentração final de 2,2 mM. Após uma fase de adsorção de 5 minutos, a aeração foi intensificada (1,5 volumes de ar / volume de minuto em cultura). As células foram cultivadas ainda por mais 3 horas, até que OD_{650 nm} atingisse um valor de equilíbrio, produzindo 4-6x10¹² partículas de fago na cultura. Estas foram purificadas da seguinte maneira: E.coli foi lisada pelo acréscimo de 10 ml de CHCl₃ / l cultura, 0,1 mg de lisozima / l cultura e EDTA para uma concentração final de 20 mM. O lisado foi clarificado por centrifugação, em uma centrífuga contínua resfriada, e as partículas do fago sedimentadas do lisado por precipitação com sulfato de amônia (500 g/l, produzindo aproximadamente 66% de saturação). A suspensão foi inicialmente decantada e o precipitado isolado por centrifugação por 30 minutos, utilizando uma centrífuga Janetzki K26 com rotor W.R. 6 x 500 ml a 6000 rpm, ou em uma centrífuga Beckman J21 C com rotor JA-10. O pelete foi novamente solubilizado em tampão NT (NaCl a 0,15 e Trypton a 0,1%) e clarificado por centrifugação. O sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônia (acrescentados 500 g/ l, aproximadamente 66% de saturação). O precipitado foi isolado por centrifugação, ressolubilizado em tampão NT e clarificado de novo por centrifugação. As partículas do fago foram isoladas do sobrenadante resultante por ultracentrifugação por 3,5 h, utilizando um roto Beckman do tipo 35 em 32 000 rpm. Os fagos sedimentados foram ressuspensos em tampão NT e purificados por ultracentrifugação em um gradiente convencional contínuo de CsCl. A centrifugação foi conduzida utilizando um rotor Beckman Ti-70 (8x38,5) rotor, em 55 000 rpm por 20 horas. As partículas do fago foram subsequenteiramente dialisadas em Hepes a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,4 para serem utilizadas em etapas de ligação cruzada química, conforme descrita no EXEMPLO 7.

30 EXEMPLO 11

Preparo da composição da invenção baseada em fago GA

Uma cultura de 12 l E. coli Q 13 Hfr RNASse I⁻, em meio M9

contendo 2% de hidrolisado de caseína, 0,5% de extrato de levedura, 0,2% de glicose, foi cultivada até um OD_{540 nm} de 0,6-0,7, que corresponde a aproximadamente 2×10^8 células/ml, e infectada com GA fago em um múltiplo de infecção de 10-20. A cultura cresceu por mais 2,5 a 3 horas a 37 °C e produziu aproximadamente 10^{11} partículas de fago em toda a cultura. As células foram submetidas à lise pelo acréscimo de CHCl₃ a 1-2% v/v e a cultura incubada por 15 minutos. O lisado foi clarificado por centrifugação por 30 minutos a 5000 rpm em um rotor Janetzi K26. As partículas de fato foram precipitadas com sulfato de amônia (60% de saturação) do meio da cultura durante diversos dias a 4°C. A suspensão foi inicialmente decantada, e o precipitado isolado por centrifugação por 30 minutos a 6000 rpm em um roto Janetzki K26. O pelete foi ressuscitado em tampão NET (Tris a 20 mM, pH 7,8, NaCl a 150 mM, EDTA a 5 mM), e as partículas extraídas por diversos ciclos de centrifugação e ressuspensão, em partes pequenas do tampão NET. As partes contendo capsídeos foram reunidas e precipitadas com sulfato de amônia a 60%. As partículas ressuscitadas em tampão NET foram purificadas três vezes em uma coluna Sefarose 4B e, subsequente em dois gradientes de sacarose. Resumidamente, um gradiente de 7 ml de sacarose com as seguintes concentrações v/v, 50%, 43%, 36%, 29% e 22% foi preparado em tampão NET em tubos de centrifuga. A solução de fagos (em tampão NET) foi posta em camadas sobre gradiente e centrifuga por 17 horas em um rotor Beckman SW 28 a 25 000 rpm. As frações contendo capsídeos foram reunidas e separadas da sacarose por filtração em gel em uma coluna Sefarose 4B. As partículas de fagos foram subsequente dialisadas em água e liofilizadas para uso posterior.

A condição do acoplamento de proteínas de fusão Fel d1 com o bacteriófago Q β ou GA é substancialmente a mesma condição do acoplamento com a VLP de Q β , conforme exposto no EXEMPLO 7.

EXEMPLO 12

30 Proteínas de fusão Fel d1 Q β são altamente imunogênicas em camundongos

Camundongos BALB/c foram imunizados sc com 50 ug de Q β -

FELD1, obtida do EXEMPLO 7 ou 50 μg de Q β , misturada com Fel d1 recombinante (obtida do EXEMPLO 5) nos dias 0, 14 e 21 e as amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 21 e 28. Foram determinados anticorpos específicos da Fel d1 por ELISA, utilizando FELD1 para revestimento (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Em resumo, foram utilizados 96 poços F96, que foram pré-revestidos a 4°C durante a noite com 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FELD1 em NaHCO_3 a 0,1 M e pH 9,6. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween 20 e o fundo foi reduzido pela incubação das placas 2 horas a 37°C com tampão de parada (BSA a 2%, Sigma) em PBS-Tween20. O soro foi diluído em tampão de diluição de soro (BSA a 2%, FCS a 1% em PBS-Tween20). Foram conduzidas duas etapas de diluição e incubação por 2 horas em temperatura ambiente em agitador de placa de ELISA. As placas foram lavadas cinco vezes e anti-corpo de detecção, diluído em 1:1000 (IgG HRPO anti-camundongo acoplado (Sigma)), foi incubado por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween20 e a detecção foi efetuada usando solução de substrato OPD (Na_2HPO_4 a 0,066 M, ácido cítrico a 0,035, pH 5,0, contendo 10 mg de OPD (Fluka) e 8 μl de H_2O_2 a 30% (Fluka) por 25ml) e H_2SO_4 a 5% em H_2O , como solução de parada. A absorbância foi determinada utilizando um aparelho de leitura de ELISA em 450 nm e, para cálculo de médias aritméticas e erro padrão de média (SEM), foi utilizado o programa EXCEL (Microsoft).

Camundongos imunizados com a Q β -FELD1 descreveram uma meia absorção máxima de 120.000 e 75.000 no 21º dia e 28º dia, respectivamente. Por outro lado, camundongos imunizados com uma mistura de Q β /FELD 1 sem ligamento cruzado, apresentaram títulos mais baixos de 7000 e 6000 no 21º e 28º dia, respectivamente.

EXEMPLO 13

Imunização de camundongo com alumínio, como adjuvante

Camundongos Balb/c de 7-8 semanas foram vacinados três vezes (dias 0, 14 e 28) com 50 μg da Q β VLP-FELD1-HC da técnica anterior. As vacinas foram diluídas em 200 μl de PBS estéril ou 100 μl de PBS e 100 μl de AluGel-S (Serva), respectivamente, e injetadas por via subcutânea na

região inguinal esquerda e direita.

Foi coletado soro nos dias 14, 21, 28, 42, 56, 84 e 112. Foram determinados por ELISA anticorpos específicos contra a Fel d1 natural, FELD1-HC e QB VLP.

5 Placas de microtitulação foram revestidas durante a noite com 1 µg/ml de Fel d1 natural (nFel d1, Indoors biotechnologies), 10 mg/ml de FELD1-HC e 10 mg/ml de Qb VLP, respectivamente. Após a lavagem (Tween 20/PBS a 0,05%) e parada com BSA a 2% em PBS, o soro foi acrescentado em diluições diferentes em BSA a 2%/FCS a 1%/PBS.

10 Posteriormente, foi conduzido o ELISA pelo método padrão. As vacinas com Qβ VLP-FELD1-HC induziram uma resposta de anticorpo duradoura alta específica para Feld1 para FELD1 natural e FELD1. O título de anticorpos foi mais alto na presença de alumínio do que na ausência de alumínio (TABELA 2).

15 TABELA 2

	com Alum		sem Alum	
datas	nFel d1	FELD1-HC	nFel d1	FELD1-HC
Dia 13	15984	53939	3394	7871
Dia 20	100311	203636	38980	77323
Dia 27	173190	368716	38177	56836
Dia 42	240173	419072	88953	170377
Dia 56	228500	492520	65370	163093
Dia 84	157009	219834	59603	115049
Dia 112	127745	203719	62290	116132

EXEMPLO 14

FELD1 acoplado com Qβ reduziu drasticamente potencial alérgico *in vitro*

20 Para testar a capacidade da Qβ-FELD1-HC para desencadear uma reação alérgica *in vitro*, foram isolados basófilos do sangue de três gatos doadores alérgicos. Em um gato alérgico, estes basófilos são revestidos com IgE específica da Fel d1 e respondem com aumento regulado de CD63 à estimulação alérgica. Dessa forma, basófilos do indivíduo alérgico foram estimulados com quantidades graduadas de Qβ-FELD1-HC ou FELD1-HC isolada e o aumento regulado de CD63 foi determinado por citometria de

fluxo. Enquanto que a FELD1-HC (obtida do EXEMPLO 5) desencadeou um forte aumento regulado de CD63, na mais baixa diluição testada (aproximadamente 0,2ng/ml), Q β -FELD1-HC (obtida do EXEMPLO 7) exibiu um potencialmente alérgico drasticamente reduzido e requereu quantidades de 100-1000 vezes mais altas (aproximadamente 70ng/ml) de FELD1-HC para que os basófilos apresentassem uma resposta.

Este teste foi igualmente repetido para as proteínas de fusão FELD-15aa-HC e FD12-15aa-HC, isoladas ou acopladas com Q β . Os resultados são mostrados na FIG 2. Estas proteínas de fusão Fel d1, quando acopladas com Q β , exibem todas um potencial alérgico drasticamente reduzido.

EXEMPLO 15

FELD1 acoplada com Q β não é capaz de desencadear uma reação de puntura cutânea em um indivíduo alérgico

Se forem introduzidos alérgenos por uma puntura feita na pele de um indivíduo alérgico, um edema local será criado em aproximadamente 20 minutos em virtude da ativação de mastócitos, abrigados na pele. Neste exemplo, o teste cutâneo foi empregado para determinar o potencial alérgico de Q β -FELD1-HC (obtida do EXEMPLO 7). Quantidades graduadas de Q β -FELD1-HC ou quantidades correspondentes de FELD1-HC (obtida do EXEMPLO 5) foram introduzidas na pele de um gato alérgico e a reação cutânea foi avaliada 20 minutos mais tarde. A Q β -FELD1-HC não foi capaz de desencadear uma reação cutânea enquanto que a FELD1-HC foi ativa em concentrações mais de 100 vezes mais baixas (TABELA 3)

TABELA 3: Quantidades correspondentes de FELD1-HC presentes em ambos os preparados.

Diluição	FELD1-HC	Q β -FELD1-HC
Limpa	+++	-
1:10	++	-
1:100	+	-
1:1000	-	-

EXEMPLO 16**Imunização de um indivíduo alérgico com Q β -FELD1-HC reduz reatividade de teste de puntura cutânea**

A fim de testar a capacidade da Q β -FELD1-HC de aliviar sintomas clínicos, um paciente sofrendo de alergia a gato foi vacinado com 17ug de Q β -FELD1-HC (obtida do EXEMPLO 7), no dia 0 (3 injeções de 2, 5 e 10 ug), 40 ug no dia 7 (3 injeções de 10, 10 e 20 ug) e 50 ug no dia 14 (2 injeções de 10 e 40 ug). Foram realizados testes de puntura cutânea com um extrato padronizado de gato nos dias 0, 14 e 21 e os diâmetros da reação inchada central foram quantificados (FIG 3). Em 3 semanas, foram necessárias concentrações de alérgenos 1000 vezes mais altas para induzir sintomas clínicos no teste de puntura cutânea, do que a quantidade inicial necessária suficiente para induzir sintomas no teste de puntura.

EXEMPLO 17**Imunização de um indivíduo alérgico com Q β -FELD1-HC reduz sintomas nasais em teste de provocação nasal**

A fim de testar a capacidade da Q β -FELD1-HC de aliviar sintomas clínicos, um paciente sofrendo de alergia a gato foi vacinado com 17ug Q β -FELD1-HC (obtida do EXEMPLO 7) no dia 0 (3 injeções de 2, 5 e 10 ug), 40 ug no dia 7 (3 injeções de 10, 10 e 20 ug) e 50 ug no dia 14 (2 injeções de 10 e 40 ug). Foram efetuados testes de provocação nasal com um extrato padronizado de gato nos dias 0, 14 e 21 e os sintomas clínicos foram avaliados em cada nível de escalonamento de dose (FIG 4A) e uma pontuação alérgica global foi preparada de acordo com (FIG 4B). Em 3 semanas, foram necessárias quantidades de alérgeno de 100 a 1000 mais altas para induzir sintomas clínicos e a pontuação global alérgica foi fortemente reduzida.

EXEMPLO 18**Empacotamento de ácidos nucleicos imunoestimulantes na Q β VLP**

Proteína de revestimento desmontada e purificada de Q β foi obtida conforme descrito no EXEMPLO 1 (A) e (B). *Remontagem:* β -mercaptoetanol foi acrescentado à fração de 10 ml do dímero até uma concentração final de 10%, e 300 μ l de uma solução de (CpG)₂₀OpA oligodeoxi-

nucleotídeo, contendo 12,3 nmols de oligonucleotídeo foram acrescentados. A mistura de remontagem foi inicialmente dialisada 30 ml de tampão NET (Tris-HCl a 20 mM, pH 7,8 com EDTA a 0,5 mM e NaCl a 150 mM), contendo 10% de beta-mercaptoetanol, por 2 horas a 4 °C e, em seguida, dialisada de modo contínuo com um fluxo de tampão NET de 8 ml/h por 4 dias a 4 °C. A mistura de remontagem foi em seguida dessalinizada em água por diálise, com 6 trocas de tampão (4 X 100 ml, 2 X 1 litro).

O acoplamento de proteínas de fusão Fel d1 com a Q β VLP, contendo CpG no interior é conduzida substancialmente do mesmo modo descrito no EXEMPLO 7.

EXEMPLO 19

Soro específico da Fel d1 inibiu a desgranulação de basófilos induzida por proteínas de fusão Fel d1 *in vitro*

A fim de testar a capacidade de IgG específico anti-Fel d1 de inibir a desgranulação, basófilos de um indivíduo alérgico foram estimulados com uma quantidade definida de FELD1-HC ou FELD1-15aa-HC, pré-incubadas com uma diluição em série de quantidades decrescentes de IgGs isoladas de ratos imunizados com Q β -FELD1-HC. O aumento regulado de CD63 foi determinado por citometria de fluxo. A IgG anti-Fel d1 bloqueou a desgranulação induzida pela Fel d1 em todas as concentrações testadas, enquanto que a IgG de controle não exibiu qualquer efeito (TABELA 4).

TABELA 4

amostras	FELD1-HC Percentual de desgranulação	FELD1-15aa-HC Percentual de desgranulação
Sem IgG	33	33
IgG específico de Fel d1 (200ng/ml)	1,9	1,6
IgG específico de Fel d1(100ng/ml)	5,2	2,1
IgG específico de Fel d1(50ng/ml)	8,2	2,3
IgG específico de Fel d1(25ng/ml)	10,6	4,2

amostras	FELD1-HC Percentual de desgranu- lação	FELD1-15aa-HC Percentual de desgra- nulação
IgG não específico	35	29
Sem estimulação de Fel d1	1,2	1,2

EXEMPLO 20

Imunização de camundongos alérgicos a Fel d1 com Q β -FELD1-HC

- Um modelo experimental de asma de inflamação alérgica de vias aéreas em camundongos foi utilizado para avaliar os efeitos de vacinação contra o alérgeno natural Fel d1 sobre a resposta de anticorpo IgE em soro e em LBA (Lavado broncoalveolar) de camundongos BALB/c. 5 camundongos por grupo foram sensibilizados por entalhe peritoneal com Fel d1 natural em AlumGel-S no dia 0. Os camundongos foram vacinados por via subcutânea no dia 35 e 49 com 50ug de Q β isolada ou com 50ug de Q β -FELD1-HC, antes de dois testes subseqüentes intranasais no dia 63 e dia 70. 5 dias após o último teste intranasal, os camundongos foram sacrificados para que fossem recolhidos o soro e o LLBA (líquido do lavado broncoalveolar) para serem analisados em relação à resposta imunológica humoral (títulos de subclasses de IgE) por ELISA.
- Placas de ELISA foram revestidas com uma IgE mAB anti-rato (2ug/ml), diluído em tampão carbonato durante a noite a 4 °C. Depois do bloqueio nas placas com PBS/BSA a 5% por 2 horas, as placas foram incubadas por duas horas mais com soro (primeiro poço: 1:100 pré-diluído, depois 1:3 de diluição ao longo de 8 etapas) ou LBA (primeiro poço, LBA puro, depois 1:3 de diluição ao longo de 8 etapas) de camundongos sensibilizados, vacinados e testados com antígenos. Após 2 horas de incubação da amostra, IgE do soro e de LBA foi detectada com um anticorpo marcado IgE-HRP anti-camundongo de ratos antes de detecção com substrato OPD.

TABELA 5

Grupo	Soro (d75)		LBA (d75)	
	Título em OD50	% redução	Título em OD50	% redução
Q β -vacinado	1036	-	15	-
Q β -Fel d1 vacinado	49	95	0	100

Listagem de Sequência

<110> Cytos Biotechnology AG
 Bachmann, Martin F
 Monika, BAUER F
 Dietmeier, Klaus
 Schmitz, Nicole
 Uzinger, Stefan

<120> CONJUGADOS DE ALÉRGENOS DE GATO E USOS DOS MESMOS

<130> P1048PC00

<150> 60/662,918

<151> 2005-03-18

<160> 69

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Q-beta

<400> 1

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 2
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago Q-beta

<400> 2

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly
 1 5 10 15

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
 85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu
 100 105 110

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln
 115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro
 145 150 155 160

Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu
 165 170 175

Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala
 180 185 190

Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu
 195 200 205

Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr
 210 215 220

Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr
225 230 235 240

Leu Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu
245 250 255

Gly Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu
260 265 270

Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Ala Tyr His
275 280 285

Ala Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly
290 295 300

Ala Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile
305 310 315 320

Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala
325

<210> 3

<211> 129

<212> PRT

<213> Bacteriophage R17

<400> 3

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
 115 120 125

Tyr

<210> 4
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago fr

<400> 4

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
 20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
 35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu
 50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
 65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe
 85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr
 100 105 110

Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
 115 120 125

Ile Tyr
 130

<210> 5
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago GA

<400> 5

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr
35 40 45

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val
50 55 60

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

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe
100 105 110

Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe
115 120 125

Tyr Ala
130

<210> 6

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago SP

<400> 6

Met Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly
1 5 10 15

Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys
50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe
85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 7
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago SP
 <400> 7

Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val
 50 55 60

Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp
 65 70 75 80

Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr
 85 90 95

Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala
 100 105 110

Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn
 115 120 125

Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp
 130 135 140

Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro
 145 150 155 160

Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly
 165 170 175

Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg
180 185 190

Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
195 200 205

Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp
210 215 220

Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp
225 230 235 240

Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly
245 250 255

Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu
260 265 270

Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala
275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro
305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser
325

<210> 8
<211> 130
<212> PRT
<213> Bacteriófago MS2

<400> 8

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
1 5 10 15

Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
85 90 95

Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu
100 105 110

Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
115 120 125

Ile Tyr
130

<210> 9
<211> 133
<212> PRT
<213> Bacteriófago M11

<400> 9

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Lys Gly
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
100 105 110

Leu Gln Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Val Asn Ala Ile Asp Asn
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 10
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago MX1

<400> 10

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly
 1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
 85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
 100 105 110

Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn
 115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 11
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago NL95

<400> 11

Met Ala Lys Leu Asn Lys Val Thr Leu Thr Gly Ile Gly Lys Ala Gly
 1 5 10 15

Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Lys Asp Ala Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Gly Ser Arg Asp Val Thr Leu Ser Phe
85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Glu Arg Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly
130 135 140

Asn Asn Pro Tyr Pro Gly Val Pro Asp Ser Pro Asn Val Lys Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly
165 170 175

Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys
180 185 190

Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
195 200 205

Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp
210 215 220

Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp
225 230 235 240

Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp
245 250 255

Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr
260 265 270

Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala
275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro
 305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu
 325 330

<210> 12
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago f2

<400> 12

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
 20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
 35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
 50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
 65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
 85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
 100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
 115 120 125

Tyr

<210> 13
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago PP7

<400> 13

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu
 1 5 10 15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val
20 25 30

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

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp
50 55 60

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg
65 70 75 80

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr
85 90 95

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala
100 105 110

Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
115 120 125

<210> 14

<211> 131

<212> PRT

<213> Bacteriófago AP205

<400> 14

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu
20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
 115 120 125

Thr Thr Ala
 130

<210> 15
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Bacteriófago Q-beta 240 mutante

<400> 15

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

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 16
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Bacteriófago Q-beta 243 mutante

<400> 16

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Lys Ile Gly Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 17

<211> 132

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Bacteriófago Q-beta 250 mutante

<400> 17

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

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 18

<211> 132

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Bacteriófago A-beta 251 mutante

<400> 18

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

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr

130

<210> 19
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Bacteriófago Q-beta 259 mutante
 <400> 19

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

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 20
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Vírus hepatite B

<400> 20

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180 185

<210> 21
<211> 188
<212> PRT
<213> Virus hepatitis B

<400> 21

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Lys Gly Gly Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Val
85 90 95

Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr
100 105 110

Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp
115 120 125

Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser
130 135 140

Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser
145 150 155 160

Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro
165 170 175

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180 185

<210> 22

<211> 70

<212> PRT

<213> Felis domesticus

<400> 22

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

Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro
20 25 30

Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys
35 40 45

Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile
50 55 60

Tyr Thr Ser Pro Leu Cys
65 70

<210> 23

<211> 92

<212> PRT

<213> Felis domesticus

<400> 23

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
1 5 10 15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
20 25 30

Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
35 40 45

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

Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn
65 70 75 80

Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
85 90

<210> 24

<211> 162

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Fusão de corrente 2+ corrente 1

<400> 24

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
1 5 10 15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
20 25 30

Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
35 40 45

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

Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn
65 70 75 80

Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Glu Ile Cys Pro
85 90 95

Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu

100

105

110

Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu
 115 120 125

Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu
 130 135 140

Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro
 145 150 155 160

Leu Cys

<210> 25
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> *Felis domesticus*

<400> 25

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30

Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
 35 40 45

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

Ile Ala Ile Asn Glu Tyr Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
 85 90

<210> 26
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> *Felis domesticus*

<400> 26

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30

Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
 35 40 45

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

Pro Ser Thr Asn Ile Ala Trp Val Lys Gln Phe Arg Thr Pro
 65 70 75

<210> 27
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Felis domesticus

<400> 27

Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val
 1 5 10 15

Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val
 20 25

<210> 28
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Felis domesticus

<400> 28

Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys
 1 5 10 15

Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu
 20 25

<210> 29
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Felis domesticus

<400> 29

Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg
 20 25

<210> 30
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Felis domesticus

<400> 30

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr
1 5 10 15

Ser Pro Leu

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> *Felis domesticus*

<400> 31

Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr
1 5 10 15

Leu Gly Arg

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> *Felis domesticus*

<400> 32

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr
1 5 10 15

<210> 33

<211> 174

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> fusão com his tag and GGC

<400> 33

Met Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe
1 5 10 15

Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys
20 25 30

Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp
35 40 45

Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val
50 55 60

Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln
 65 70 75 80

Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Glu Ile Cys
 85 90 95

Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp
 100 105 110

Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu
 115 120 125

Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu
 130 135 140

Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser
 145 150 155 160

Pro Leu Cys Leu Glu His His His His His His Gly Gly Cys
 165 170

<210> 34
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> iniciador 1F

<400> 34
 gtacatatgg aaatctgcc ggctgttaaa cgtgacgttg acctgttcct gaccggtacc 60
 ccggacgaat acgttgaaca ggttg 85

<210> 35
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> iniciador 2R

<400> 35
 ggcagagctt tgtactgagc aacctgttca acgtattc 38

<210> 36
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> iniciador 3F

<400> 36
 gctcagtaca aagctctgcc ggttggtctg gaaaacgctc gtatcctgaa aaactgcgtt 60
 gacgctaaaa tgacc 75

<210> 37
 <211> 89
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> iniciador 4R

<400> 37
 cctctcgagg cacagcgggg aggtgtagat tttgtccagc agggacagag cgttttcttt 60
 gtcttcttcg gtcatttttag cgtcaacgc 89

<210> 38
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> iniciador 5F

<400> 38
 gtacatatgg ttaaatggc tgaaacctgc ccgatcttct acgacgtttt ctctcgctgtt 60
 gctaacggta acgaac 76

<210> 39
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> iniciador 6R

<400> 39
 ggtacgttcc ggttcggtag cgtaaacttt ggtcagggac aggtccagca gcagttcgtt 60
 accgttagca acagc 75

<210> 40
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> iniciador 7F

<400> 40
 ctaccgaacc ggaacgtacc gctatgaaaa aaatccagga ctgctacgtt gaaaacggtc 60
 tgatctcccg tgttctggac 80

<210> 41

<211> 71
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> iniciador 8R

 <400> 41
 gcttcaccca tgcagtcttt ggaggaggag atggtggtca taaccagacc gtccagaaca 60
 cgggagatca g 71

 <210> 42
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> iniciador 9F

 <400> 42
 caaagactgc atgggtgaag ctgttcagaa caccgttgaa gacctgaaac tgaacaccct 60
 gggtcgctcg agagg 75

 <210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> iniciador 10R

 <400> 43
 cctctcgagc gacccagggt g 21

 <210> 44
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> iniciador ligante

 <400> 44
 cgtttaacag ccgggcagat ttcacgaccc aggtgttca gtttc 45

 <210> 45
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> iniciador 12-1

 <400> 45
 gtacatatgg aaatctgccc ggtgttta 28

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador 2-10aa

<400> 51

ggtggaggag gtagcggtagg aggaggtagc gttaaaatgg ctgaaacctg cccgatctt 59

<210> 52

<211> 42

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador 1-5aa

<400> 52

gctacctcct ccaccgcaca gcggggaggt gtagattttg tc 42

<210> 53

<211> 44

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> iniciador 2-5aa

<400> 53

ggtggaggag gtagcggttaa aatgggtgaa acctgcccca tctt 44

<210> 54

<211> 175

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> FELD1-10aa

<400> 54

Met Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe
1 5 10 15

Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys
20 25 30

Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp
35 40 45

Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val
50 55 60

Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln
65 70 75 80

Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp
100 105 110

Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val
115 120 125

Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu
130 135 140

Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala
145 150 155 160

Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Leu Glu
165 170 175

<210> 55

<211> 180

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> FELD1-15aa

<400> 55

Met Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe
1 5 10 15

Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys
20 25 30

Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp
35 40 45

Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val
50 55 60

Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln
65 70 75 80

Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Cys Pro
100 105 110

Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu

115 120 125
 Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu
 130 135 140
 Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu
 145 150 155 160
 Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro
 165 170 175
 Leu Cys Leu Glu
 180
 <210> 56
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> FD12
 <400> 56
 Met Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
 20 25 30
 Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
 35 40 45
 Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys
 50 55 60
 Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile
 65 70 75 80
 Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu
 85 90 95
 Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala
 100 105 110
 Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg
 115 120 125
 Val Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys
 130 135 140

Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr
145 150 155 160

Leu Gly Arg Leu Glu
165

<210> 57
<211> 180
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> FD12-15aa

<400> 57

Met Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
1 5 10 15

Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
20 25 30

Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
35 40 45

Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys
50 55 60

Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe
85 90 95

Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp
100 105 110

Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met
115 120 125

Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val
130 135 140

Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met
145 150 155 160

Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu
165 170 175

Gly Arg Leu Glu
180

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> ligador gamma 1

<400> 58

Cys Gly Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro
1 5 10

<210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> ligador glicina N-terminal

<400> 59

Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> ligador glicina serina N-terminal

<400> 60

Cys Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> GCGSGGGGS ligador

<400> 61

Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 62

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> ligador 1 gamma C-terminal

<400> 62

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Gly
 1 5 10

<210> 63
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> ligador 3 gamma C-terminal

<400> 63

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Cys Gly

<210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> ligador glicina C-terminal

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Cys Gly
 1 5

<210> 65
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> ligador glicina serina C-terminal

<400> 65

Ser Gly Gly Gly Gly Cys
 1 5

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> GSGGGGSGCG ligante

<400> 66

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Cys Gly
1 5 10

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ligador glicina lisina

<400> 67

Gly Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> ligador 2 glicina lisina

<400> 68

Cys Gly Lys Lys Gly Gly
1 5

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> CGGPKPSTPPGSSGGAP

<400> 69

Cys Gly Gly Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala
1 5 10 15

Pro

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo:

(a) uma partícula central com pelo menos um primeiro sítio de fixação, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral,

(b) pelo menos um antígeno com pelo menos um segundo sítio de fixação,

em que o referido pelo menos um antígeno é uma proteína Fel d1 ou um fragmento da Fel d1 e, em que (a) e (b) estão covalentemente ligados por meio do referido pelo menos um primeiro sítio de fixação e o referido pelo menos um segundo sítio de fixação.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a referida proteína Fel d1 compreende cadeia 1 de Fel d1 e cadeia 2 de Fel d1, em que a referida cadeia 1 da Fel d1 está associada à cadeia 2 da Fel d1 por pelo menos uma ligação covalente.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 e 2, em que a referida proteína Fel d1 é uma proteína de fusão compreendendo cadeia 1 de Fel d1 e cadeia 2 de Fel d1, em que a referida cadeia 1 de Fel d1 e cadeia 2 de Fel d1 são fundidas diretamente ou por meio de uma ligação peptídica ou por meio de um espaçador, que liga o N-terminal de uma cadeia ao C-terminal da outra cadeia.

4. Composição de acordo com a reivindicação 3, em que a referida cadeia 2 de Fel d1 está fundida por seu C-terminal ao N-terminal da referida cadeia 1 de Fel d1, diretamente ou por meio de um espaçador.

5. Composição de acordo com a reivindicação 3, em que a referida cadeia 1 de Fel d1 está fundida por seu C-terminal ao N-terminal da referida cadeia 2 de Fel d1, diretamente ou por meio de um espaçador.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-5, em que o referido espaçador é um espaçador de aminoácidos com 1-20 resíduos de aminoácidos.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-6, em que a referida proteína de fusão compreende uma sequência de a-

minoácidos selecionados do grupo constituído por:

- (a) SEQ ID NO: 24;
- (b) SEQ ID NO:54;
- (c) SEQ ID NO:55;
- (d) SEQ ID NO:56; e
- (e) SEQ ID NO:57.

5

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-6, em que a referida cadeia 1 de Fel d 1 compreende uma sequência da SEQ ID NO: 22 ou uma sequência homóloga da mesma, em que a referida
10 sequência homóloga possui uma identificação em relação à SEQ ID NO: 22 superior a 80%, preferencialmente superior a 90% ou ainda mais preferencialmente superior a 95%.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-6, em que a referida cadeia 2 de Fel d 1 compreende uma sequência de
15 SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26, ou uma sequência homóloga da mesma, em que a referida sequência homóloga possui uma identificação em relação às SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26 superior a 80%, preferencialmente superior a 90% e ainda mais preferencialmente superior a 95%.

20 10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a referida partícula central é uma partícula viral, e em que, preferencialmente, a referida partícula viral é uma partícula viral de um RNA bacteriófago.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações
25 1-9, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus, e em que, preferencialmente, a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um RNA bacteriófago.

12. Composição de acordo com reivindicação 10 ou 11, em que o referido RNA bacteriófago é selecionado de Q β , fr, GA ou AP205.

30 13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes em que o referido primeiro sítio de fixação compreende ou, preferencialmente é um grupo amina, preferencialmente um grupo amina de

uma lisina.

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido segundo sítio de fixação compreende ou, preferencialmente, é um grupo sulfidríla, preferencialmente um grupo sulfidríla de uma cisteína.

15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes compreendendo ainda um ligador.

16. Composição de acordo com reivindicação 15, em que o referido ligador é fundido ao C-terminal da referida proteína Fel d1 ou ao C-terminal do referido fragmento de Fel d1.

17. Vacina compreendendo a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1-16.

18. Vacina de acordo com a reivindicação 17 ainda compreendendo, pelo menos, um adjuvante.

19. Composição farmacêutica compreendendo:

(a) a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16; e

(b) um veículo farmacêutico aceitável.

20. Processo de produção da composição como definido em qualquer uma das reivindicações 1-16 compreendendo:

(a) o fornecimento de uma partícula central com pelo menos um primeiro sítio de fixação, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral;

(b) o fornecimento de pelo menos um antígeno com pelo menos um segundo sítio de fixação, em que o referido antígeno é uma proteína Fel d1 ou um fragmento de Fel d1; e

(c) a ligação da referida partícula central e do referido pelo menos um antígeno, para produção da referida composição, em que a referida partícula central e o referido pelo menos um antígeno estão ligados por, pelo menos, o referido primeiro e por, pelo menos, o referido segundo sítio de fixação.

21. Uso da composição como definida em qualquer uma das rei-

vindicações 1-16 para a produção de um medicamento para o tratamento de alergia a gatos.

22. Método de tratamento de alergia a gato compreendendo a administração da composição de qualquer uma das reivindicações 1-16, ou
5 da vacina como definida em qualquer uma das reivindicações 17-18 para um ser humano ou um mamífero não humano, em que preferencialmente o referido mamífero não humano é um cachorro ou um gato.

23. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16 ou da vacina de qualquer uma das reivindicações 17-18 para uso
10 em um método para tratamento de alergia a gato compreendendo a administração da referida composição ou da referida vacina para um ser humano ou para um mamífero não humano, em que preferencialmente o referido mamífero não humano é um cachorro ou um gato.

24. Proteína de fusão Fel d1 compreendendo cadeia 1 de Fel d1
15 e cadeia 2 de Fel d1, fundidas por meio de um espaçador de aminoácidos, que liga o N-terminal de uma cadeia ao C-terminal da outra cadeia, em que o referido espaçador de aminoácidos é constituído por uma sequência de aminoácidos com 10-30 resíduos de aminoácidos, e em que a referida proteína de fusão não é uma proteína de fusão compreendendo cadeia 1 de SEQ ID
20 NO:22, fundida por (GGGGS)₃ ao N-terminal da cadeia 2 de SEQ ID NO:23, 25 ou 26 e em que a referida proteína de fusão renunciada é expressa em sistema de expressão de baculovírus.

25. Proteína de fusão Fel d1 de acordo com a reivindicação 24, em que o referido espaçador é constituído por uma sequência de aminoácidos com 2, 3 ou 4 repetições de GGGGS.
25

26. Proteína de fusão Fel d1 de acordo com a reivindicação 24 ou 25, em que a referida proteína de fusão Fel d1 é produzida em *E. coli*.

27. Proteína de fusão Fel d1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-26, em que a cadeia 2 da Fel d1 está localizada no N-terminal da proteína de fusão.
30

28. Proteína de fusão Fel d1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-26, em que a cadeia 1 da Fel d1 está localizada no N-

terminal da proteína de fusão.

29. Proteína de fusão Fel d1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 24-28 compreendendo uma seqüência de aminoácidos selecionados do grupo composto por:

5

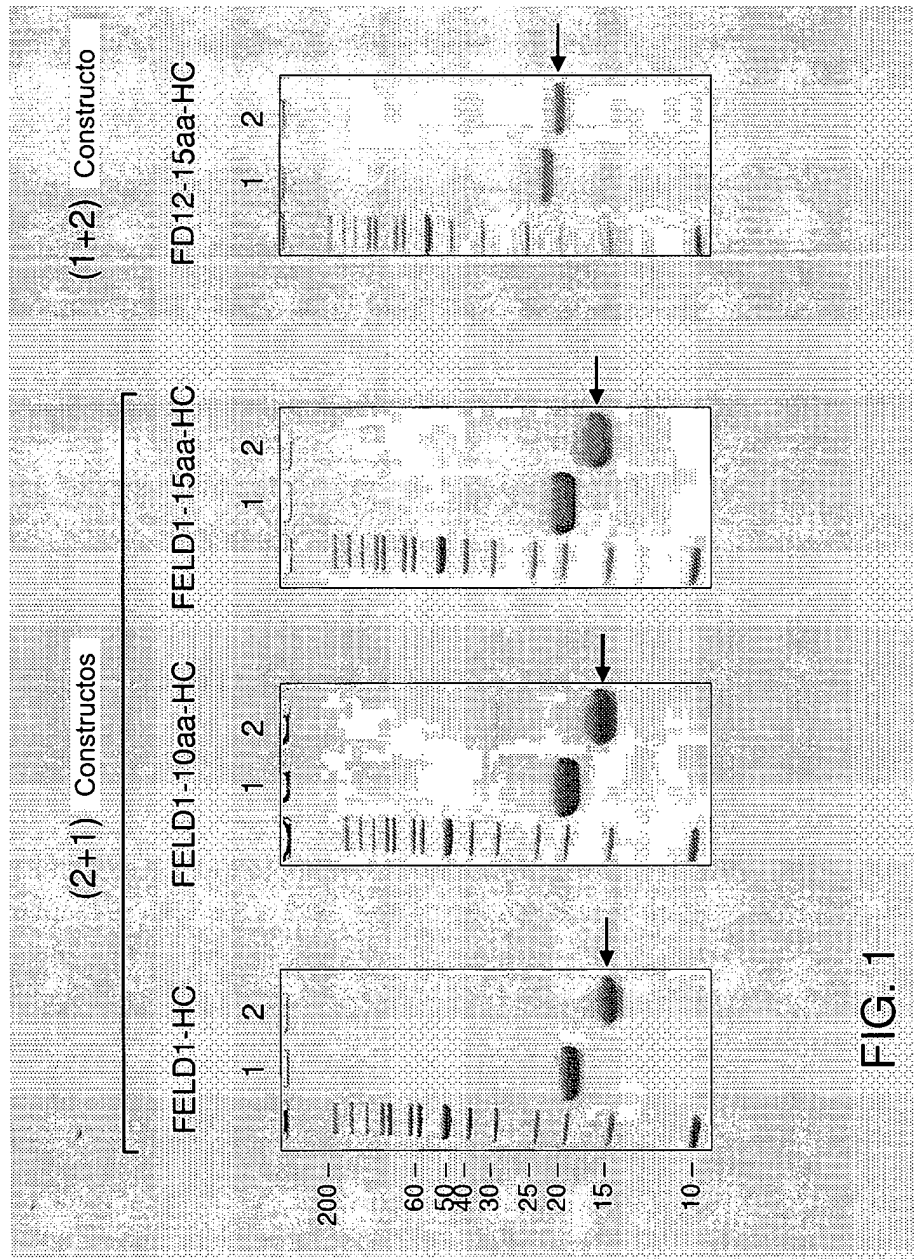
(a) SEQ ID NO:54;

(b) SEQ ID NO:55; e

(c) SEQ ID NO:57.

10

30. Proteína de fusão Fel d1 compreendendo uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO:57, em que a referida proteína de fusão é produzida em *E. coli*.



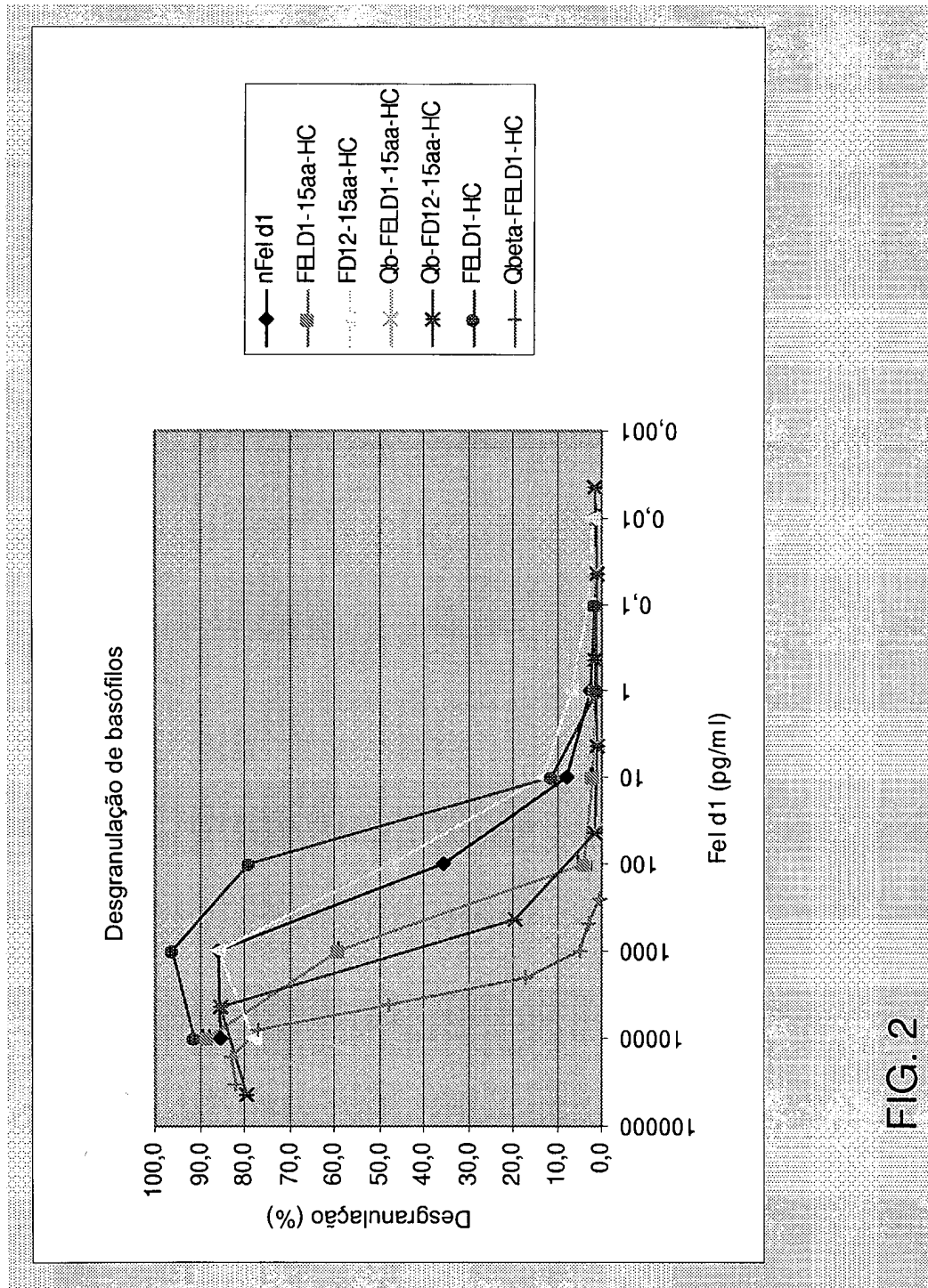
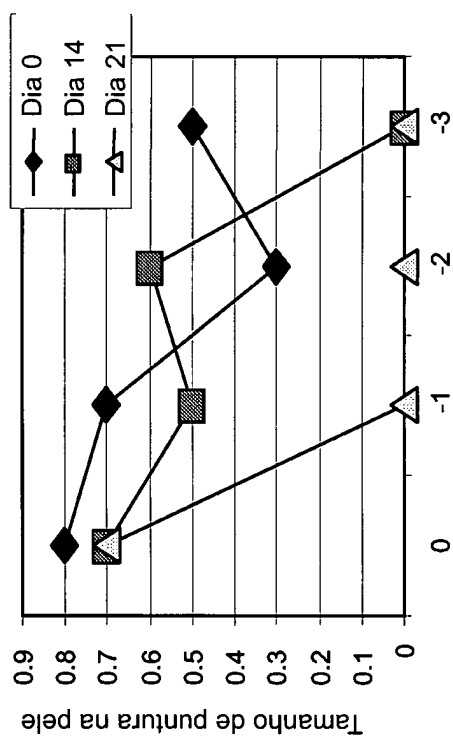


FIG. 2



Concentração de extrato alergénio a gato (log10)

FIG. 3

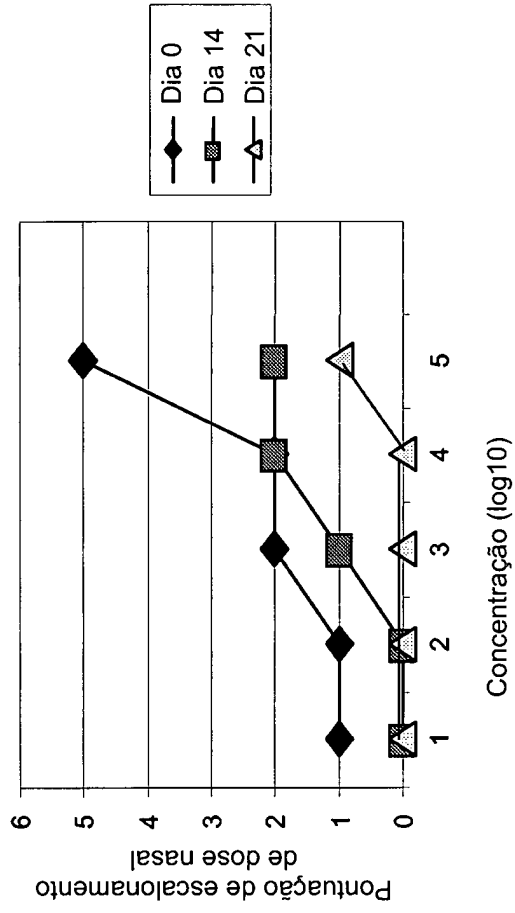


FIG. 4A

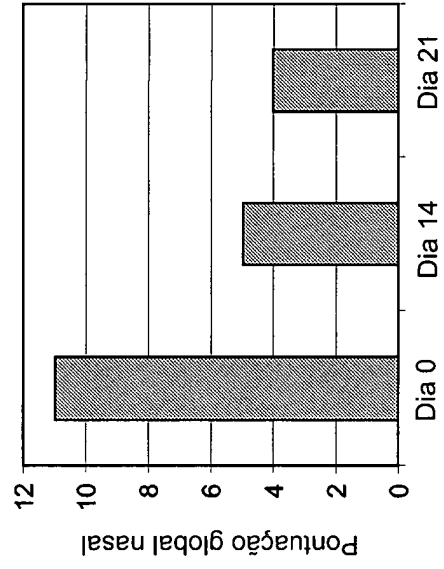


FIG. 4B

FIG. 4

RESUMO

Patente de Invenção: "CONJUGADOS DE ALÉRGENOS DE GATO E USOS DOS MESMOS".

A presente invenção refere-se aos campos de medicina, saúde pública, imunologia, biologia molecular e virologia. A invenção fornece composições compreendendo uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral e, pelo menos, um antígeno, particularmente, pelo menos um antígeno felino, e mais particularmente pelo menos um antígeno felino que é um alérgeno humano. Em certas concretizações, o antígeno é um antígeno da Fel d1, ou fragmento da mesma, ligado covalentemente à VLP. A invenção fornece também processos para produção das composições. As composições da invenção induzem respostas imunológicas eficientes, particularmente respostas de anticorpos, em mamíferos, particularmente em seres humanos. As composições e processos da invenção são úteis na produção de vacinas, particularmente para o tratamento e/ou prevenção de alergias à caspa de gato e a outros antígenos e alérgenos de gatos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO CONJUGADOS DE ALÉRGENOS DE GATO BEM COMO VACINAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MEDICAMENTOS CONTENDO A MESMA, E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO**".

5 Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se aos campos de medicina, saúde pública, imunologia, biologia molecular e virologia. A invenção fornece composições compreendendo uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula de vírus e, pelo menos, um antígeno, particularmente, pelo menos, um antígeno felino e, mais particularmente, pelo menos um antígeno felino que é um alérgeno humano. Em certas concretizações, o antígeno é um antígeno Fel d1, ou um fragmento do mesmo, ligado covalentemente à VLP. A invenção fornece também processos para a produção das composições. As composições da invenção induzem respostas imunológicas eficientes, em particular, respostas de anticorpos, em mamíferos, particularmente, humanos. As composições e processos da invenção são úteis na produção de vacinas, em particular para o tratamento e/ou prevenção de alergias à

10 e, pelo menos, um antígeno, particularmente, pelo menos, um antígeno felino e, mais particularmente, pelo menos um antígeno felino que é um alérgeno humano. Em certas concretizações, o antígeno é um antígeno Fel d1, ou um fragmento do mesmo, ligado covalentemente à VLP. A invenção fornece também processos para a produção das composições. As composições da invenção induzem respostas imunológicas eficientes, em particular, respostas de anticorpos, em mamíferos, particularmente, humanos. As composições e processos da invenção são úteis na produção de vacinas, em particular para o tratamento e/ou prevenção de alergias à

15 capas de gatos e a outros antígenos e alérgenos de gatos.

Técnica relacionada

20 O gato doméstico (*Felis domesticus*) é uma fonte importante de alérgenos internos (Lau, S. et al. (2000) *Lancet* 356, 1392-1397). De fato, gatos são encontrados em aproximadamente 25% das casas nos países ocidentais e a alergia a gatos é encontrada em grande parte da população. A gravidade dos sintomas varia de rinite leve e conjuntivite à asma exacerbada com risco de vida.

25 Embora os pacientes sejam ocasionalmente sensibilizados por diversas moléculas diferentes presentes na caspa e pelos de gato, o principal alérgeno é o Fel d 1 (isto é, alérgeno 1 do *Felis domesticus*, antigo Cat 1, isto é, alérgeno Cat 1). A importância deste alérgeno foi realçada em inúmeros estudos. De fato, mais de 80% dos pacientes alérgicos a gatos exibem anticorpos IgE contra este potente alérgeno (van Ree, R. et al. (1999) *J. Allergy Clin Immunol* 104, 1223-1230).

30

O Fel d1 é uma glicoproteína ácida com 35-39 kDa contendo 10-

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

- (a) uma partícula central com pelo menos um primeiro sítio de fixação, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral,
- (b) pelo menos um antígeno com pelo menos um segundo sítio de fixação, em que o referido pelo menos um antígeno é uma proteína Fel d1 ou um fragmento da Fel d1 e, em que preferencialmente o referido pelo menos um antígeno é uma proteína Fel d1, em que a referida proteína Fel d1 compreende a cadeia 1 de Fel d1 e a cadeia 2 de Fel d1, e em que a referida cadeia 1 de Fel d1 está associada com a cadeia 2 de Fel d1 por pelo menos uma ligação covalente;

e em que (a) e (b) estão covalentemente ligados por meio do referido pelo menos um primeiro sítio de fixação e o referido pelo menos um segundo sítio de fixação.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido pelo menos um antígeno é uma proteína Fel d1 e em que a referida proteína Fel d1 é uma proteína de fusão compreendendo cadeia 1 de Fel d1 e cadeia 2 de Fel d1, em que a referida cadeia 1 de Fel d1 e a cadeia 2 de Fel d1 são fundidas diretamente ou por meio de uma ligação peptídica ou por meio de um espaçador, em que o referido espaçador liga o N-terminal de uma cadeia ao C-terminal da outra cadeia.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a referida cadeia 2 de Fel d1 é fundida por seu C-terminal ao N-terminal da referida cadeia 1 de Fel d1, diretamente ou por meio de um espaçador.

4. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a referida cadeia 1 de Fel d1 é fundida por seu C-terminal ao N-terminal da referida cadeia 2 de Fel d1, diretamente ou por meio de um espaçador.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizada pelo fato de que a cadeia 1 de Fel d1 e a cadeia 2 de

Fel d1 são fundidas através de um espaçador, em que o referido espaçador liga o N-terminal de uma cadeia com o C-terminal de outra cadeia e em que o referido espaçador consiste em uma sequência de aminoácidos com 1 a 20 resíduos de aminoácidos.

5 6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizada pelo fato de que a cadeia 1 de Fel d1 e a cadeia 2 de Fel d1 são fundidas através de um espaçador, em que o referido espaçador liga o N-terminal de uma cadeia com o C-terminal de outra cadeia, e em que o referido espaçador consiste em uma sequência de aminoácido de 10 a 30
10 resíduos de aminoácido, e em que preferencialmente o referido espaçador consiste em uma sequência de aminoácido de 15 resíduos de aminoácido, e em que o mais preferencialmente o referido espaçador é (GGGGS)³.

15 7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizada pelo fato de que a referida proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo constituído por:

- (a) SEQ ID NO: 24;
- (b) SEQ ID NO:54;
- (c) SEQ ID NO:55;
- (d) SEQ ID NO:56; e
- 20 (e) SEQ ID NO:57.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizada pelo fato de que o referido pelo menos um antígeno é uma proteína Fel d1, e em que a referida proteína Fel d1 é selecionada do grupo que consiste em:

- 25 (a) SEQ ID NO: 24;
- (b) SEQ ID NO:54;
- (c) SEQ ID NO:55;
- (d) SEQ ID NO:56; e
- (e) SEQ ID NO:57,

30 e em que preferencialmente a referida proteína Fel d1 é SEQ ID NO: 55.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações

2 a 8, caracterizada pelo fato de que a referida cadeia 1 de Fel d 1 compreende uma seqüência da SEQ ID NO: 22 ou uma seqüência homóloga da mesma, em que a referida seqüência homóloga possui uma identificação em relação à SEQ ID NO: 22 superior a 80%, preferencialmente superior a 90% ou ainda mais preferencialmente superior a 95% e em que o mais preferencialmente a cadeia 1 de Fel d1 consiste na seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 22.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 6, caracterizada pelo fato de que a referida cadeia 2 de Fel d1 compreende uma seqüência de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26, ou uma seqüência homóloga da mesma, em que a referida seqüência homóloga possui uma identificação em relação às SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26 superior a 80%, preferencialmente superior a 90% e ainda mais preferencialmente superior a 95% e em que o mais preferencialmente a cadeia 2 de Fel d1 consiste na seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 23.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus, e em que, preferencialmente, a referida partícula semelhante a vírus é uma partícula semelhante a vírus de um RNA bacteriófago.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o referido RNA bacteriófago é selecionado de Q β , fr, GA ou AP205.

13. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o referido RNA bacteriófago é bacteriófago Q β .

14. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a referida partícula semelhante a vírus de um RNA bacteriófago compreende a proteína de revestimento de SEQ ID NO: 1.

15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro sítio de fixação compreende ou, preferencialmente é um grupo amina, preferencialmen-

te um grupo amina de uma lisina.

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que o referido segundo sítio de fixação compreende ou, preferencialmente, é um grupo sulfidril, preferencialmente um grupo sulfidril de uma cisteína.

17. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que o referido primeiro sítio de fixação compreende um grupo amina, e em que o referido segundo sítio de fixação compreende um grupo sulfidril; em que o referido grupo amina é um grupo amina de uma lisina, e em que ainda preferivelmente o referido grupo sulfidril é um grupo sulfidril de uma cisteína.

18. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17 caracterizada pelo fato de que compreende ainda um ligador, em que o referido ligador é fundido ao C-terminal da referida proteína Fel d1.

19. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18 caracterizada pelo fato de ser para uso como um medicamento.

20. Vacina, caracterizada pelo fato de que compreende a composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 18, em que preferencialmente a referida vacina compreende ainda pelo menos um adjuvante.

21. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 18; e

(b) um veículo farmacêutico aceitável.

22. Processo de produção da composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizada pelo fato de que compreende: (a) o fornecimento de uma partícula central com pelo menos um primeiro sítio de fixação, em que a referida partícula central é uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral;

(b) o fornecimento de pelo menos um antígeno com pelo menos um segundo sítio de fixação, em que o referido antígeno é uma proteína Fel d1

ou um fragmento de Fel d1; e em que preferencialmente a referida proteína Fel d1 compreende a cadeia 1 de Fel d1 e a cadeia 2 de Fel d1, em que a referida cadeia 1 de Fel d1 é associada com a cadeia 2 de Fel d1 por pelo menos uma ligação covalente; e

- 5 (c) a ligação da referida partícula central e do referido pelo menos um antígeno para produção da referida composição, em que a referida partícula central e o referido pelo menos um antígeno estão ligados por, pelo menos, o referido primeiro e por, pelo menos, o referido segundo sítio de fixação.

23. Medicamento útil no tratamento de alergia de gato, caracteri-
10 zado pelo fato de que contém a composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 18.

24. Medicamento de acordo com a reivindicação 23, caracteriza-
do pelo fato de que o referido tratamento compreende a administração da
referida composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a
15 18, a um mamífero humano ou não humano, em que preferencialmente o referido mamífero não humano é um cachorro ou um gato.

25. Medicamento de acordo com a reivindicação 24, caracteriza-
do pelo fato de que a referida composição é administrada por injeção, infu-
são, inalação, administração oral, intramuscularmente, intravenosamente,
20 transmucosamente, transdermicamente, intranasalmente ou subcutanea-
mente.

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO CONJUGADOS DE ALÉRGENOS DE GATO BEM COMO VACINAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MEDICAMENTOS CONTENDO A MESMA, E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO".**

5 A presente invenção refere-se aos campos de medicina, saúde pública, imunologia, biologia molecular e virologia. A invenção fornece composições compreendendo uma partícula semelhante a vírus (VLP) ou uma partícula viral e, pelo menos, um antígeno, particularmente, pelo menos um antígeno felino, e mais particularmente pelo menos um antígeno felino que é um alérgeno humano. Em certas concretizações, o antígeno é um antígeno da Fel d1, ou fragmento da mesma, ligado covalentemente à VLP. A invenção fornece também processos para produção das composições. As composições da invenção induzem respostas imunológicas eficientes, particularmente respostas de anticorpos, em mamíferos, particularmente em seres humanos. As composições e processos da invenção são úteis na produção de vacinas, particularmente para o tratamento e/ou prevenção de alergias à caspa de gato e a outros antígenos e alérgenos de gatos.