

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

**C12N 15/12** (2011.01) **C07K 14/47** (2011.01)  
**C07K 19/00** (2011.01) **C12N 15/62** (2011.01)  
**C12N 15/70** (2011.01) **C12N 1/21** (2011.01)  
**A61K 39/39** (2011.01) **A61K 48/00** (2011.01)  
**C07K 1/00** (2011.01)

(22) Data de pedido: **1999.02.02**

(30) Prioridade(s): **1998.02.05 GB 9802543**  
**1998.02.06 GB 9802650**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.10.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.04.13**  
**115/2011**

(73) Titular(es):

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA**  
**RUE DE L'INSTITUT 89 1330 RIXENSART BE**

(72) Inventor(es):

**CARLOTA VINALS BASSOLS BE**  
**TERESA CABEZON SILVA BE**  
**JOSEPH COHEN BE**  
**MONCEF SLAOUI US**

(74) Mandatário:

**PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA**  
**RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE ANTIGÉNIOS ASSOCIADOS A TUMORES DA FAMÍLIA MAGE, UTILIZADOS PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO COM EPÍTOPOS AUXILIARES T E DE COMPOSIÇÕES PARA VACINAÇÃO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A NOVAS PROTEÍNAS E À SUA PRODUÇÃO A PARTIR DA FAMÍLIA MAGE. EM PARTICULAR, A UMA PROTEÍNA MAGE FUNDIDA A UM PARCEIRO DE FUSÃO IMUNOLÓGICO, TAL COMO LIPOPROTEÍNA D. ESSES ANTIGÉNIOS PODEM SER FORMULADOS PARA PROPORCIONAR VACINAS PARA O TRATAMENTO DE UMA GAMA DE TUMORES. TAMBÉM SE PROPORCIONAM NOVOS MÉTODOS PARA PURIFICAR PROTEÍNAS MAGE.

## DESCRIÇÃO

### “DERIVADOS DE ANTIGÉNIOS ASSOCIADOS A TUMORES DA FAMÍLIA MAGE, UTILIZADOS PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO COM EPÍTOPOS AUXILIARES T E DE COMPOSIÇÕES PARA VACINAÇÃO”

A presente invenção refere-se a proteínas de fusão como apresentadas nas reivindicações. A presente divulgação refere-se a derivados de proteína compreendendo um antígeno associado a tumor que têm utilidade na terapia de vacinas de cancro. Em particular, os derivados da divulgação incluem proteínas de fusão compreendendo um antígeno codificado pela família de genes MAGE (e. g. MAGE-3, MAGE-1), ligados a um parceiro de fusão imunológico que proporciona epítopos auxiliares T, tais como, por exemplo, a forma lipídica de proteína D de *Haemophilus influenzae* B; proteínas MAGE quimicamente modificadas, em que as pontes dissulfureto do antígeno são reduzidas e os tióis resultantes bloqueados e proteínas MAGE geneticamente modificadas proporcionadas com um marcador de afinidade e/ou geneticamente modificadas para impedir a formação de pontes dissulfureto. Também se descrevem métodos para purificar proteínas MAGE e para formular vacinas para tratar uma gama de cancros, incluindo, mas não limitado a Melanoma, a mama, bexiga, pulmão, NSCLC, cabeça e carcinoma de células escamosas, carcinoma do cólon e carcinoma do esófago.

Os antígenos codificados pela família de genes MAGE são predominantemente expressos em células de melanoma (incluindo melanoma maligno) e alguns outros cancros, incluindo NSCLC

(cancro de pulmão de não pequenas células), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células de transição da bexiga e carcinoma do esófago, mas não são detectáveis em tecidos normais, excepto nos testículos e na placenta (Gaugler, 1994; Weynants, 1994; Patard, 1995). O MAGE-3 é expresso em 69% de melanomas (Gaugler, 1994) e pode também ser detectado em 44% de NSCLC (Yoshimatsu, 1988), 48% de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, 34% de carcinomas de células de transição da bexiga, 57% de carcinomas do esófago, 32% de cancros de cólon e 24% de cancros da mama (Van Pel, 1995); Inoue, 1995, Fujie 1997; Nishimura, 1997). Os cancros que expressam proteínas MAGE são conhecidos como tumores associados a MAGE.

A imunogenicidade de células de melanoma humano tem sido demonstrada elegantemente em experiências utilizando culturas mistas de células de melanoma e linfócitos autólogos. Estas culturas produzem, muitas vezes, linfócitos T citotóxicos específicos (CTL), capazes de lisar exclusivamente as células de melanoma autólogas, mas não os fibroblastos autólogos, nem linfócitos B transformados com EBV autólogos (Knuth, 1984; Anichini, 1987). Vários dos antigénios reconhecidos em células de melanoma autólogas por estes clones de CTL são agora identificados, incluindo os da família MAGE.

O primeiro antigénio que foi possível definir através do seu reconhecimento por CTL específicos em células de melanoma autólogas é designado MZ2-E (Van den Eynde, 1989) e é codificado pelo gene MAGE-1 (Van der Bruggen, 1991). Os CTL dirigidos contra MZ2-E reconhecem e lisam células de melanoma positivas para MZ2-E de autólogos, bem como de outros doentes, desde que estas células possuam o alelo HLA.A1.

O gene MAGE-1 pertence a uma família de 12 genes de relação próxima, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, MAGE 5, MAGE 6, MAGE 7, MAGE 8, MAGE 9, MAGE 10, MAGE 11, MAGE 12, localizados no cromossoma X e partilhando uns com os outros 64 a 85% de homologia na sua sequência codificante (De Plaen, 1994). Estes são, por vezes, conhecidos como MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A6, MAGE A7, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12 (A família MAGE A). Dois outros grupos de proteínas também são parte da família MAGE, embora mais distantemente relacionados. Estes são o grupo MAGE B e MAGE C. A família MAGE B inclui MAGE B1 (também conhecido por MAGE Xp1 e DAM 10), MAGE B2 (também conhecido como MAGE Xp2 e DAM 6), MAGE B3 e MAGE B4 - a família MAGE C inclui actualmente MAGE C1 e MAGE C2. Em termos gerais, uma proteína MAGE pode ser definida como contendo uma assinatura de sequência nuclear localizada na extremidade de terminal-C da proteína (por exemplo, em relação a MAGE A1, uma proteína de 309 aminoácidos, a assinatura nuclear corresponde aos aminoácidos 195-279).

O padrão de consenso da assinatura nuclear é assim descrito como se segue, em que x representa qualquer aminoácido, os resíduos em minúsculas são conservados (permitidas variantes conservadoras) e os resíduos em maiúsculas são perfeitamente conservados.

Assinatura de sequência nuclear

LixvL(2x)I(3x)g(2x)apEExiWexl(2x)m(3-4x)Gxe(3-4x)gxp(2x)llt(3x)VqexYLxYxqVPxsxP(2x)**yeFLWGprA**(2x)Et(3x)kv

As substituições conservadoras são bem conhecidas e são geralmente definidas como matrizes de pontuação por defeito em programas de computador de alinhamento de sequências. Estes programas incluem PAM250 (Dayhoft M.O. *et al.*, (1978), "A model of evolutionary changes in proteins", em "Atlas of Protein sequence and structure" 5(3) M.O. Dayhoft (ed.), 345-352, National Biomedical Research Foundation, Washington e Blosum 62 (Steven Henikoft e Jorja G. Henikoft (1992), "Aminoacid substitution matrices from protein blocks"), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (Biochemistry):10915-10919.

Em termos gerais, as substituições dentro dos seguintes grupos são substituições conservadoras, mas substituições entre grupos são consideradas não conservadoras. Os grupos são:

- i) Aspartato/asparagina/glutamato/glutamina
- ii) Serina/treonina
- iii) Lisina/arginina
- iv) Fenilalanina/tirosina/triptofano
- v) Leucina/isoleucina/valina/metionina
- vi) Glicina/alanina

Em geral, e no contexto desta divulgação, uma proteína MAGE será, aproximadamente, 50% idêntica nesta região nuclear com aminoácidos 195 a 279 de MAGE A1.

Foram identificados vários epítopos CTL na proteína MAGE-3. Um desses epítopos, MAGE-3.A1, é uma sequência de nonapéptido, localizada entre os aminoácidos 168 e 176 da proteína MAGE-3, que constitui um epítipo específico para CTL quando apresentado em associação com a molécula HLA.A1 de MHC de classe I. Recentemente, foram identificados dois epítopos adicionais de

CTL na sequência peptídica da proteína MAGE-3, pela sua capacidade de desencadear uma resposta de CTL numa cultura mista de células de melanoma e linfócitos autólogos. Estes dois epítomos possuem motivos de ligação específica para os alelos HLA.A2 (Van der Bruggen, 1994) e HLA.B44 (Herman, 1996), respectivamente.

Carrel *et al.* (1996) *International Journal of Cancer* 67(3), 417-422 divulga a identificação de um antigénio de reacção cruzada 72 kDa que é co-expresso com proteína MAGE-1 em células de melanoma.

De acordo com um primeiro aspecto da invenção, é proporcionada uma proteína de fusão compreendendo um antigénio codificado pela família de genes MAGE ligado a um parceiro de fusão seleccionado de:

(i) Proteína NS1 de *influenza* ou um seu fragmento compreendendo os 81 aminoácidos de terminal-N da proteína NS1; ou

(ii) LytA de *Streptococcus pneumoniae* ou seu fragmento compreendendo: (a) a porção de terminal-C de Lyt-A; (b) a porção repetida da molécula LytA encontrada na extremidade de terminal-C começando no resíduo 178; e/ou (c) resíduos de aminoácidos 188 - 305 de LytA

(iii) proteína D de *Haemophilus influenzae* B ou um seu fragmento compreendendo

- (a) aproximadamente o primeiro 1/3 de proteína D;
- (b) os primeiros 109 aminoácidos de lipoproteína D; ou
- (c) o terminal-N de 100 a 110 aminoácidos de proteína D.

A presente divulgação proporciona derivados de proteína MAGE. Esses derivados são adequados para utilização em formulações de vacina terapêuticas que são adequadas para o tratamento de uma gama de tipos de tumor.

Numa forma de realização da presente invenção, é proporcionada uma proteína de fusão compreendendo um antigénio da família de proteína MAGE ligado a um parceiro heterólogo como descrito nas reivindicações. As proteínas podem ser quimicamente conjugadas, mas, de um modo preferido, são expressas como proteínas de fusão recombinantes, permitindo que sejam produzidos níveis aumentados num sistema de expressão (o documento W095/04542 divulga antigénio MAGE-1 e identificação de epítomos imunogénicos), comparado a proteína não fundida. Assim, o parceiro de fusão pode assistir no fornecimento de epítomos auxiliares T (parceiro de fusão imunológico), de um modo preferido, epítomos auxiliares T reconhecidos por humanos, ou assistir na expressão da proteína (potenciador de expressão) a rendimentos mais elevados do que a proteína recombinante nativa. De um modo preferido, o parceiro de fusão será não só um parceiro de fusão imunológico, mas também um parceiro potenciador da expressão.

Numa forma preferida da invenção, o parceiro de fusão imunológico é derivado de proteína D, uma proteína de superfície da bactéria gram-negativa, *Haemophilus influenza* B (documento W091/18926). De um modo preferido, o derivado de proteína D compreende, aproximadamente, o primeiro 1/3 da proteína, em particular, aproximadamente, os primeiros 100-110 aminoácidos de terminal-N. De um modo preferido, o derivado de proteína D é lipídado. De um modo preferido, os primeiros 109 resíduos do parceiro de fusão de Lipoproteína D são incluídos no terminal-N

para proporcionar o antigénio candidato de vacina com epítomos de célula T exógenos adicionais e aumentar o nível de expressão em *E. coli* (actuando assim também como um potenciador de expressão). A cauda de lípido assegura apresentação óptima do antigénio a células apresentando antigénio.

Outros parceiros de fusão incluem a proteína não estrutural do vírus de *influenza*, NS1 (hemaglutinina). Tipicamente, são utilizados os 81 aminoácidos de terminal-N, embora possam ser utilizados fragmentos diferentes, desde que incluam epítomos auxiliares T.

Noutra forma de realização, o parceiro de fusão imunológico é a proteína conhecida por LYTA. De um modo preferido, utiliza-se a porção de terminal-C da molécula. A LYTA é derivada de *Streptococcus pneumoniae* que sintetiza uma N-acetil-L-alanina amidase, amidase LYTA (codificada pelo gene *lytA* {Gene 43 (1986) páginas 265-272}, uma autolisina que degrada especificamente determinadas ligações no esqueleto de peptidoglicano. O domínio de terminal-C da proteína LYTA é responsável pela afinidade à colina ou a alguns análogos de colina, tal como DEAE. Esta propriedade foi explorada para o desenvolvimento de plasmídeos expressando C-LYTA em *E. coli*, úteis para expressão de proteínas de fusão. Foi descrita a purificação de proteínas híbridas contendo o fragmento C-LYTA no seu terminal amino {*Biotechnology*: 10 (1992) páginas 795-798}. Como aqui utilizada, uma forma de realização preferida utiliza a porção repetida da molécula Lyta encontrada na extremidade terminal-C, começando no resíduo 178. Uma forma particularmente preferida incorpora os resíduos 188-305.

Os parceiros de fusão imunológicos acima referidos são também vantajosos no auxílio de expressão. Em particular, essas fusões são expressas a rendimentos mais elevados do que as proteínas MAGE recombinantes nativas.

A presente requerente demonstrou, numa experiência clínica, que essas construções são capazes de tratar o melanoma. Num caso, foram eliminadas as metástases de um doente com um melanoma de fase IV, após duas doses de proteína lipo D 1/3 MAGE 3 His sem adjuvante.

Conseqüentemente, a presente invenção proporciona, na forma de realização, proteínas de fusão compreendendo um antigénio associado a tumor da família MAGE, ligado a um parceiro de fusão imunológico. De um modo preferido, o parceiro de fusão imunológico é proteína D ou seu fragmento, de um modo muito preferido, lipoproteína D. As proteínas MAGE são, de um modo preferido, MAGE A1 ou MAGE A3. A parte de Lipoproteína D compreende, de um modo preferido, o primeiro 1/3 de Lipoproteína D.

As proteínas da presente invenção são, de um modo preferido, expressas em *E. coli*. Numa forma de realização preferida, as proteínas são expressas com um marcador de afinidade tal como, por exemplo, uma cauda de histidina compreendendo entre 5 a 9 e, de um modo preferido, seis resíduos de histidina. Estes são vantajosos em auxiliar a purificação.

A presente invenção também proporciona um ácido nucleico que codifica as proteínas da presente invenção. Essas sequências podem ser inseridas num vector de expressão adequado e utilizadas para vacinação de ADN/ARN, ou expressas num

hospedeiro adequado. Os vectores microbianos expressando o ácido nucleico podem ser utilizados como vacinas. Esses vectores incluem, por exemplo, poxvírus, adenovírus, alfavírus, listeria e monarfago.

Uma sequência de ADN codificando as proteínas da presente invenção pode ser sintetizada utilizando técnicas de síntese de ADN convencionais, tal como por ligação enzimática, como descrito por D.M. Roberts *et al.* em *Biochemistry* 1985, 24, 5090-5098, por síntese química, por polimerização enzimática *in vitro*, ou por tecnologia de PCR, utilizando, por exemplo, uma polimerase estável ao calor ou por uma combinação destas técnicas.

A polimerização enzimática de ADN pode ser realizada *in vitro* utilizando uma polimerase de ADN, tal como a ADN polimerase I (fragmento Klenow), num tampão adequado contendo os trifosfatos de nucleósido dATP, dCTP, dGTP e dTTP como necessário, a uma temperatura de 10-37 °C, geralmente num volume de 50 µL ou menos. A ligação enzimática de fragmentos de ADN pode ser realizada utilizando uma ligase de ADN, tal como a ligase de ADN de T4, num tampão adequado, tal como Tris 0,05 M (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 0,01 M, ditiotreitol 0,01 M, espermidina 1 mM, ATP 1 mM e albumina de soro bovino 0,1 mg/mL, a uma temperatura de 4 °C até à ambiente, em geral num volume de 50 mL ou menos. A síntese química do polímero ou fragmentos de ADN pode ser realizada por química convencional de fosfotriéster, fosfito ou fosforamidite, utilizando técnicas de fase sólida, tais como as descritas em "Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A Laboratory Manual" (ed. H.G. Gassen e A. Lang), Verlag Chemie, Weinheirn (1982), ou noutras publicações científicas, por exemplo, M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh, B.S. Sproat, e

R.C. Titmas, *Nucleic Acids Research*, 1982, 10, 6243; B.S. Sproat e W. Bannwarth, *Tetrahedron Letters*, 1983, 24, 5771; M.D. Matteucci e M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters*, 1980, 21, 719; M.D. Matteucci e M.H. Caruthers, *Journal of the American Chemical Society*, 1981, 103, 3185; S.P. Adams et al., *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105, 661; N.D. Sinha. J. Biernat. J. McMannus, e H. Koester. *Nucleic Acids Research*. 1984, 12, 4539; e H.W.D. Matthes et al. *EMBO Journal*, 1984, 3, 801.

O processo da invenção pode ser realizado por técnicas recombinantes convencionais, tais como descritas em Maniatis et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, 1982-1989.

Em particular, o processo pode compreender os passos de:

- i) preparar um vector de expressão replicável ou de integração, capaz de expressar um polímero de ADN numa célula hospedeira, compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica a proteína ou um seu derivado imunogénico;
- ii) transformar uma célula hospedeira com o referido vector;
- iii) cultivar a referida célula hospedeira transformada sob condições permitindo a expressão do referido polímero de ADN, para produzir a referida proteína; e
- iv) recuperar a referida proteína.

O termo "transformar" é aqui utilizado para significar a introdução de ADN estranho numa célula hospedeira. Isto pode ser alcançado, por exemplo, por transformação, transfecção ou

infecção com um vector plasmídico ou viral adequado, utilizando, e. g., técnicas convencionais como descritas em *Genetic Engineering*; Eds. S.M. Kingsman e A.J. Kingsman; Blackwell Scientific Publications; Oxford, Inglaterra, 1988. O termo "transformado" ou "transformante" será daqui para a frente aplicado à célula hospedeira resultante contendo e expressando o gene estranho de interesse.

Os vectores de expressão são novos e também formam parte da invenção.

Os vectores de expressão replicáveis podem ser preparados de acordo com a invenção, clivando um vector compatível com a célula hospedeira para proporcionar um segmento de ADN linear possuindo um replicação intacto e combinando o referido segmento linear com uma ou mais moléculas de ADN que, juntamente com o referido segmento linear, codificam o produto pretendido, tal como o polímero de ADN codificando a proteína da invenção ou seu derivado, sob condições de ligação.

Assim, o polímero de ADN pode ser pré-formado ou formado durante a construção do vector, como pretendido.

A escolha de vector será determinada em parte pela célula hospedeira, que pode ser procariótica ou eucariótica, mas são, de um modo preferido, células de *E. coli* ou CHO. Os vectores adequados incluem plasmídeos, bacteriófagos, cosmídeos e vírus recombinantes.

A preparação do vector de expressão replicável pode ser realizada de modo convencional com enzimas adequadas para

restrição, polimerização e ligação do ADN, por processos descritos, por exemplo, em Maniatis *et al.*, citado acima.

A célula hospedeira recombinante é preparada, de acordo com a invenção, transformando uma célula hospedeira com um vector de expressão replicável da invenção, sob condições de transformação. As condições de transformação adequadas são convencionais e estão descritas, por exemplo, em Maniatis *et al.*, citado acima, ou "DNA cloning", vol II, D.M. Glover ed., IRL Press Ltd, 1985.

A escolha das condições de transformação é determinada pela célula hospedeira. Assim, um hospedeiro bacteriano, tal como *E. coli*, pode ser tratado com uma solução de  $\text{CaCl}_2$  (Cohen *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1973, 69, 2110) ou com uma solução compreendendo uma mistura de  $\text{RbCl}$ ,  $\text{MnCl}_2$ , acetato de potássio e glicerol e, em seguida, com ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfónico,  $\text{RbCl}$  e glicerol. As células de mamífero em cultura podem ser transformadas por co-precipitação com cálcio do ADN de vector nas células. A invenção também se estende a uma célula hospedeira transformada com um vector de expressão replicável da invenção.

A cultura da célula hospedeira transformada sob condições permitindo a expressão do polímero de ADN é realizada de forma convencional, como descrito, por exemplo, em Maniatis *et al.* e "DNA cloning" citado acima. Assim, de um modo preferido, fornecem-se nutrientes à célula e faz-se a cultura a uma temperatura abaixo de 50 °C.

O produto é recuperado por métodos convencionais de acordo com a célula hospedeira e de acordo com a localização do produto

de expressão (intracelular ou segregado para o meio de cultura ou para o periplasma celular). Assim, quando a célula hospedeira é bacteriana, tal como *E. coli*, pode, por exemplo, ser lisada física, química ou enzimaticamente e o produto de proteína isolado a partir do lisado resultante. Quando a célula hospedeira é de mamífero, o produto pode ser geralmente isolado do meio nutriente, ou de extractos isentos de células. As técnicas convencionais de isolamento de proteína incluem precipitação selectiva, cromatografia de adsorção e cromatografia de afinidade, incluindo uma coluna de afinidade de anticorpo monoclonal.

As proteínas da presente invenção são proporcionadas solúveis numa forma líquida ou numa forma liofilizada.

É geralmente esperado que cada dose humana compreende de 1 a 1000 µg de proteína e, de um modo preferido, 30-300 µg.

A presente invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína da presente invenção num excipiente farmacêuticamente aceitável.

Uma composição de vacina preferida compreende, pelo menos, Lipoproteína D - MAGE-3. Essa vacina pode conter, opcionalmente, um ou mais outros antigénios associados a tumor. Por exemplo, outros membros pertencendo às famílias MAGE e GAGE. Outros antigénios associados a tumor adequados incluem proteínas MAGE-1, GAGE-1 ou Tirosinase.

A preparação de vacinas está descrita, em geral, em Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press Nova Iorque). A encapsulação

dentro de lipossomas é descrita por Fullerton, Patente US 4235877.

As proteínas da presente invenção são, de um modo preferido, adjuvadas na formulação de vacina da invenção. Adjuvantes adequados incluem um sal de alumínio, tal como gel de hidróxido de alumínio (alum) ou fosfato de alumínio, mas podem também ser um sal de cálcio, ferro ou zinco, ou podem ser uma suspensão insolúvel de tirosina acilada, ou açúcares acilados, polissacáridos derivatizados catiónica ou anionicamente, ou polifosfazenos. Outros adjuvantes conhecidos incluem CpG contendo oligonucleótidos. Os oligonucleótidos são caracterizados por o dinucleótido CpG ser não metilado. Esses oligonucleótidos são bem conhecidos e estão descritos, por exemplo, no documento WO 96/02555.

Na formulação das invenções é preferido que a composição adjuvante induza uma resposta imunitária, de um modo preferido, do tipo TH1. Os sistemas adjuvantes adequados incluem, por exemplo, uma combinação de monofosforil lípido A, de um modo preferido monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) juntamente com um sal de alumínio. Os oligonucleótidos CpG também induzem, de um modo preferido, uma resposta TH1.

Um sistema melhorado envolve a combinação de um monofosforil lípido A e um derivado de saponina, em particular, a combinação de QS21 e 3D-MPL, como divulgada no documento WO 94/00153 ou uma composição menos reactiva, em que o QS21 é neutralizado com colesterol, como divulgado no documento WO 96/33739.

No documento WO 95/17210 está descrita uma formulação adjuvante particularmente potente, envolvendo QS21, 3D-MPL &

tocoferol numa emulsão de óleo em água e é uma formulação preferida.

Consequentemente numa forma de realização da presente invenção, é proporcionada uma vacina compreendendo uma proteína da presente invenção, de um modo mais preferido, uma Lipoproteína D (ou seu derivado) - MAGE-3, adjuvada com um monofosforil lípido A ou seu derivado.

De um modo preferido, a vacina compreende adicionalmente uma saponina, de um modo mais preferido, QS21.

De um modo preferido, a formulação adicional compreende uma emulsão de óleo em água e tocoferol. A presente divulgação também proporciona um método para produzir uma formulação de vacina, compreendendo misturar uma proteína da presente invenção juntamente com um excipiente farmacologicamente aceitável, tal como 3D-MPL.

Num aspecto da divulgação, é proporcionado um processo para purificar uma proteína MAGE produzida de forma recombinante. O processo compreende solubilizar a proteína, por exemplo, num agente caotrópico forte (tal como, por exemplo, ureia, cloridrato de guanidínio) ou num detergente Zwitteriônico, e. g. (Empigen BB - n-dodecil-N,N-dimetilglicina), reduzindo as ligações dissulfureto intra e intermoleculares da proteína, bloqueando os tióis resultantes para impedir reacoplamento oxidativo e submetendo a proteína a um ou mais passos cromatográficos.

De um modo preferido, o agente bloqueador é um agente alquilante. Esses agentes bloqueadores incluem, mas não são

limitados a, alfa-haloácidos ou alfa-haloamidas. Por exemplo, o ácido iodoacético e a iodoacetamida que resultam na carboximetilação ou carboxiamidação (carbamidometilação) da proteína. Podem-se utilizar outros agentes bloqueadores e estão descritos na literatura (Ver, por exemplo, *The Proteins Vol II* Eds H neurath, RL Hill e C-L Boeder, Academic Press 1976 ou *Chemical Reagents for Protein Modification Vol I* eds. RL Lundblad e CM Noyes, CRC Press 1985). Exemplos típicos desses outros agentes bloqueadores incluem N-etilmaleimida, fosfato de cloroacetilo, O-metilisouria e acrilonitrilo. A utilização do agente bloqueador é vantajosa, dado que impede agregação do produto e assegura estabilidade para purificação a jusante.

Numa forma de realização da divulgação, seleccionam-se os agentes bloqueadores para induzir um derivado covalente estável e irreversível (e. g. alfa-haloácidos ou alfa-haloamidas). No entanto, podem-se seleccionar outros agentes bloqueadores tal que após purificação o agente bloqueador pode ser removido para libertar a proteína não derivatizada.

As proteínas MAGE possuindo resíduos tiol livres derivatizados são novas e formam um aspecto da divulgação. Em particular, os derivados carboxiamidados ou carboximetilados são uma forma de realização preferida da divulgação.

Numa forma de realização preferida da invenção, as proteínas da presente invenção são proporcionadas com um marcador de afinidade, tal como CLYTA ou uma cauda de poli-histidina. Nesses casos, a proteína após o passo bloqueador é, de um modo preferido, submetida a cromatografia de afinidade. Para essas proteínas com uma cauda de poli-histidina, pode-se realizar cromatografia de afinidade com um ião metálico imobilizado

(IMAC). O ião metálico pode ser qualquer ião adequado, por exemplo, zinco, níquel, ferro, magnésio ou cobre, mas é, de um modo preferido, zinco ou níquel. De um modo preferido, o tampão IMAC contém um detergente zwitteriônico, tal como Empigen BB (daqui para frente Empigen), dado que isto resulta em níveis menores de endotoxina no produto final.

Se a proteína é produzida com uma parte Clyta, a proteína pode ser purificada explorando a sua afinidade a colina ou análogos de colina, tal como DEAE. Numa forma de realização da invenção, as proteínas são proporcionadas com uma cauda de polihistidina e uma parte Clyta. Estas podem ser purificadas num esquema simples de purificação cromatográfica de afinidade, de dois passos.

A invenção será a seguir descrita por referência aos exemplos seguintes:

#### **EXEMPLO 1:**

**Preparação da estirpe de *E. coli* recombinante expressando a proteína de fusão Lipoproteína D-MAGE-3-His (LPD 1/3-MAGE-3-His ou LpD MAGE-3-His)**

##### **1. O sistema de expressão de *E. coli***

Para a produção de Lipoproteína D, o ADN codificando a proteína D foi clonado no vector de expressão pMG 81. Este plasmídeo utiliza sinais de fago lambda de ADN para dirigir a transcrição e tradução de genes estranhos inseridos. O vector

contém o promotor PL, o operador OL e dois sítios de utilização (NutL e NutR) de lambda PL, para aliviar efeitos de polaridade transcricional quando a proteína N é proporcionada (Gross *et al.*, 1985. *Mol. & Cell. Biol.* 5:1015). Os vectores contendo o promotor PL são introduzidos num hospedeiro lisogénico de *E. coli* para estabilizar o ADN plasmídico. As estirpes de hospedeiro lisogénico contêm ADN de fago lambda deficiente para replicação, integrado no genoma (Shatzman *et al.*, 1983; In *Experimental Manipulation of Gene Expression*. Inouya (ed) pp 1-14. Academic Press NI). O ADN de fago lambda dirige a síntese da proteína repressora cI que se liga ao repressor OL do vector e impede a ligação de ARN polimerase ao promotor PL e, desse modo, transcrição do gene inserido. O gene cI da estirpe de expressão AR58 contém uma mutação sensível à temperatura, de modo que a transcrição dirigida por PL pode ser regulada por mudança de temperatura, *i. e.* um aumento na temperatura de cultura inactiva, o repressor e a síntese da proteína estranha é iniciada. Este sistema de expressão permite síntese controlada de proteínas estranhas, em especial das que podem ser tóxicas à célula (Shimatoka & Rosenberg, 1981. *Nature* 292:128).

## **2. A estirpe de *E. coli* AR58:**

A estirpe de *E. coli* lisogénica, AR58, utilizada para a produção da proteína LPD-MAGE-3-His é um derivado da estirpe padrão de *E. coli* K12 NIH, N99 (F-su-galK2,lacZ- thr-). Esta contém um fago lambda lisogénico deficiente (galE::TN10, 1 Kil-cI857 DH1). O fenótipo Kil- impede que se desligue a síntese macromolecular do hospedeiro. A mutação cI857 confere uma lesão sensível à temperatura ao repressor cI. A deleção de DH1 remove o operão direito de fago lambda e os *loci* bio, uvr3 e chlA de

hospedeiro. A estirpe AR58 foi produzida por transdução de N99 com uma solução mãe de fago P lambda, previamente crescido num derivado SA500 (gale::TN10, 1 Kil- cI857 DH1). A introdução do lisogénio deficiente em N99 foi seleccionada com tetraciclina, devido à presença de um transposição TN10 codificando para resistência a tetraciclina no gene galeE adjacente. O N99 e SA500 são estirpes de *E.coli* K12 derivadas do laboratório do Dr. Martin Rosenberg no National Institutes of Health.

### **3. Construção do vector concebido para expressar a proteína recombinante LPD-MAGE-3-His:**

O objectivo era expressar MAGE-3 como uma proteína de fusão, utilizando um terço de terminal-N da proteína D lipídada como parceiro de fusão ligado no terminal-N de MAGE-3 e uma sequência de vários resíduos de histidina (cauda His), colocados no seu terminal-C.

A proteína D é uma lipoproteína (uma proteína de ligação à imunoglobulina D, de 42 kDa, exposta na superfície da bactéria Gram-negativa *Haemophilus influenzae*). A proteína é sintetizada como um precursor com uma sequência de sinal de 18 resíduos de aminoácidos, contendo uma sequência de consenso para a lipoproteína bacteriana (documento WO 91/18926).

Quando a sequência de sinal de uma lipoproteína é processada durante a secreção, a Cis (na posição 19 na molécula precursora) torna-se no resíduo de terminal amino e é concomitantemente modificada pela ligação covalente de ácidos gordos ligados a éster e ligados a amida.

Os ácidos gordos ligados ao resíduo de cisteína de terminal amino funcionam então como âncora de membrana.

O plasmídeo expressando a proteína de fusão foi concebido para expressar uma proteína precursora contendo a sequência de sinal de 18 aminoácidos e os primeiros 109 resíduos da proteína D processada, dois aminoácidos não relacionados (Met e Asp), resíduos de aminoácido 2 a 314 de MAGE-3, dois resíduos Gli funcionando como uma região dobra, para expor os sete resíduos His subsequentes.

A estirpe recombinante produz assim a proteína de fusão de cauda His lipídada processada, de 432 resíduos de aminoácidos de comprimento (ver Figura 1), com a sequência de aminoácidos descrita na ID N° 1 e a sequência codificante é descrita na ID N° 2.

#### **4. Estratégia de clonagem para a produção da proteína de fusão LPD-MAG-3-His (vector pRIT14477):**

Utilizou-se um plasmídeo de ADNc (do Dr Thierry Boon do Ludwig Institute) contendo a sequência codificante para gene MAGE-3 (Gaugler B *et al.*, 1994) e o vector PRIT 14586, contendo a porção de terminal-N da sequência codificante Lipo-D-1/3 (preparado como descrito na Figura 2). A estratégia de clonagem incluía os seguintes passos (Figura 3).

a) - amplificação por PCR das sequências apresentadas no ADNc plasmídico MAGE 3, utilizando o oligonucleótido de sentido: 5' gc gcc atg gat ctg gaa cag cgt agt cag cac tgc aag cct e o oligonucleótido anti-sentido: 5' gcg tct aga tta atg gtg atg gtg

atg gtg atg acc gcc ctc ttc ccc ctc tct caa); esta amplificação leva às seguintes modificações no terminal-N: alteração dos primeiros cinco codões para utilização de codão de *E. coli*, substituição do codão de Pro por um codão de Asp na posição 1, instalação de um sítio de NcoI na extremidade 5' e, por fim, adição de dois codões de 2 Gly e do codão de 7 His, seguido por um sítio XbaI no terminal-C.

b) Clonagem no vector de clonagem TA de invitrogen do fragmento amplificado acima e preparação do vector intermediário pRIT14647.

c) Excisão do fragmento NcoI XbaI do plasmídeo pRIT14647 e clonagem no vector pRIT 14586.

d) Transformação da estirpe hospedeira AR58.

e) Selecção e caracterização dos transformantes de estirpe de *E. coli* contendo o plasmídeo pRIT 14477, expressando a proteína de fusão LPD-MAGE-3-His.

## **EXEMPLO II:**

### **Preparação do antigénio LPD1/3-MAGE-3-His:**

#### **1. Crescimento e indução de estirpe bacteriana - Expressão de LPD1/3-MAGE-3-His:**

As células de AR58 transformadas com plasmídeo pRIT14477 foram crescidas em frascos de 2 litros contendo, cada, 400 mL de meio LY12 suplementado com extracto de levedura (6,4 g/L) e

sulfato de canamicina (50 mg/L). Após incubação num tabuleiro agitador, a 30 °C durante 8 +/- 1 h, removeu-se uma pequena amostra de cada frasco para análise microscópica. Os conteúdos dos dois frascos foram reunidos para proporcionar o inóculo para o fermentador de 20 litros.

O inóculo (cerca de 800 mL) foi adicionado a um fermentador de 20 litros (volume total) pré-esterilizado, contendo 7 litros de meio, suplementado com sulfato de canamicina 50 mg/L. O pH foi ajustado, e mantido a 6,8, por adição periódica de NH<sub>4</sub>OH (25% v/v) e a temperatura foi ajustada e mantida a 30 °C. A velocidade de arejamento foi ajustada e mantida a, 12 litros de ar/min e a tensão de oxigénio dissolvido foi mantida a 50% de saturação por controlo de retorno da velocidade de agitação. A sobre-pressão no fermentador foi mantida a 500 g/cm<sup>2</sup> (0,5 bar).

A culturação por alimentação descontínua foi realizada por adição controlada de uma solução alimentadora de carbono. A solução alimentadora foi adicionada a uma velocidade inicial de 0,04 mL/min e aumentada, exponencialmente, durante as primeiras 42 horas, para manter uma velocidade de crescimento de 0,1 h<sup>-1</sup>.

Após 42 h, a temperatura no fermentador foi rapidamente aumentada para 39 °C e a velocidade de alimentação foi mantida constante a 0,005 mL/g DCW/min durante a fase de indução, por mais 22-23 horas, durante esse tempo a expressão intracelular de LPD-MAGE-3-His atingiu um nível máximo.

Recolheram-se alíquotas (15 mL) de caldo a intervalos regulares ao longo das fases de crescimento/indução e no fim da fermentação, para seguir as cinéticas de crescimento microbiano e expressão de produto intracelular e, além disso, para

proporcionar amostras para testes de identificação/pureza microbiana.

No final da fermentação, a densidade óptica da cultura era entre 80 e 120 (correspondendo a uma concentração celular entre 48 e 72 g DCW/L) e o volume líquido total era de, aproximadamente, 12 litros. A cultura foi rapidamente arrefecida até entre 6 e 10 °C e as células de ECK32 foram separadas do caldo da cultura por centrifugação a 5000 x g, a 4 °C, durante 30 minutos. As células concentradas de ECK32 foram rapidamente armazenadas em sacos de plástico e imediatamente congeladas a -80 °C.

## **2. Extração da proteína**

As células concentradas congeladas de ECK32 foram descongeladas a 4 °C antes de serem ressuspensas em tampão de rompimento de células, a uma densidade óptica final de 60 (correspondendo a uma concentração celular de, aproximadamente, 36 g DCW/L).

As células foram rompidas por duas passagens através de um homogeneizador de pressão elevada (1000 bar). A suspensão de células rompidas foi centrifugada (x 10000 g a 4 °C, durante 30 minutos) e a fracção de sedimento foi lavada duas vezes com Triton X100 (1% p/v) + EDTA (1 mM), seguido por uma lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) + Tween 20 (0,1% v/v) e, por fim, uma lavagem com PBS. Entre cada fase de lavagem, a suspensão foi centrifugada a x 10000 g durante 30 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e a fracção de sedimento foi retida.

### **EXEMPLO III**

#### **Caracterização de proteína de fusão Lipo D-MAGE 3:**

##### **1. Purificação**

A LPD-MAGE-3-His foi purificada a partir do homogenato celular utilizando uma sequência de passos descritos a seguir:

- a) - solubilização da fracção de sedimento lavado a partir do rompimento celular,
- b) - Redução química de ligações dissulfureto intra- e inter-proteína, seguida por bloqueio de grupos tiol para impedir re-acoplamento oxidativo,
- c) - Microfiltração da mistura reaccional para a remoção de partículas e redução de endotoxinas,
- d) - Captura e purificação primária de LPD-MAGE-3-His por exploração da interacção de afinidade entre a cauda de poli-histidina e Sepharose Quelante carregada com zinco,
- e) - Remoção de proteínas contaminantes por cromatografia de troca aniónica.

A LPD-MAGE-3-His purificada foi submetida a várias fases de aperfeiçoamento:

- f) - troca de tampão/remoção de ureia por cromatografia de exclusão de tamanhos, utilizando Superdex 75,
- g) - Filtração no processo,
- h) - Troca de tampão/dessalinização por cromatografia de exclusão de tamanhos, utilizando Sephadex G25.

Cada um destes passos é descrito em maior pormenor a seguir:

#### 1.1) - Solubilização do sedimento de homogenato celular

A fracção de sedimento da fase de lavagem final (como descrito acima) foi re-solubilizada de um dia para o outro em 800 mL de uma solução de cloridrato de guanidina (6 M) e fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0), a 4 °C.

#### 1.2) - Redução e carboximetilação

Fez-se fluir árgon no material solubilizado (uma suspensão amarelo pálido, turva) para purgar qualquer oxigénio remanescente e adicionou-se uma solução mãe de 2-mercaptoetanol (14 M), para se obter uma concentração final de 4,3 M (que correspondeu a 0,44 mL de 2-mercaptoetanol por mL de solução).

A solução resultante foi dividida e transferida para dois frascos de vidro que foram ambos aquecidos a 95 °C, num banho de água. Após 15 minutos a 95 °C, os frascos foram removidos do banho de água e deixados arrefecer, sendo em seguida os conteúdos reunidos num copo (5 L) coberto com folha de alumínio, colocado em gelo e adicionou-se iodoacetamida sólida com mistura vigorosa, para proporcionar uma concentração final de 6 M (que correspondeu a 1,11 g de iodoacetamida por mL de solução). A mistura foi mantida em gelo no escuro durante 1 hora, para assegurar a solubilização completa da iodoacetamida, antes de ser neutralizada (mantendo uma mistura vigorosa e monitorização

contínua de pH) pela adição de, aproximadamente, 1 litro de hidróxido de sódio (5 M) para se obter um pH final de 7,5-7,8.

A mistura resultante foi mantida em gelo no escuro, durante mais 30 minutos, após este tempo o pH foi re-ajustado para pH 7,5-7,8.

### 1.3) - Microfiltração

A mistura foi microfiltrada numa unidade de fluxo tangencial Amicon Proflux M12, equipada com um cartucho de fibra oca Minikos (ref. N° M22M-600-01N; área 5600 cm<sup>2</sup>, 0,2 µm). O permeato foi retido para purificação cromatográfica subsequente.

### 1.4) - Cromatografia (IMAC) de quelato metálico (Zn<sup>2+</sup>)

A cromatografia de quelato metálico foi realizada com Sepharose FF Quelante (Pharmacia Biotechnology Cat. N° 17-0575-01) empacotada numa coluna BPG 100/500 (Pharmacia Biotechnology Cat. N° 18-1103-01). As dimensões do leito empacotado eram: diâmetro 10 cm; área de corte transversal 79 cm<sup>2</sup>; altura do leito 19 cm; volume empacotado 1500 mL. A coluna vazia foi limpa com hidróxido de sódio (0,5 M) e, em seguida, lavada com água purificada.

O suporte (fornecido em etanol a 20% v/v) foi lavado com água purificada (8 litros) num funil de Buchner (sob vácuo) e carregado com zinco, passando, pelo menos, 15 litros de uma solução de ZnCl<sub>2</sub> (0,1 M). O excesso de zinco foi removido lavando o suporte com 10 litros de água purificada, até o pH do líquido

de saída atingir o pH da solução de  $\text{ZnCl}_2$  (pH 5,0). O suporte foi então equilibrado com 4 litros de uma solução contendo cloridrato de guanidina (6 M) e fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0).

O permeato de microfiltração, contendo LPD-MAGE-3-His, foi misturado com o suporte (ligação do lote) antes de carregar e empacotar a coluna BPG com a solução contendo cloridrato de guanidina (6 M) e fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0).

As fases seguintes da cromatografia de quelato metálico foram realizadas a uma velocidade de fluxo de eluente de 60 mL/min. A coluna foi lavada, primeiro com a solução contendo cloridrato de guanidina (6 M) e fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0), em seguida com a solução contendo ureia (6 M) e fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0), até o eluente de coluna atingir absorvância zero a  $\text{DO}_{280 \text{ nm}}$  (linha de base).

A fracção de proteína LPD-MAGE-3-His semi-pura foi eluída com 2 volumes de coluna de uma solução contendo ureia (6 M), fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e imidazole (0,5 M). A condutância desta fracção era, aproximadamente, 16 mS/cm.

#### 1.5) - Cromatografia de troca aniônica

Antes de continuar com cromatografia de troca aniônica, a condutância da fracção de proteína LPD-MAGE-3-His semi-pura foi reduzida para, aproximadamente, 4 mS/cm, por diluição com uma solução contendo ureia (6 M) e Tris-HCl (20 mM, pH 8,0).

Realizou-se cromatografia de troca aniônica utilizando Q-Sepharose FF (Pharmacia Biotechnology, Cat. N° 17-0510-01) empacotada numa coluna BPG 200/500 (Pharmacia Biotechnology Cat. N° 18-1103-11). As dimensões do leito empacotado eram: diâmetro 10 cm; área de corte transversal 314 cm<sup>2</sup>; altura do leito 9 cm; volume empacotado 2900 mL.

A coluna foi empacotada (com etanol a 20% v/v) e lavada com 9 litros de água purificada, a uma velocidade de fluxo de eluente de 70 mL/min. A coluna empacotada foi lavada com 3 litros de hidróxido de sódio (0,5 M), lavada com 30 litros de água purificada, em seguida equilibrada com 6 litros de uma solução contendo ureia (6 M) e Tris-HCl (20 mM, pH 8,0). A LPD-MAGE-3-His diluída semi-purificada foi carregada na coluna e, em seguida, lavada com 9 litros de uma solução contendo ureia (6 M), Tris-HCl (20 mM, pH 8,0), EDTA (1 mM) e Tween (0,1%), até a absorvância (280 nm) do eluente cair para zero.

Realizou-se outro passo de lavagem com 6 litros de uma solução contendo ureia (6 M) e Tris-HCl (20 mM, pH 8,0).

A LPD-MAGE-3-His purificada foi eluída da coluna com uma solução contendo ureia (6 M), Tris-HCl (20 mM, pH 8,0) e NaCl (0,25 M).

#### 1.6) - Cromatografia de exclusão de tamanhos

A remoção de ureia de LPD-MAGE-3-His purificada e a troca de tampão foram ambas realizadas por cromatografia de exclusão de tamanhos. Isto foi realizado utilizando Superdex 75 (Pharmacia Biotechnology Cat. N° 17-1044-01) empacotada numa coluna

XK 50/1000 (Pharmacia Biotechnology Cat. N° 18-8753-01). As dimensões do leito empacotado eram: diâmetro 5 cm; área de corte transversal 19,6 cm<sup>2</sup>; altura do leito 90 cm; volume empacotado 1800 mL.

A coluna foi empacotada em etanol (20%) e lavada com 5 litros de água purificada, a uma velocidade de fluxo de efluente de 20 mL/min. A coluna foi lavada com 2 litros de hidróxido de sódio (0,5 M), lavada com 5 litros de água purificada, em seguida, equilibrada com 5 litros de solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 80 (0,1% v/v).

A fracção de LPD-MAGE-3-His purificada (máximo 500 mL/corrida de dessalinização) foi carregada na coluna, a uma velocidade de fluxo de eluente de 20 mL/min. A LPD-MAGE-3-His purificada dessalinizada foi eluída da coluna com 3 litros de PBS contendo Tween 80 (0,1% v/v).

A fracção contendo LPD-MAGE-3-His é eluída no volume morto da coluna.

#### 1.7) - Filtração no processo

O volume de LPD-MAGE-3-His de cromatografia de exclusão de tamanhos foi filtrado através de uma membrana de 0,22 µm numa câmara de fluxo laminar (classe 10000). O volume filtrado foi congelado a -80 °C e armazenado até ao passo de dessalinização.

#### 1.8) - Cromatografia de dessalinização

Uma vez que a osmolaridade do volume final deveria ser inferior a 400 mOsm, foi necessário um passo adicional de troca de tampão, para reduzir a concentração de sal. Isto foi realizado por um passo de cromatografia de dessalinização, utilizando Sephadex G25 (Pharmacia Biotechnology Cat. N° 17-0033-02) empacotada numa coluna BPG 100/950 (Pharmacia Biotechnology Cat. N° 18-1103-03). As dimensões do leito empacotado eram: diâmetro 10 cm; área de corte transversal 78,6 cm<sup>2</sup>; altura do leito 85 cm; volume empacotado 6500 mL.

O Sephadex G25 foi hidratado com 7 litros de água purificada e deixado inchar durante a noite, a 4 °C. O gel foi então empacotado na coluna com água pura, a uma velocidade de fluxo de eluente de 100 mL/min.

A coluna foi lavada com 6 litros de hidróxido de sódio (0,5 M), em seguida, equilibrada com 10 litros de uma solução contendo fosfato de sódio (10 mM, pH 6,8), NaCl (20 mM) e Tween 80 (0,1% v/v).

A fracção de LPD-MAGE-3-His purificada (máximo 1500 mL/corrida de dessalinização) foi carregada na coluna a uma velocidade de fluxo de eluente de 100 mL/min. A fracção de LPD-MAGE-3-His purificada dessalinizada, eluída no volume morto da coluna foi filtrada em condições estéreis através de uma membrana de 0,22 µm e armazenada a -80 °C.

O volume de proteína final é descongelado a +4 °C antes de ser dividido em alíquotas para frascos e liofilizado num excipiente de lactose (3,2%).

## **2. Análise em géis de SDS-poliacrilamida corado com Coomassie**

O antigénio de LPD-MAGE-3-His purificado foi analisado por SDS-PAGE num gel de acrilamida a 12,5% em condições redutoras.

A carga de proteína era de 50 µg para coloração com azul de Coomassie e 5 µg para coloração com nitrato de prata. Foram analisados o lote clínico 96K19 e o lote piloto 96J22. Visualizou-se uma banda principal correspondendo a um peso molecular de 60 kDa. Também se observaram duas bandas menores adicionais de, aproximadamente, 45 kDa e 35 kDa.

## **3. Análise de transferência de Western**

Os péptidos revelados por análise SDS-PAGE da proteína LPD-MAGE-3-His foram identificados por transferência de Western utilizando anticorpos monoclonais de ratinhos. Estes anticorpos foram desenvolvidos no local, utilizando uma preparação purificada da proteína MAGE-3-His (esta proteína não contém a parte LPD da LPD-MAGE-3-His).

Selecionaram-se duas preparações de anticorpo monoclonal (Mab 22 e Mab 54) com base na sua adaptabilidade para análise de transferência de Western e utilizaram-se no teste de identidade para libertação de lote. A Figura 4 mostra os padrões de bandas obtidos para os lotes 96K19 e 96J22 após coloração com Mabs 32 e 54. Resolveram-se seiscentas (600) ng de proteína numa SDS-PAGE a 12,5%, transferiram-se para uma membrana de nylon, reagiram-se

com Mab 32 e 54 (60 µg/mL) e revelaram-se com anticorpos anti-ratinho acoplados a peroxidase.

Os péptidos de 60 kDa e 30 kDa detectados por SDS-PAGE são revelados por ambos os Mab.

#### **EXEMPLO IV:**

##### **1. Preparação de vacina utilizando proteína LPD-MAGE-3-His:**

A vacina utilizada nestas experiências é produzida a partir de um ADN recombinante codificando uma Lipoproteína D 1/3\_MAGE-3-His expressa em *E. coli* da estirpe AR58, adjuvada ou não. Como um adjuvante, a formulação compreende uma mistura de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) e QS21 numa emulsão de óleo/água. O sistema adjuvante SBAS2 foi anteriormente descrito no documento WO 95/17210.

**3D-MPL:** é um imunoestimulador derivado do lipopolissacárido (LPS) da bactéria Gram-negativa *Salmonella minnesota*. O MPL foi desacilado e não possui um grupo fosfato na unidade de lípido A. Este tratamento químico reduz drasticamente a toxicidade, ao mesmo tempo que preserva as propriedades imunoestimuladoras (Ribi, 1986). A Ribi Immunochemistry produz e fornece MPL a SB-Biologicals. Experiências realizadas na Smith Kline Beecham Biologicals mostraram que o 3D-MPL combinado com vários veículos aumenta fortemente a imunidade celular humoral e uma tipo TH1.

**QS21:** é uma molécula de saponina natural extraída da casca da árvore sul-americana Quillaja saponaria Molina. Uma técnica de purificação desenvolvida para separar as saponinas individuais

dos extractos brutos da casca, permitiu o isolamento da saponina particular, QS21, que é um glicósido triterpeno demonstrando actividade adjuvante mais forte e menor toxicidade comparada com o componente progenitor. Verificou-se que a QS21 activa CTL restritos a MHC de classe I a vários Ag de subunidade, bem como estimula a proliferação linfocítica específica de Ag (Kensil, 1992). A Aquila (formalmente Cambridge Biotech Corporation) produz e fornece QS21 a SB-Biologicals.

Experiências realizadas na SmithKline Beecham Biologicals demonstraram um efeito sinérgico claro de combinações de MPL e QS21 na indução de ambas as respostas imunitárias celulares humoral e tipo TH1.

**A emulsão óleo/água** é composta por uma fase orgânica feita de 2 óleos (um tocoferol e esqualeno) e uma fase aquosa de PBS contendo Tween 80 como emulsionante. A emulsão compreendia esqualeno a 5%, tocoferol a 5%, Tween 80 a 0,4% e possuía um tamanho de partícula médio de 180 nm e é conhecida como SB62 (ver documento WO 95/17210).

Experiências realizadas na SmithKline Beecham Biologicals demonstraram que a adição desta emulsão O/A a 3D-MPL/QS21 (SBAS2) aumenta ainda mais as propriedades imunoestimuladoras da última, contra vários antigénios de subunidade.

## **2. Preparação de emulsão SB62 (2 vezes concentrada)**

Dissolve-se Tween 80 numa solução salina tamponada com fosfato (PBS) para dar uma solução a 2% no PBS. Para proporcionar 100 mL de emulsão concentrada duas vezes, agitam-se

num vortex 5 g de DL alfa-tocoferol e 5 mL de esqualeno, para misturar completamente. É adicionado 90 mL de solução de PBS/Tween e misturado completamente. A emulsão resultante é então passada através de uma seringa e, por fim, microfluidizada utilizando uma máquina M110S microfluidics. As gotas de óleo resultantes possuem um tamanho de, aproximadamente, 180 nm.

**3. Preparação da formulação de óleo em água de Lipoprot. D1/3-MAGE-3-His QS21/3D MPL (SBAS2)**

O adjuvante é formulado como uma combinação de MPL e QS21, numa emulsão de óleo/água. Esta preparação é fornecida em frascos de 0,7 mL a serem misturados com o antigénio liofilizado (frascos contendo de 30 a 300 µg de antigénio).

A composição do diluente adjuvante para a vacina liofilizada é como se segue:

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (por dose)</b>
<u>Adjuvantes</u>	
Emulsão SB62:	250 µL
-Esqualeno	10,7 mg
-DL α-tocoferol	11,9 mg
-Tween 80	4,8 mg
Monofosforil lípido A	100 µg
QS21	100 µg

(continuação)

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (por dose)</b>
<u>Conservante</u>	
Tiomersal	25 ug
<u>Tampão</u>	
Água para injeção	q.b. para 0,5 mL
- Fosfato de sódio dibásico	575 µg
- Fosfato de potássio monobásico	100 µg
- Cloreto de potássio	100 µg
- Cloreto de sódio	4,0 mg

A vacina final é obtida após reconstituição da preparação de LPD-MAGE-3-His liofilizada com o adjuvante ou com PBS isolado.

Os controlos adjuvantes sem antigénio foram preparados substituindo a proteína por PBS.

#### **4. Antigénio de vacina: Proteína de fusão Lipoproteína D1/3-MAGE-3-His:**

A lipoproteína D é uma lipoproteína exposta na superfície da bactéria Gram-negativa *Haemophilus influenzae*.

A inclusão dos primeiros 109 resíduos da proteína D processada como parceiro de fusão é incorporada para proporcionar o antigénio de vacina com um epítipo de célula-T. Além da unidade LPD, a proteína contém dois aminoácidos não

relacionados (Met e Asp), os resíduos de aminoácido 2 a 314 de Mage-3, dois resíduos de Gly funcionando como região de dobra para expor os sete resíduos de His subsequentes.

#### **EXEMPLO V:**

##### **1. Imunogenicidade de LPD-MAG-3-His em ratinhos e macacos:**

De modo a testar a antigenicidade e Imunogenicidade da proteína MAGE-3 humana, a vacina candidata foi injectada em 2 estirpes de ratinho diferentes (C57BL/6 e Balb/C), variando no seu ruído de fundo genético e alelos de MHC.

Para ambas as estirpes de ratinhos, os motivos de péptidos potenciais de MHC de classe I e MHC de classe II foram teoricamente previstos para a parte MAGE da proteína de fusão LPD-MAGE-3-His.

##### a) - Protocolo de imunização

Injectaram-se 5 ratinhos de cada estirpe, duas vezes a intervalos de 2 semanas, na almofada da pata, com 5 µg de LPD-MAGE-3-His, formulada ou não em SBAS2 a 1/10 da concentração utilizada em experiências com humanos.

##### b) - Ensaio de proliferação

Prepararam-se linfócitos esmagando o baço ou os nódulos linfáticos popliteais dos ratinhos, 2 semanas após a última

injecção. Colocaram-se  $2 \times 10^5$  células em triplicado em placas de 96 poços e as células foram novamente estimuladas *in vitro* durante 72 horas com diferentes concentrações (1-0,1 µg/mL) de His-Mag 3, tal e qual ou revestindo microesferas de látex.

Observou-se uma actividade linfoproliferativa específica de MAGE-3 aumentada com ambas as células de baço (ver Figuras 5 e 7) e células de nódulos linfáticos (ver Figuras 6 e 8) de ratinhos C57BL/6 ou Balb/C, com a proteína LPD-MAGE-3-His, comparada com a resposta linfoproliferativa de ratinhos que receberam a formulação de SBAS-2 isolada ou PBS.

Além disso, obteve-se uma resposta proliferativa significativamente maior com linfócitos de ratinhos imunizados com LPD-MAGE-3-His no adjuvante SBAS2 (ver Figuras 6 e 8).

c) - Conclusão:

A LPD-MAGE-3-His é imunogénica em ratinhos e esta imunogenicidade pode ser aumentada pela utilização da formulação adjuvante de SBAS2.

## **2. Resposta de anticorpo:**

a) - Protocolo de imunização

Imunizaram-se ratinhos Balb/C ou C57BL/6 por 2 injecções intra almofada da pata, a intervalos de 2 semanas, com PBS ou SBAS2, ou 5 µg de LPD-MAGE-3-His, ou 5 µg de LPD-MAGE-3-His + SBAS2.

Utilizaram-se três e cinco animais nos grupos de controlo e nos grupos testados, respectivamente.

b) - ELISA indirecto:

Duas semanas após a segunda injeção, recolheram-se soros individuais e submeteram-se a um ELISA indirecto.

Utilizaram-se 2 µg/mL de His MAGE 3 purificado, como antigénio revestido. Após saturação durante 1 hora a 37 °C, em PBS + soro de vitela recém-nascida a 1%, os soros foram diluídos em série (começando a 1/1000) no tampão de saturação e incubados de um dia para o outro, a 4 °C ou 90 minutos a 37 °C. Após lavagem em PBS/Tween a 20,01%, utilizou-se IgG total biotinilado de cabra anti-ratinho, (1/1000) ou antisoros de cabra anti-ratinho IgG1, IgG2a, IgG2b (1/5000) como segundos anticorpos. Após 90 minutos de incubação a 37 °C, adicionou-se estreptavidina acoplada a peroxidase e utilizou-se TMB (peróxido de tetrametilbenzidina) como substrato. Após 10 minutos, a reacção foi bloqueada por adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M e determinou-se a D.O.

c) - Resultados:

A Figura 9 compara entre os grupos diferentes de ratinhos (N=5/grupo), o título do soro médio relativo, do ponto médio, que consiste na diluição média necessária para atingir o ponto médio das curvas.

Estes resultados mostram que em ambas as estirpes de ratinho testadas se desenvolve uma resposta de Ab fraca após 2 injeções de LPD-MAGE-3-His isolado, mas que se produzem concentrações maiores de Ab anti-MAGE-3 quando se injecta LPD-MAGE-3-His na presença de SBAS2. Assim, apenas 2 injeções de LPD-MAGE-3-His + SBAS2 a intervalos de 2 semanas são suficientes para produzir a resposta de Ab elevada observada.

A melhor resposta de Ab observada no ratinho Balb/c comparada com a resposta obtida no ratinho C57BL/6 pode ser explicada por diferenças nos haplotipos ou no fundo entre estas 2 estirpes, mesmo apesar de o título de Ab conseguido em ratinhos C57BL/6 ser também maior após injeções de LPD-MAGE-3-His + SBAS2 do que após injeções com LPD-MAGE-3-His isolado.

As respostas anti-MAGE-3 específicas de subclasses de Ig após vacinação nos diferentes grupos de ratinhos podem ser observadas nas Figuras 10 e 11 que dão uma comparação da diluição média de soro no ponto médio.

Não se detectou nem IgA, nem IgM em qualquer das amostras de soro, mesmo dos ratinhos vacinados com LPD-MAGE-3-His no adjuvante SBAS2.

Pelo contrário, o nível de IgG total era ligeiramente mais elevado nos soros de ratinhos vacinados com LPD-MAGE-3-His isolado e significativamente aumentado nos soros de animais injectados com LPD-MAGE-3-His em SBAS2.

A análise das diferentes concentrações de subclasses de IgG mostra que foi induzida uma resposta de Ab mista nos ratinhos,

uma vez que os níveis de todas as subclasses de IgG testadas (IgG1, IgG2a, IgG2b) eram mais elevados em ratinhos vacinados com o Ag adjuvado, do que em ratinhos injectados com o Ag ou o adjuvante isolado.

A natureza desta resposta de Ab mista após vacinação com LipoD-MAGE 3 na presença de SBAS2 parece, no entanto, depender da estirpe de ratinho, uma vez que o IgG1 e IgG2b foram encontrados, predominantemente, no soro de ratinhos Balb/c e C57BL/6, respectivamente.

### **3. Imunogenicidade da Lipoproteína D 1/3 MAGE3-His + adjuvante SBAS2 em macacos Rhesus**

Seleccionaram-se três grupos de cinco animais Rhesus (*Macaca Mulatta*). Utilizou-se RTS,S e gp120 como controlo positivo.

Grupos:

Grupo 1   perna direita: RTS,S/SBAS2  
          perna esquerda: GP120/SBAS2

Grupo 2   perna direita: RTS,S/SB26T  
          perna esquerda: GP120/SB26T

Grupo 3   perna direita: LipoD1/3 Mage 3 His/SBAS2

Os animais receberam a vacina no dia 0 e levaram um reforço no dia 28 e 84 e foram sangrados para determinar a sua resposta de anticorpo contra ambos os componentes de MAGE 3 e proteína D. As vacinas foram administradas intramuscularmente, como uma injeção de bólus (0,5 mL) na parte posterior da perna direita.

Recolheram-se pequenas amostras de sangue a cada 14 dias. Recolheram-se amostras de sangue não heparinizado de 3 mL a partir da veia femoral, deixou-se coagular durante, pelo menos, 1 hora e centrifugou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos, a 2500 rpm.

Removeu-se o soro, congelou-se a -20 °C e enviou-se para determinação dos níveis de anticorpo, por ELISA específico.

As microplacas de 96 poços (maxisorb Nunc) foram revestidas com 5 µg de His Mage 3 ou Proteína D de um dia para o outro, a 4 °C. Após 1 hora de saturação a 37 °C com PBS NCS a 1%, adicionaram-se diluições em série do soro de coelho durante 1,30 H, a 37 °C (começando em 1/10), após 3 lavagens em PBS Tween, adicionou-se soro anti-coelho biotinilado (Amersham ref RPN 1004 lote 88) (1/5000). As placas foram lavadas e adicionou-se estreptavidina acoplada a peroxidase (1/5000) durante 30 minutos, a 37 °C. Após lavagem, adicionaram-se 50 µL de TMB (BioRad) durante 7 minutos e a reacção foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 M e mediu-se a DO a 450 nm. Calcularam-se as diluições de ponto médio por SoftmaxPro.

### **Resposta de anticorpo:**

Recolheram-se pequenas amostras de sangue a cada 14 dias para seguir a cinética da resposta de anticorpo a Mage 3, por ELISA. Os resultados indicam que após uma injeção de LPD1/3 Mage 3 His + SBAS2, o título de Ig total específica para Mage 3 era baixo, observou-se um claro reforço em 3 de entre 5 animais após uma segunda e uma terceira injeção de LipoD1/3 Mage 3 + adjuvante, nos mesmos macacos. Os que respondem fracamente

permaneceram negativos, mesmo após 3 injeções. 28 dias pós II ou pós III, os títulos de anticorpo retornaram aos níveis basais. A subclasse destes anticorpos foi determinada como sendo predominantemente IgG e não IgM. A troca para IgG sugere que foi desencadeada uma resposta de auxiliar T. A resposta de anticorpo específico para proteína D, embora mais fraca, é exactamente equivalente à resposta de anticorpo Mage 3.

#### **EXEMPLO VI:**

##### **1. LPD-MAGE 1 His**

De um modo análogo preparou-se LPD-MAGE 1-His. As sequências de aminoácidos e ADN são apresentadas na SEQUÊNCIA ID Nº 3 e 4. A proteína resultante foi purificada de um modo análogo à proteína LPD-MAGE-3-His. Em resumo, a cultura celular foi homogeneizada e tratada com guanidina 4 M, HCl e beta-mercaptoetanol 0,5 M, na presença de detergente Empigen a 0,5%. O produto foi filtrado e o permeato tratado com iodoacetamida 0,6 M. As fracções carboxiamidadas foram submetidas a cromatografia IMAC (Quelato de zinco-sepharose FF). A coluna foi em primeiro lugar equilibrada e lavada com uma solução contendo guanidina 4 M. HCl e fosfato de sódio (20 mM, pH 7,5) e Empigen a 0,5%, em seguida a coluna foi lavada com uma solução contendo ureia 4 M em fosfato de sódio (20 mM, pH 7,5), tampão Empigen a 0,5%. A proteína foi eluída no mesmo tampão, mas com concentrações crescentes de Imidazolo (20 mM, 400 mM e 500 mM).

O eluato foi diluído com Ureia 4 M. A coluna de Q-sepharose foi equilibrada e lavada com Ureia 4 M em tampão fosfato 20 mM

(pH 7,5) na presença de Empigen a 0,5%. Realizou-se uma segunda lavagem no mesmo tampão, mas sem detergente. A proteína foi eluída no mesmo tampão mas com concentrações crescentes de Imidazolo (150 mM, 400 mM, 1 M). O eluato foi ultrafiltrado.

#### **EXEMPLO VII:**

**Construção do plasmídeo de expressão pRIT14426 e transformação da estirpe hospedeira AR58 para produzir NS1-MAGE-3 His:**

#### **Concepção da proteína**

A concepção da proteína de fusão NS1, -MAGE-3-His a ser expressa em *E. coli* está descrita na Figura 12.

A estrutura primária da proteína resultante possui a sequência apresentada na ID N° 5.

A sequência codificante (ID N° 6) correspondente à concepção de proteína acima foi colocada sob o controlo de promotor  $\lambda$ pL num plasmídeo de expressão de *E. coli*.

**A estratégia de clonagem para a produção de proteína de fusão NS<sub>1</sub>-MAGE-3-His:**

O material de partida era um plasmídeo de ADNc recebido do Dr. Thierry Boon do Ludwig Institute, contendo a sequência codificante para gene MAGE-3 e o vector PMG81, contendo o aa 81

da região codificante de NS<sub>1</sub> (proteína não estrutural) de *Influenza*.

A estratégia de clonagem descrita na Figura 13 incluiu os seguintes passos:

- a) amplificação por PCR das sequências apresentadas no plasmídeo de ADNc de MAGE 3, utilizando o oligonucleótido de sentido: 5'gc gcc atg gat ctg gaa cag cgt agt cag cac tgc aag cct e o oligonucleótido anti-sentido: 5' gcg tct aga tta atg gtg atg gtg atg gtg atg acc gcc ctc ttc ccc ctc tct caa.

Esta amplificação leva às seguintes modificações no terminal-N: alteração dos primeiros cinco codões para a utilização de codão de *E. coli*, substituição do codão de Pro por um codão de Asp na posição 1, instalação de um sítio de NcoI na extremidade 5' e, por fim, adição dos 2 codões de Gly e do codão de 7 His, seguido de um sítio de XbaI no terminal-C.

- b) Clonagem no vector de clonagem TA da invitrogen, do fragmento acima amplificado e preparação do vector intermediário pRIT14647.
- c) Excisão da forma de fragmento NcoI XbaI do plasmídeo pRIT14647 e clonagem no vector pRIT PMG81
- d) Transformação da estirpe hospedeira AR58

- e) Selecção e caracterização dos transformantes da estirpe de *E. coli* contendo o plasmídeo pRIT14426 (ver Figura 14) expressando a proteína de fusão NS1-MAGE-3-His.

#### **Caracterização da NS<sub>1</sub>-MAGE-3-His recombinante (pRIT14426):**

As bactérias foram crescidas em Meio LB suplementado com canamicina 50 µg/mL a 30 °C. Quando a cultura atingiu uma DO = 0,3 (a 620 nm), conseguiu-se uma indução por calor aumentando a temperatura para 42 °C.

Após 4 horas de indução, as células foram recolhidas, ressuspensas em PBS e lisadas (por desintegração), prensando três vezes na prensa Francesa. Após centrifugação (60 minutos a 100000 g) o sedimento sobrenadante e o extracto total foram analisados por SDS-PAGE. As proteínas foram visualizadas em géis corados com Coomassie B1, em que a proteína de fusão representava cerca de 1% das proteínas totais de *E. coli*. A proteína recombinante surgiu como uma banda única com um PM aparente de 44,9 K. A proteína de fusão foi identificada por análise de transferência de Western utilizando anti-NS1 monoclonal.

#### **EXEMPLO VIII:**

Purificação de NS1-MAGE-3-His (*E. coli*) para Imunização de Coelho/Ratinho

Esquema de purificação:

Utilizou-se o esquema de purificação seguinte para purificar o antigénio:

Lise de células + centrifugação

Solubilização de antigénio + centrifugação

Ni<sup>2+</sup> +-NTA agarose

Concentração

Preparação celular

Precipitação com TCA e solubilização com PBS

a. Lise

As células bacterianas (23 g) foram lisadas em 203 mL de um tampão PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7 por Rannie (homogeneizador) e o lisado foi centrifugado num rotor JA 20 a 15000 rpm durante 30 minutos.

O sobrenadante foi desprezado.

b. Solubilização do antigénio

1/3 do sedimento foi re-solubilizado O/N a 4 °C em 34 mL de PO<sub>4</sub> 100 mM - GuHCl 6 M, pH 7. Após centrifugação num rotor JA 20

a 15000 rpm durante 30 minutos, o sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi posteriormente purificado por IMAC.

c. cromatografia de afinidade: Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose (Qiagen)

Volume de coluna: 15 mL (16 mm x 7,5 cm)

Tampão de empacotamento: PO<sub>4</sub> 0,1 M - GuHCl 6 M, pH 7

Tampão de amostra: idem

Tampão de lavagem: PO<sub>4</sub> 0,1 M - GuHCl 6 M, pH 7

PO<sub>4</sub> 0,1 M - ureia 6 M, pH 7

Eluição: gradiente de imidazole (0→250 mM) em tampão PO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 7 suplementado com ureia 6 M.

Velocidade de fluxo: 2 mL/min

a. Concentração:

Reuniram-se fracções positivas de antigénio do eluato de IMAC (160 mL) e concentraram-se para 5 mL numa célula agitada Amicon numa membrana Filtron (exclusão de 10000 tipo Omega). A pureza nesta fase é cerca de 70%, como estimado por SDS-PAGE.

b. Electroforese preparativa (Prep Cell Biorad)

Ferve-se 2,4 mL da amostra concentrada em 0,8 mL de tampão de amostra redutor e carrega-se num gel de acrilamida a 10%. O

antigénio foi eluído num tampão Tris-Glicina, pH 8,3 suplementado com SDS a 4% e reuniram-se as fracções positivas de NS<sub>1</sub>-MAGE 3 His.

a. Precipitação com TCA:

O antigénio foi precipitado com TCA e, após centrifugação num rotor JA 20 a 15000 rpm durante 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi re-solubilizado em tampão PBS, pH 7,4.

A proteína é solúvel em PBS após congelação/descongelação, não apresenta qualquer degradação quando armazenada durante 3 horas a 37 °C e possui um peso molecular aparente de, aproximadamente, 50000 Daltons, como determinado por SDS (PAGE a 12,5%).

**EXEMPLO IX:**

**Preparação da estirpe de *E. coli* expressando uma proteína de fusão CLYTA-MAGE-1-cauda His**

**1. Construção do plasmídeo de expressão pRIT14613 e transformação da estirpe hospedeira AR58:**

**Concepção de proteína**

A concepção da proteína de fusão Clyta-Mage-1-His a ser expressa em *E. coli* é descrita na Figura 15.

A estrutura primária da proteína resultante possui a sequência apresentada na sequência ID N° 7.

A sequência codificante (ver SEQUÊNCIA ID N° 8) correspondente à concepção de proteína acima foi colocada sob o controle de promotor  $\lambda$ pL num plasmídeo de expressão em *E. coli*.

### **Clonagem:**

O material de partida foi o **vector PCUZ1** que contém os 117 codões de terminal-C da região codificante de LytA de *Streptococcus pneumoniae* e o **vector pRIT14518**, em que foi previamente subclonado o ADNc de gene MAGE-1 de um plasmídeo recebido do Dr. Thierry Boon do Ludwig Institute.

A estratégia de clonagem para a expressão de proteína CLYTA-Mage-1-His (ver Figura 16) incluiu os passos seguintes:

## **2. Preparação do módulo de sequência codificante de CLYTA-Mage-1-His**

- a) O primeiro passo foi uma amplificação por PCR destinada a flanquear as sequências de CLYTA com os sítios de restrição de NdeI-AflIII. A amplificação por PCR foi feita utilizando o plasmídeo PCUZ1 como modelo e como iniciadores o oligonucleótido de sentido: 5' tta aac cac acc tta agg agg ata taa cat atg aaa ggg gga att gta cat tca gac e o oligonucleótido anti-sentido: 5' GCC AGA CAT GTC CAA TTC TGG CCT GTC TGC CAG. Isto

leva à amplificação de uma sequência de CLYTA de 378 nucleótidos de comprimento.

- b) o segundo passo foi ligar sequências de CLYTA às sequências de MAGE-1-His, para produzir a sequência codificante para a proteína de fusão. Este passo incluiu a excisão de um fragmento NdeI-AflIII de Clyta e inserção no vector pRIT14518 anteriormente aberto pelas enzimas de restrição NdeI e NcoI (compatível com NcoI e AflIII) e originou o plasmídeo pRIT14613.
- c) transformação da estirpe hospedeira AR58
- d) Selecção e caracterização do transformante de *E. coli* (resistente a KAN) contendo o plasmídeo pRIT14613 (Ver figura 16).

### **1. Caracterização da proteína recombinante CLYTA-MAGE-1-His (pRIT14613):**

As bactérias foram crescidas em Meio LB suplementado com canamicina 50 µg/mL a 30 °C. Quando a cultura atingiu uma DO = 0,3 (a 620 nm), conseguiu-se uma indução por calor aumentando a temperatura para 38 °C.

Após 4 horas de indução, as células foram recolhidas, ressuspensas em PBS e lisadas (por desintegração) por um pulso. Após centrifugação o sedimento sobrenadante e extracto total foram analisados por SDS-PAGE. As proteínas foram visualizadas em géis corados com Coomassie B1, em que a proteína de fusão

representava cerca de 1% das proteínas totais de *E.coli*. A proteína recombinante surgiu como uma banda única com um PM aparente de cerca de 49 kD. A proteína de fusão foi identificada por análise de transferência de Western utilizando anticorpos policlonais anti-Mage-1.

**Reconstituição da unidade de expressão composta pelo promotor  $\lambda$ pL longo (útil para indução de ácido Nalidíxico) e a sequência codificante de CLYTA-Mage-1 pRIT14616):**

Preparou-se um fragmento de restrição EcoRI-NCO<sub>1</sub> contendo o promotor PL longo e uma parte de sequências de CLYTA foi preparada a partir do plasmídeo pRIT DV46 e inseriu-se entre os sítios de EcoRI-NCO<sub>1</sub> do plasmídeo pRIT14613.

Obteve-se o plasmídeo recombinante pRIT14616.

Utilizou-se o plasmídeo recombinante pRIT14616 (ver figura 17), codificando a proteína de fusão CLYTA-Mage-1-His, para transformar *E. coli* AR120. Selecionou-se e caracterizou-se uma estirpe candidata resistente Kan.

**Caracterização da proteína recombinante:**

Cresceram-se bactérias em Meio LB suplementado com canamicina 50 mg/mL a 30 °C. Quando a cultura atingiu uma DO = 400 (a 620 nm) adicionou-se ácido Nalidíxico a uma concentração final de 60 mg/mL.

Após 4 horas de indução, as células foram recolhidas, ressuspensas em PBS e lisadas por desintegração (desintegração de CLS de tipo "um pulso"). Após centrifugação o sedimento, sobrenadante e extracto total foram analisados por SDS-PAGE. As proteínas foram visualizadas em géis corados com azul de Coomassie, em que a proteína de fusão representava cerca de 1% das proteínas totais de *E. coli*. A proteína de fusão foi identificada por análise de transferência de Western utilizando anticorpos policlonais de coelho anti-Mage-1. A proteína recombinante surgiu como uma banda única com um PM aparente de cerca de 49 kD.

#### **EXEMPLO X:**

##### **CLYTA-MAGE-3-HIS**

A: antigénio recombinante de rejeição de tumor: uma proteína de fusão CLYTA-Mage-3-His, em que o parceiro de fusão C-lyt A leva à expressão de uma proteína solúvel, actua como marcador de afinidade e proporciona um auxiliar T útil.

Preparação da estirpe de *E. coli* expressando uma proteína de fusão CLYTA-Mage-3-cauda His

Construção do plasmídeo de expressão pRIT14646 e transformação da estirpe hospedeira AR 120:

### Concepção de proteína:

A concepção da proteína de fusão Clyta-Mage-3-His a ser expressa em *E. coli* é descrita na Figura 18.

A estrutura primária da proteína resultante possui a sequência descrita na SEQUÊNCIA ID N° 9: e a sequência codificante na sequência ID N° 10

A sequência codificante correspondente à concepção de proteína acima foi colocada sob o controle de promotor  $\lambda$ pL num plasmídeo de expressão em *E. coli*.

### Clonagem:

O material de partida era **o vector PCUZ1** que contém os 117 codões de terminal-C da região codificante de LytA de *Streptococcus pneumoniae*, descritos em Gene 43 (1986) p. 265-272 e **o vector pRIT14426** em que foi previamente subclonado o ADNc de gene MAGE-3 de um plasmídeo recebido do Dr. Thierry Boon do Ludwig Institute.

A estratégia de clonagem para a expressão da proteína CLYTA-MAGE-3-His (ver o sublinhado na Figura 19) incluiu os seguintes passos:

## **1. Preparação do módulo de sequência codificante de CLYTA-MAGE-3-His**

1.1. O primeiro passo foi uma amplificação por PCR destinada a flanquear as sequências de CLYTA com os sítios de restrição de AflII e AflIII. A amplificação por PCR foi realizada utilizando o plasmídeo **PCUZ1** como modelo e como iniciadores o oligonucleótido de sentido: 5' tta aac cac acc tta agg agg ata taa cat atg aaa ggg gga att gta cat tca gac e o oligonucleótido de anti-sentido: 5' ccc aca tgt cca gac tgc tgg cca att ctg gcc tgt ctg cca gtg. Isto leva à amplificação de uma sequência CLYTA de 427 nucleótidos de comprimento. O fragmento amplificado acima foi clonado no vector de clonagem TA de Invitrogen, para se obter o vector intermediário pRIT14661.

1.2. O segundo passo foi ligar as sequências de CLYTA às sequências de MAGE-3-His para produzir a sequência codificante para a proteína de fusão. Este passo incluiu a excisão de um fragmento Clyta Afl II-Afl III e inserção no vector pRIT14426, previamente aberto pelas enzimas de restrição AflII e NcoI (compatível com NcoI e AflII) e originou o plasmídeo pRIT14662.

## **2. Reconstituição da unidade de expressão composta pelo promotor $\lambda$ pL longo (útil para indução com ácido Nalidíxico) e a sequência codificante de CLYTA-Mage-3:**

Preparou-se um fragmento de restrição BglIII-XbaI contendo o promotor pL curto e as sequências codificantes de CLYTA-Mage-3-His a partir do plasmídeo pRIT114662 e inseriu-se entre os sítios BglIII-XbaI do plasmídeo TCM67 (um derivado de

pBR322 contendo a resistência a ampicilina e o promotor  $\lambda$ pL longo, descrito no pedido internacional PCT/EP92/01827). Obteve-se o plasmídeo pRIT14607.

Utilizou-se o plasmídeo recombinante pRIT14607 codificando a proteína ***Clyta-Mage-3-His*** para transformar *E. coli* AR 120 (Mott *et al.* 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:88). Uma estirpe candidata resistente a ampicilina foi seleccionada e caracterizada.

### **3. Preparação de plasmídeo pRIT14646:**

Por fim, construiu-se um plasmídeo semelhante a pRIT 14607, mas possuindo a selecção para Canamicina (pRIT 14646).

### **Caracterização da proteína recombinante:**

As bactérias foram crescidas em Meio LB suplementado com canamicina 50 mg/mL a 30 °C. Quando a cultura atingiu uma DO = 400 (a 600 nm) adicionou-se ácido Nalidíxico a uma concentração final de 60?g/mL.

Após 4 horas de indução, as células foram recolhidas, ressuspensas em PBS e lisadas por desintegração (desintegração CLS de tipo "um pulso"). Após centrifugação, o sedimento, sobrenadante e extracto total foram analisados por SDS-PAGE. As proteínas foram visualizadas em géis corados com azul de Coomassie, em que a proteína de fusão representava cerca de 1% das proteínas totais de *E. Coli*. A proteína de fusão foi identificada por análise de transferência de Western, utilizando

anticorpos policlonais de coelho anti-Mage-3. A proteína recombinante surgiu como uma banda única, com um PM aparente de cerca de 58 kD.

#### **EXEMPLO XI:**

##### **Purificação da proteína recombinante CLYTA-Mage-3 His:**

Cresceram-se bactérias recombinantes AR120 (pRIT 14646) num fermentador de 20 litros, sob condições de alimentação-descontínua, a 30°C. A expressão da proteína recombinante foi induzida adicionando ácido Nalidíxico a uma concentração final de 60? g/mL. As células foram recolhidas no final da fermentação e lisadas a 60 DO/600 por duas passagens através de uma Prensa Francesa (20000 psi). As células lisadas foram sedimentadas 20 min a 15000 g a 4 °C. O sobrenadante contendo a proteína recombinante foi carregado em resina DEAE Sepharose CL6B (Pharmacia) pré-equilibrada em Tampão A NaCl 0,3 M, Tris-HCl 20 M, pH 7,6. Após uma lavagem de coluna com tampão A, a proteína de fusão foi eluída por colina a 2% em (tampão A). Reuniram-se fracções de antigénio positivas, como revelado por análise de transferência de Western, utilizando um anticorpo anti-Mage-3. O antigénio eluído com DEAE foi ajustado para 0,5% de Empigen BB (um detergente zwitteriónico) e NaCl 50 M antes de carregar numa coluna de cromatografia de Afinidade de Metal Iónico, pré-equilibrada em Empigen BB a 0,5%, NaCl 0,5 M, tampão fosfato 50 mM, pH 7,6 (tampão B).

A coluna IMAC foi lavada com tampão B até absorvância a 280 nm atingir a linha de base. Fez-se uma segunda lavagem em tampão B sem Empigen BB (tampão C), de modo a eliminar o

detergente, antes de eluição de Antígeno por um gradiente de Imidazole 0-250 mM Imidazole em tampão C.

As fracções de Imidazole 0,090-0,250 M foram reunidas, concentradas numa membrana Filtron Omega de 10 kDa antes de diálise *versus* tampão PBS.

### **CONCLUSÃO:**

A requerente demonstrou que a proteína fundida LPD-MAGE-His é imunogénica em ratinhos e que esta Imunogenicidade (a resposta proliferativa e resposta de anticorpo) pode ser ainda aumentada pela utilização do adjuvante descrito acima. A purificação pode ser melhorada derivatizando os tióis que formam ligações dissulfureto.

A requerente também demonstrou que uma melhor resposta de anticorpo foi desencadeada pela vacinação com o LPD-MAGE-3-His na presença do adjuvante. O isotipo predominante encontrado no soro de C57BL/6 sendo IgG2b sugere que se produziu uma resposta imunitária do tipo TH1.

Na experiência clínica de humano, eliminou-se o melanoma de um doente tratado com LPD-MAGE3-His numa formulação sem adjuvante.

### **REFERÊNCIAS**

-Anichini A., Fossati G., Parmiani G. *Immunol. Today*, 8: 385 (1987).

- De Plaen E., Arden K., Traversari C., *et al.* *Immunogenetics*, 40: 360 (1994).
- Gaugler B., Van den Eynde B., van der Bruggen P., *et al.* *J. Exp. Med.*, 179: 921 (1994).
- Herman J., van der Bruggen P., Immanuel F., *et al.* *Immunogenetics*, 43: 377 (1996).
- Inoue H., Mori M., Li J., *et al.* *Int. J. Cancer*, 63: 523 (1995).
- Kensil C.R., Soltysik S., Patel U., *et al.* in: Channock R.M., Ginsburg H.S., Brown F., *et al.* (ed.), *Vaccines 92*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.I.), 36-40: (1992).
- Knuth A., Danowski B., Oettgen H.F., *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 81: 3511 (1984).
- Patard J.J., Brasseur F., Gil-Diez S., *et al.* *Int. J. Cancer*, 64: 60 (1995).
- Ribi E., *et al.* em: Levine L., Bonvenue P.F., Morello J., *et al.* (ed). American Society for Microbiology, Washington DC, *Microbiology 1986*, 9-13; (1986).
- Van den Eynde B., Hainaut P., Hérin M. *et al.* *Int. J. Cancer*, 44: 634 (1989).

-Van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., et al. *Science*, 254: 1643 (1991).

-Van der Bruggen P., Bastin J., Gajewski T., et al. *Eur. J. Immunol.*, 24: 3038 (1994).

-Van Pel A., van der Bruggen P., Coulie P.G., et al., *Immunol. Rev.*, 145: 229 (1995).

-Weynants P., Lethé B., Brasseur F., et al. *Int. J. Cancer*, 56: 826 (1994).

-Nishimura S, Fujita M, Terata N, Tani T, Kodama M, Itoh K, *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 1997. Abr, 20 (2): 95-101.

-Fuijie T et al., *Ann Oncol* 1997 Abr, 8 (4): 369-72.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

(1) INFORMAÇÃO GERAL

- (i) REQUERENTE: SmithKline Beecham Biologicals
  
- (ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Vacina
  
- (iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 10
  
- (iv) MORADA PARA CORRESPONDÊNCIA
  - (A) DESTINATÁRIO: SmithKline Beecham
  - (B) RUA: 2 New Horizons Court, Great West Road, B
  - (C) CIDADE: Midxx
  - (D) ESTADO:
  - (E) PAÍS: RU
  - (F) CÓDIGO POSTAL: TW8 9EP
  
- (v) FORMA DE LEITURA DO COMPUTADOR:
  - (A) TIPO DE MEIO: disquete
  - (B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: DOS
  - (D) SOFTWARE: FastSEQ para Windows versão 2.0
  
- (vi) DADOS DO PEDIDO ACTUAL:
  - (A) NÚMERO DO PEDIDO:
  - (B) DATA DE DEPÓSITO:
  - (C) CLASSIFICAÇÃO:
  
- (vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:
  - (A) NÚMERO DO PEDIDO:
  - (B) DATA DE DEPÓSITO:

(viii) INFORMAÇÃO PARA MANDATÁRIO/AGENTE:

(A) NOME: Dalton, Marcus J.

(B) NÚMERO DE REGISTO:

(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/ENTRADA: B45126

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES

(A) TELEFONE: 0181 9756348

(B) TELEFAX: 0181 9756177

(C) TELEX:

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 452 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 1:

Met	Asp	Pro	Lys	Thr	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Val	Leu
1				5					10					15	
Ala	Gly	Cys	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
			20					25					30		
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro



(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 1353 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 2:

```
ATGGATCCAA AAACTTTAGC CCTTTCTTTA TTAGCAGCTG GCGTACTAGC AGGTTGTAGC      60
AGCCATTCAT CAAATATGGC GAATACCCAA ATGAAATCAG ACAAATCAT TATTGCTCAC      120
CGTGGTGCTA GCGGTTATTT ACCAGAGCAT ACGTTAGAAT CTAAAGCACT TGCGTTTGCA      180
CAACAGGCTG ATTATTTAGA GCAAGATTTA GCAATGACTA AGGATGGTCG TTTAGTGGTT      240
ATTCACGATC ACTTTT TAGA TGGCTTGACT GATGTTGCGA AAAAAATTCCC ACATCGTCAT      300
CGTAAAGATG GCCGTTACTA TGTCATCGAC TTTACCTTAA AAGAAATTCA AAGTTTAGAA      360
ATGACAGAAA ACTTTGAAAC CATGGATCTG GAACAGCGTA GTCAGCACTG CAAGCCTGAA      420
GAAGGCCTTG AGGCCCCGAGG AGAGGCCCTG GGCCTGGTGG GTGCGCAGGC TCCTGCTACT      480
GAGGAGCAGG AGGCTGCCTC CTCCTCTTCT ACTCTAGTTG AAGTCACCCCT GGGGGAGGTTG      540
CCTGCTGCCG AGTCACCAGA TCCTCCCCAG AGTCCTCAGG GAGCCTCCAG CCTCCCCACT      600
ACCATGAACT ACCCTCTCTG GAGCCAATCC TATGAGGACT CCAGCAACCA AGAAGAGGAG      660
GGGCCAAGCA CCTTCCCTGA CCTGGAGTCC GAGTTCCAAG CAGCACTCAG TAGGAAGGTG      720
GCCGAATTGG TTCATTTTCT GCTCCTCAAG TATCGAGCCA GGGAGCCGGT CACAAAGGCA      780
GAAATGCTGG GGAGTGTCTG CGGAAATTGG CAGTATTTCT TTCCTGTGAT CTTGAGCAAA      840
GCTTCCAGTT CCTTGCAGCT GGTCTTTGGC ATCGAGCTGA TGGAAGTGGA CCCCATCGGC      900
CACTTGACAC TCTTTGCCAC CTGCCTGGGC CTCTCCTACG ATGGCCTGCT GGGTGACAAT      960
CAGATCATGC CCAAGGCAGG CCTCCTGATA ATCGTCCTGG CCATAATCGC AAGAGAGGGC     1020
GACTGTGCCC CTGAGGAGAA AATCTGGGAG GAGCTGAGTG TGTTAGAGGT GTTTGAGGGG     1080
AGGGAAGACA GTATCTTGGG GGATCCCAAG AAGCTGCTCA CCCAACATTT CGTGCAGGAA     1140
AACTACCTGG AGTACCGGCA GGTCCCCGGC AGTGATCCTG CATGTTATGA ATTCCTGTGG     1200
GGTCCAAGGG CCCTCGTTGA AACCAGCTAT GTGAAAGTCC TGCACCATAT GGTAAGATC     1260
AGTGGAGGAC CTCACATTC CTACCCACCC CTGCATGAGT GGGTTTTGAG AGAGGGGGAA     1320
GAGGGCGGTC ATCACCATCA CCATCACCAT TAA                                     1353
```

2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 1341 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 3:

ATGGATCCAA	AAACTTTAGC	CCTTTCTTTA	TTAGCAGCTG	GCGTACTAGC	AGGTTGTAGC	60
AGCCATTCAT	CAAATATGGC	GAATACCCAA	ATGAAATCAG	ACAAAATCAT	TATTGCTCAC	120
CGTGGTGCTA	GCGGTTATTT	ACCAGAGCAT	ACGTTAGAAT	CTAAAGCACT	TGCGTTTGCA	180
CAACAGGCTG	ATTATTTAGA	GCAAGATTTA	GCAATGACTA	AGGATGGTCG	TTTAGTGGTT	240
ATTCACGATC	ACTTTT TAGA	TGGCTTGACT	GATGTTGCGA	AAAAATCCC	ACATCGTCAT	300
CGTAAAGATG	GCCGTTACTA	TGTCATCGAC	TTTACCTTAA	AAGAAATCA	AAGTTTAGAA	360
ATGACAGAAA	ACTTTGAAAC	CATGGGCTCT	CTGGAACAGC	GTAGTCTGCA	CTGCAAGCCT	420
GAGGAAGCCC	TTGAGGCCCA	ACAAGAGGCC	CTGGGCCTGG	TGTGTGTGCA	GGCTGCCACC	480
TCCTCCTCCT	CTCCTCTGGT	CCTGGGCACC	CTGGAGGAGG	TGCCCCACTGC	TGGGTCAACA	540
GATCCTCCCC	AGAGTCCTCA	GGGAGCCTCC	GCCTTTCCCA	CTACCATCAA	CTTCACTCGA	600
CAGAGGCAAC	CCAGTGAGGG	TTCCAGCAGC	CGTGAAGAGG	AGGGGCCAAG	CACCTCTTGT	660
ATCCTGGAGT	CCTTGTCCG	AGCAGTAATC	ACTAAGAAGG	TGGCTGATTT	GGTTGGTTTT	720
CTGCTCCTCA	AATATCGAGC	CAGGGAGCCA	GTCACAAAGG	CAGAAATGCT	GGAGAGTGTC	780
ATCAAAAATT	ACAAGCACTG	TTTTCTTGAG	ATCTTCGGCA	AAGCCTCTGA	GTCCTTGCGAG	840
CTGGTCTTTG	GCATTGACGT	GAAGGAAGCA	GACCCACCG	GCCACTCCTA	TGTCCTTGTC	900
ACCTGCCTAG	GTCTCTCCTA	TGATGGCCTG	CTGGGTGATA	ATCAGATCAT	GCCCAAGACA	960
GGCTTCCTGA	TAATTGTCCT	GGTCATGATT	GCAATGGAGG	GCGGCCATGC	TCCTGAGGAG	1020
GAAATCTGGG	AGGAGCTGAG	TGTGATGGAG	GTGTATGATG	GGAGGGAGCA	CAGTGCCTAT	1080
GGGGAGCCCA	GGAAGCTGCT	CACCCAAGAT	TTGGTGCAGG	AAAAGTACCT	GGAGTACCGG	1140
CAGGTGCCGG	ACAGTGATCC	CGCACGCTAT	GAGTTCCTGT	GGGGTCCAAG	GGCCCTCGCT	1200
GAAACCAGCT	ATGTGAAAGT	CCTTGAGTAT	GTGATCAAGG	TCAGTGCAAG	AGTTCGCTTT	1260
TTCTTCCCAT	CCCTGCGTGA	AGCAGCTTTG	AGAGAGGAGG	AAGAGGGAGT	CGGCGGTCAT	1320
CACCATCACC	ATCACCATTA	A				1341

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 466 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 4:

Met Asp Pro Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu  
1 5 10 15  
Ala Gly Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys  
20 25 30  
Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro  
35 40 45  
Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp  
50 55 60  
Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val  
65 70 75 80  
Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe  
85 90 95  
Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr  
100 105 110  
Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Met  
115 120 125  
Gly Ser Leu Glu Gln Arg Ser Leu His Cys Lys Pro Glu Glu Ala Leu  
130 135 140  
Glu Ala Gln Gln Glu Ala Leu Gly Leu Val Cys Val Gln Ala Ala Thr  
145 150 155 160  
Ser Ser Ser Ser Pro Leu Val Leu Gly Thr Leu Glu Glu Val Pro Thr  
165 170 175  
Ala Gly Ser Thr Asp Pro Pro Gln Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ala Phe  
180 185 190  
Pro Thr Thr Ile Asn Phe Thr Arg Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gly Ser  
195 200 205  
Ser Ser Arg Glu Glu Glu Gly Pro Ser Thr Ser Cys Ile Leu Glu Ser  
210 215 220  
Leu Phe Arg Ala Val Ile Thr Lys Lys Val Ala Asp Leu Val Gly Phe  
225 230 235 240  
Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met  
245 250 255  
Leu Glu Ser Val Ile Lys Asn Tyr Lys His Cys Phe Pro Glu Ile Phe  
260 265 270  
Gly Lys Ala Ser Glu Ser Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Asp Val Lys  
275 280 285  
Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr Val Leu Val Thr Cys Leu Gly  
290 295 300  
Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp Asn Gln Ile Met Pro Lys Thr  
305 310 315 320  
Gly Phe Leu Ile Ile Val Leu Val Met Ile Ala Met Glu Gly Gly His  
325 330 335  
Ala Pro Glu Glu Glu Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Met Glu Val Tyr  
340 345 350  
Asp Gly Arg Glu His Ser Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr  
355 360 365  
Gln Asp Leu Val Gln Glu Lys Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Asp  
370 375 380  
Ser Asp Pro Ala Arg Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala  
385 390 395 400  
Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val Ser Ala  
405 410 415  
Arg Val Arg Phe Phe Phe Pro Ser Leu Arg Glu Ala Ala Leu Arg Glu  
420 425 430  
  
Glu Glu Glu Gly Val Gly Gly His His His His His His His His  
435 440 445

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 404 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 5:

Met	Asp	Pro	Asn	Thr	Val	Ser	Ser	Phe	Gln	Val	Asp	Cys	Phe	Leu	Trp
1				5					10					15	
His	Val	Arg	Lys	Arg	Val	Ala	Asp	Gln	Glu	Leu	Gly	Asp	Ala	Pro	Phe
			20					25					30		
Leu	Asp	Arg	Leu	Arg	Arg	Asp	Gln	Lys	Ser	Leu	Arg	Gly	Arg	Gly	Ser
		35					40					45			
Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Glu	Thr	Ala	Thr	Arg	Ala	Gly	Lys	Gln	Ile
	50					55					60				
Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	Met	Thr
65					70					75				80	
Met	Asp	Leu	Glu	Gln	Arg	Ser	Gln	His	Cys	Lys	Pro	Glu	Glu	Gly	Leu
				85					90					95	
Glu	Ala	Arg	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Gln	Ala	Pro	Ala
			100				105						110		
Thr	Glu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Val	Glu	Val
		115					120					125			
Thr	Leu	Gly	Glu	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	Ser	Pro	Asp	Pro	Pro	Gln	Ser
	130					135					140				
Pro	Gln	Gly	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Thr	Thr	Met	Asn	Tyr	Pro	Leu	Trp
145					150					155				160	
Ser	Gln	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Gln	Glu	Glu	Glu	Gly	Pro	Ser
				165					170					175	
Thr	Phe	Pro	Asp	Leu	Glu	Ser	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Arg	Lys
			180					185					190		
Val	Ala	Glu	Leu	Val	His	Phe	Leu	Leu	Leu	Lys	Tyr	Arg	Ala	Arg	Glu
		195					200					205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ala	Glu	Met	Leu	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Asn	Trp	Gln
	210					215					220				
Tyr	Phe	Phe	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	Lys	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu
225					230					235				240	
Val	Phe	Gly	Ile	Glu	Leu	Met	Glu	Val	Asp	Pro	Ile	Gly	His	Leu	Tyr
				245					250					255	

Ile	Phe	Ala	Thr	Cys	Leu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Gly	Asp
			260					265					270		
Asn	Gln	Ile	Met	Pro	Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile
		275					280					285			
Ile	Ala	Arg	Glu	Gly	Asp	Cys	Ala	Pro	Glu	Glu	Lys	Ile	Trp	Glu	Glu
	290					295					300				
Leu	Ser	Val	Leu	Glu	Val	Phe	Glu	Gly	Arg	Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Gly
305				310						315					320
Asp	Pro	Lys	Lys	Leu	Leu	Thr	Gln	His	Phe	Val	Gln	Glu	Asn	Tyr	Leu
				325					330					335	
Glu	Tyr	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Ser	Asp	Pro	Ala	Cys	Tyr	Glu	Phe	Leu
			340					345					350		
Trp	Gly	Pro	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Thr	Ser	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	His
		355					360					365			
His	Met	Val	Lys	Ile	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Ile	Ser	Tyr	Pro	Pro	Leu
	370					375					380				
His	Glu	Trp	Val	Leu	Arg	Glu	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	His	His	His	His
<b>385</b>					<b>390</b>				<b>395</b>					<b>400</b>	
<b>His</b>	<b>His</b>	<b>His</b>													

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 1212 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 6:

ATGGATCCAA	ACACTGTGTC	AAGCTTTCAG	GTAGATTGCT	TTCTTTGGCA	TGTCCGCAAA	60
CGAGTTGCAG	ACCAAGAACT	AGGTGATGCC	CCATTCCTTG	ATCGGCTTCG	CCGAGATCAG	120
AAATCCCTAA	GAGGAAGGGG	CAGCACTCTT	GGTCTGGACA	TCGAGACAGC	CACACGTGCT	180
GGAAAGCAGA	TAGTGGAGCG	GATTCTGAAA	GAAGAATCCG	ATGAGGCACT	TAAAATGACC	240
ATGGATCTGG	AACAGCGTAG	TCAGCACTGC	AAGCCTGAAG	AAGGCCTTGA	GGCCCGAGGA	300
GAGGCCCTGG	GCCTGGTGGG	TGCGCAGGCT	CCTGCTACTG	AGGAGCAGGA	GGCTGCCTCC	360
TCCTCTTCTA	CTCTAGTTGA	AGTCACCCTG	GGGGAGGTGC	CTGCTGCCGA	GTCACCAGAT	420
CCTCCCCAGA	GTCCTCAGGG	AGCCTCCAGC	CTCCCCACTA	CCATGAACTA	CCCTCTCTGG	480
AGCCAATCCT	ATGAGGACTC	CAGCAACCAA	GAAGAGGAGG	GGCCAAGCAC	CTTCCCTGAC	540
CTGGAGTCCG	AGTTCCAAGC	AGCACTCAGT	AGGAAGGTGG	CCGAATTGGT	TCATTTTCTG	600
CTCCTCAAGT	ATCGAGCCAG	GGAGCCGGTC	ACAAAGGCAG	AAATGCTGGG	GAGTGTCTGC	660
GGAAATTGGC	AGTATTTCTT	TCCTGTGATC	TTCAGCAAAG	CTTCCAGTTC	CTTGCAGCTG	720
GTCTTTGGCA	TCGAGCTGAT	GGAAGTGGAC	CCCATCGGCC	ACTTGTACAT	CTTTGCCACC	780
TGCCTGGGCC	TCTCCTACGA	TGGCCTGCTG	GGTGACAATC	AGATCATGCC	CAAGGCAGGC	840
CTCCTGATAA	TCGTCCTGGC	CATAATCGCA	AGAGAGGGCG	ACTGTGCCCC	TGAGGAGAAA	900
ATCTGGGAGG	AGCTGAGTGT	GTTAGAGGTG	TTTGAGGGGA	GGGAAGACAG	TATCTTGGGG	960
GATCCCAAGA	AGCTGCTCAC	CCAACATTTT	GTGCAGGAAA	ACTACCTGGA	GTACCGGCAG	1020
GTCCCCGGCA	GTGATCCTGC	ATGTTATGAA	TTCTGTGGG	GTCCAAGGGC	CCTCGTTGAA	1080
ACCAGCTATG	TGAAAGTCCT	GCACCATATG	GTAAAGATCA	GTGGAGGACC	TCACATTTCC	1140
TACCCACCCC	TGCATGAGTG	GGTTTTGAGA	GAGGGGGAAG	AGGGCGGTCA	TCACCATCAC	1200
CATCACCATT	AA					1212

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 7

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 445 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 7:

Met Lys Gly Gly Ile Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys  
1 5 10 15  
Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr  
20 25 30  
Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp  
35 40 45  
Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp  
50 55 60  
Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val  
65 70 75 80  
Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met  
85 90 95  
Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr  
100 105 110  
  
Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Leu Asp Met Gly  
115 120 125  
Ser Leu Glu Gln Arg Ser Leu His Cys Lys Pro Glu Glu Ala Leu Glu  
130 135 140  
Ala Gln Gln Glu Ala Leu Gly Leu Val Cys Val Gln Ala Ala Thr Ser  
145 150 155 160  
Ser Ser Ser Pro Leu Val Leu Gly Thr Leu Glu Glu Val Pro Thr Ala  
165 170 175  
Gly Ser Thr Asp Pro Pro Gln Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ala Phe Pro  
180 185 190  
Thr Thr Ile Asn Phe Thr Arg Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gly Ser Ser  
195 200 205  
Ser Arg Glu Glu Glu Gly Pro Ser Thr Ser Cys Ile Leu Glu Ser Leu  
210 215 220  
Phe Arg Ala Val Ile Thr Lys Lys Val Ala Asp Leu Val Gly Phe Leu  
225 230 235 240  
Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu  
245 250 255  
Glu Ser Val Ile Lys Asn Tyr Lys His Cys Phe Pro Glu Ile Phe Gly  
260 265 270  
Lys Ala Ser Glu Ser Leu Gln Leu Val Phe Gly Ile Asp Val Lys Glu  
275 280 285  
Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr Val Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu  
290 295 300  
Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp Asn Gln Ile Met Pro Lys Thr Gly  
305 310 315 320  
Phe Leu Ile Ile Val Leu Val Met Ile Ala Met Glu Gly Gly His Ala  
325 330 335  
Pro Glu Glu Glu Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Met Glu Val Tyr Asp  
340 345 350  
Gly Arg Glu His Ser Ala Tyr Gly Glu Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln  
355 360 365  
Asp Leu Val Gln Glu Lys Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Asp Ser  
370 375 380  
Asp Pro Ala Arg Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Ala Glu  
385 390 395 400  
Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val Ser Ala Arg  
405 410 415  
Val Arg Phe Phe Phe Pro Ser Leu Arg Glu Ala Ala Leu Arg Glu Glu  
420 425 430  
Glu Glu Gly Val Gly Gly His His His His His His  
435 440 445

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 8

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 1338 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 8:

ATGAAAGGGG	GAATTGTACA	TTCAGACGGC	TCTTATCCAA	AAGACAAGTT	TGAGAAAATC	60
AATGGCACTT	GGTACTACTT	TGACAGTTCA	GGCTATATGC	TTGCAGACCG	CTGGAGGAAG	120
CACACAGACG	GCAACTGGTA	CTGGTTCGAC	AACTCAGGCG	AAATGGCTAC	AGGCTGGAAG	180
AAAATCGCTG	ATAAGTGGTA	CTATTTCAAC	GAAGAAGGTG	CCATGAAGAC	AGGCTGGGTC	240
AAGTACAAGG	ACACTTGGTA	CTACTTAGAC	GCTAAAGAAG	GCGCCATGGT	ATCAAATGCC	300
TTTATCCAGT	CAGCGGACGG	AACAGGCTGG	TACTACCTCA	AACCAGACGG	AACACTGGCA	360
GACAGGCCAG	AATTGGACAT	GGGCTCTCTG	GAACAGCGTA	GTCTGCACTG	CAAGCCTGAG	420
GAAGCCCTTG	AGGCCCAACA	AGAGGCCCTG	GGCCTGGTGT	GTGTGCAGGC	TGCCACCTCC	480
TCCTCCTCTC	CTCTGGTCTT	GGGCACCCTG	GAGGAGGTGC	CCACTGCTGG	GTCAACAGAT	540
CCTCCCCAGA	GTCCTCAGGG	AGCCTCCGCC	TTTCCCCTA	CCATCAACTT	CACTCGACAG	600
AGGCAACCCA	GTGAGGGTTC	CAGCAGCCGT	GAAGAGGAGG	GGCCAAGCAC	CTCTTGTATC	660
CTGGAGTCCT	TGTTCCGAGC	AGTAATCACT	AAGAAGGTGG	CTGATTTGGT	TGGTTTTCTG	720
CTCCTCAAAT	ATCGAGCCAG	GGAGCCAGTC	ACAAAGGCAG	AAATGCTGGA	GAGTGTTCATC	780
AAAAATTACA	AGCACTGTTT	TCCTGAGATC	TTCGGCAAAG	CCTCTGAGTC	CTTGCAGCTG	840
GTCTTTGGCA	TTGACGTGAA	GGAAGCAGAC	CCCACCGGCC	ACTCCTATGT	CCTTGTCCACC	900
TGCCTAGGTC	TCTCCTATGA	TGGCCTGCTG	GGTGATAATC	AGATCATGCC	CAAGACAGGC	960
TTCCTGATAA	TTGTCCTGGT	CATGATTGCA	ATGGAGGGCG	GCCATGCTCC	TGAGGAGGAA	1020
ATCTGGGAGG	AGCTGAGTGT	GATGGAGGTG	TATGATGGGA	GGGAGCACAG	TGCCTATGGG	1080
GAGCCCAGGA	AGCTGCTCAC	CCAAGATTTG	GTGCAGGAAA	AGTACCTGGA	GTACCGGCAG	1140
GTGCCGGACA	GTGATCCCGC	ACGCTATGAG	TTCTTGTGGG	GTCCAAGGGC	CCTCGCTGAA	1200
ACCAGCTATG	TGAAAGTCCT	TGAGTATGTG	ATCAAGGTCA	GTGCAAGAGT	TCGCTTTTTT	1260
TTCCCATCCC	TGCGTGAAGC	AGCTTTGAGA	GAGGAGGAAG	AGGGAGTCGG	CGGTCATCAC	1320
CATCACCATC	ACCATTAA					1338

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 9

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 454 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 9:

Met Lys Gly Gly Ile Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys  
1 5 10 15  
Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr  
20 25 30  
Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp  
35 40 45  
Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp  
50 55 60  
Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val  
65 70 75 80  
Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met  
85 90 95  
Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr  
100 105 110  
Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Leu Ala Ser Met  
115 120 125  
Leu Asp Met Asp Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu  
130 135 140  
Gly Leu Glu Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala  
145 150 155 160  
Pro Ala Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Val  
165 170 175  
Glu Val Thr Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Asp Pro Pro  
180 185 190  
Gln Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro  
195 200 205  
Leu Trp Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Asn Gln Glu Glu Glu Gly  
210 215 220  
Pro Ser Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Leu Ser  
225 230 235 240  
Arg Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala  
245 250 255  
Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Gly Asn  
260 265 270  
Trp Gln Tyr Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu  
275 280 285  
Gln Leu Val Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His  
290 295 300  
Leu Tyr Ile Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu  
305 310 315 320  
Gly Asp Asn Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu  
325 330 335  
Ala Ile Ile Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp  
340 345 350  
Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile  
355 360 365  
Leu Gly Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn  
370 375 380  
Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu  
385 390 395 400  
Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val  
405 410 415  
Leu His His Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro  
420 425 430  
Pro Leu His Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu Gly Gly His His  
435 440 445  
His His His His His  
450

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 10

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 1362 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 10:

```
ATGAAAGGGG GAATTGTACA TTCAGACGGC TCTTATCCAA AAGACAAGTT TGAGAAAATC      60
AATGGCACTT GGTACTACTT TGACAGTTCA GGCTATATGC TTGCAGACCG CTGGAGGAAG      120
CACACAGACG GCAACTGGTA CTGGTTCGAC AACTCAGGCG AAATGGCTAC AGGCTGGAAG      180
AAAATCGCTG ATAAGTGGTA CTATTTCAAC GAAGAAGGTG CCATGAAGAC AGGCTGGGTC      240
AAGTACAAGG AACTTTGGTA CTACTTAGAC GCTAAAGAAG GCGCCATGGT ATCAAATGCC      300
TTTATCCAGT CAGCGGACGG AACAGGCTGG TACTACCTCA AACCAGACGG AACACTGGCA      360
GACAGGCCAG AATTGGCCAG CATGCTGGAC ATGGATCTGG AACAGCGTAG TCAGCACTGC      420
AAGCCTGAAG AAGGCCTTGA GGCCCGAGGA GAGGCCCTGG GCCTGGTGGG TCGCGAGGCT      480
CCTGCTACTG AGGAGCAGGA GGCTGCCTCC TCCTCTTCTA CTCTAGTTGA AGTCACCCTG      540
GGGGAGGTGC CTGCTGCCGA GTCACCAGAT CCTCCCCAGA GTCCTCAGGG AGCCTCCAGC      600
CTCCCCACTA CCATGAACTA CCCTCTCTGG AGCCAATCCT ATGAGGACTC CAGCAACCAA      660
GAAGAGGAGG GGCCAAGCAC CTTCCCTGAC CTGGAGTCTG AGTTCCAAGC AGCACTCAGT      720
AGGAAGGTGG CCAAGTTGGT TCATTTTCTG CTCCTCAAGT ATCGAGCCAG GGAGCCGGTC      780
ACAAAGGCAG AAATGCTGGG GAGTGTGCTC GGAAATTGGC AGTACTTCTT TCCTGTGATC      840
TTCAGCAAAG CTTCCGATTC CTTGCAGCTG GTCTTTGGCA TCGAGCTGAT GGAAGTGGAC      900
CCCATCGGCC ACGTGTACAT CTTTGCCACC TGCCTGGGCC TCTCCTACGA TGGCCTGCTG      960
GGTGACAATC AGATCATGCC CAAGACAGG CTTCTGATAA TCATCCTGGC CATAATCGCA     1020
AAAGAGGGCG ACTGTGCCCC TGAGGAGAAA ATCTGGGAGG AGCTGAGTGT GTTAGAGGTG     1080
TTTGAGGGGA GGAAGACAG TATCTTCGGG GATCCCAAGA AGCTGCTCAC CCAATATTTT     1140
GTGCAGGAAA ACTACCTGGA GTACCGGCAG GTCCCCGGCA GTGATCCTGC ATGCTATGAG     1200
TTCTGTGGG GTCCAAGGGC CCTCATTGAA ACCAGCTATG TGAAAGTCTT GCACCATATG     1260
GTAAAGATCA GTGGAGGACC TCGCATTTC TACCCACTCC TGCATGAGTG GGCTTTGAGA     1320
GAGGGGGAAG AGGGCGGTCA TCACCATCAC CATCACCATT AA                          1362
```

Lisboa, 8 de Junho de 2011

## REIVINDICAÇÕES

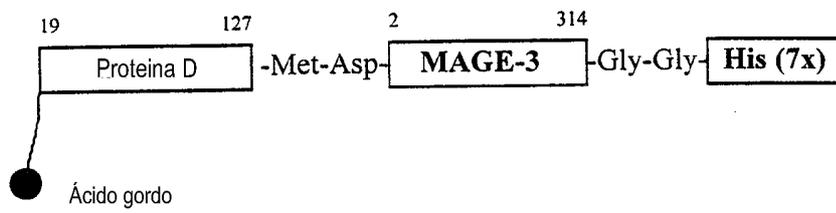
1. Proteína de fusão compreendendo um antigénio codificado pela família de genes MAGE ligado a um parceiro de fusão seleccionado de:
  - (i) Proteína NS1 de *influenza* ou um seu fragmento compreendendo os 81 aminoácidos de terminal-N da proteína NS1; ou
  - (ii) LytA de *Streptococcus pneumoniae* ou seu fragmento compreendendo: (a) a porção de terminal-C de Lyt-A; (b) a porção repetida da molécula LytA encontrada na extremidade de terminal-C começando no resíduo 178; e/ou (c) resíduos de aminoácidos 188-305 de LytA
  - (iii) proteína D de *Haemophilus influenzae* B ou um seu fragmento compreendendo
    - (a) aproximadamente o primeiro 1/3 de proteína D;
    - (b) os primeiros 109 aminoácidos de lipoproteína D; ou
    - (c) o terminal-N de 100 a 110 aminoácidos de proteína D.
2. Proteína de fusão como reivindicada na reivindicação 1, que compreende ainda um marcador de afinidade.
3. Proteína de fusão como reivindicada na reivindicação 1 ou 2, em que a proteína D está na forma lipídada de proteína D.

4. Proteína de fusão como reivindicada em qualquer reivindicação anterior, em que o antigénio é codificado por um gene MAGE seleccionado do grupo MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A6, MAGE A7, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12, MAGE B1, MAGE B2, MAGE B3 e MAGE B4, MAGE C1 e MAGE C2.
5. Sequência de ácidos nucleicos codificando uma proteína de fusão como reivindicada em qualquer reivindicação anterior.
6. Vector compreendendo um ácido nucleico da reivindicação 5.
7. Célula hospedeira transformada com um vector da reivindicação 6.
8. Vacina contendo uma proteína como reivindicada em qualquer das reivindicações 1 a 4, ou um ácido nucleico como reivindicado na reivindicação 5.
9. Vacina como reivindicada na reivindicação 8 compreendendo, adicionalmente, um adjuvante e/ou citocina ou quimocina imunoestimuladora.
10. Vacina como reivindicada na reivindicação 8 ou 9, em que a proteína é apresentada num veículo de emulsão de óleo em água ou de água em óleo.
11. Vacina como reivindicada na reivindicação 9 ou 10, em que o adjuvante compreende 3D-MPL, QS21 ou um oligonucleótido CpG.

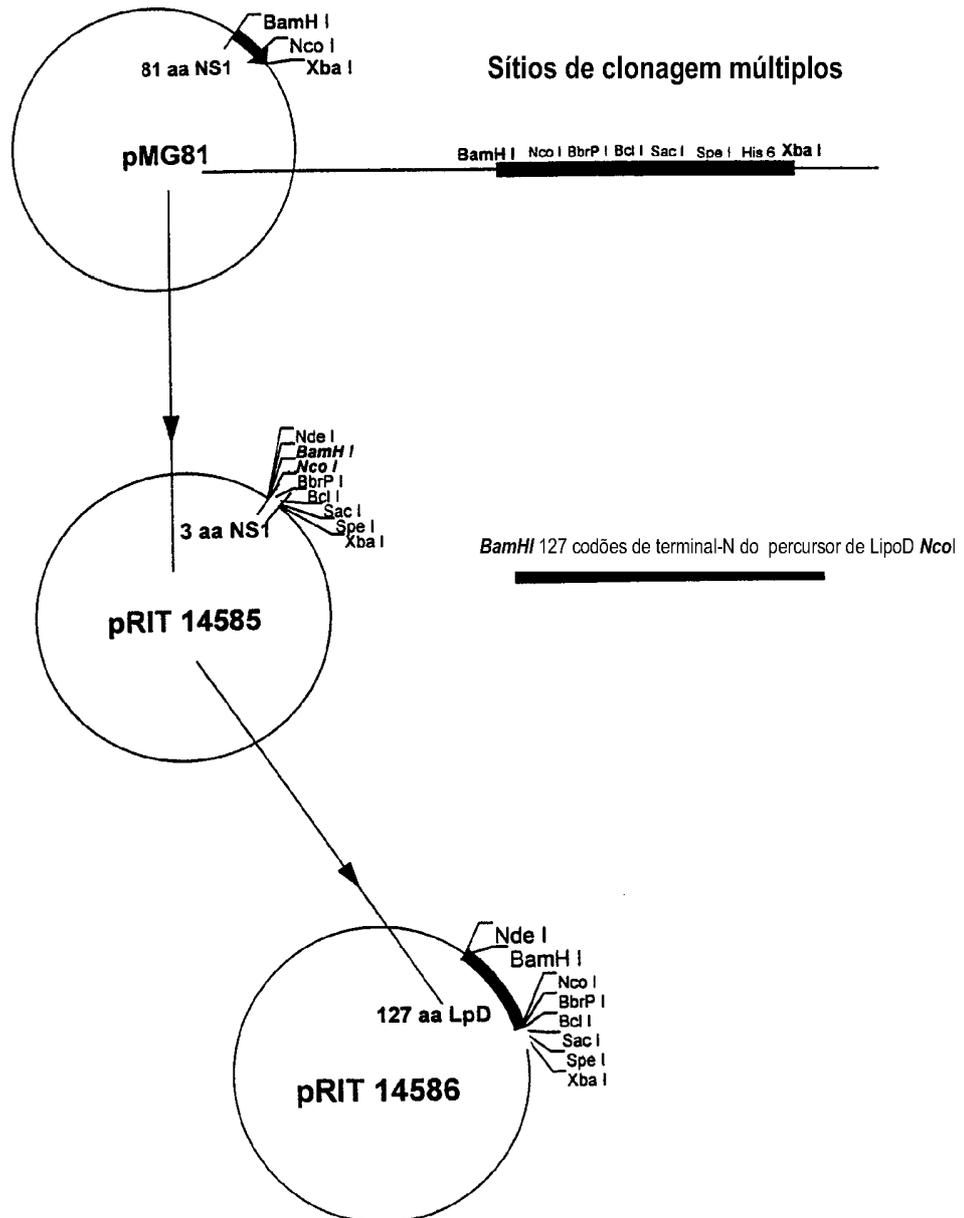
12. Vacina como reivindicada em qualquer das reivindicações 8 a 11 compreendendo, adicionalmente, um ou mais outros antigénios.
13. Vacina como reivindicada em qualquer das reivindicações 8 a 12 para utilização em medicina.
14. Utilização de uma proteína de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, ou ácido nucleico de acordo com a reivindicação 5, para o fabrico de uma vacina para tratar imunoterapeuticamente um doente que sofre de melanomas ou outros tumores associados a MAGE, incluindo cancro da mama, bexiga, pulmão, NSCLC, cabeça e carcinoma de células escamosas, carcinoma do cólon e carcinoma do esófago.

Lisboa, 8 de Junho de 2011

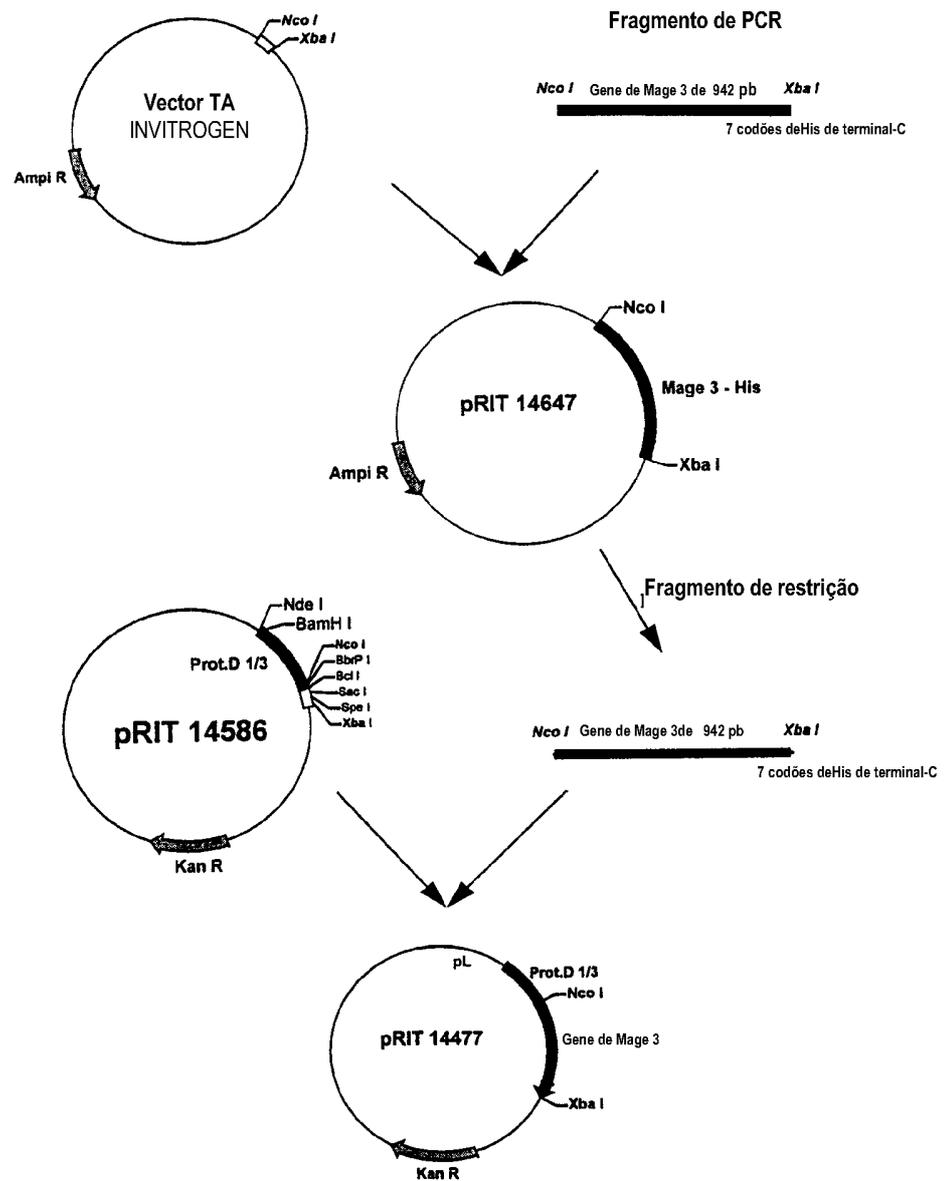
**FIGURA 1: LPD-MAGE-3-His**



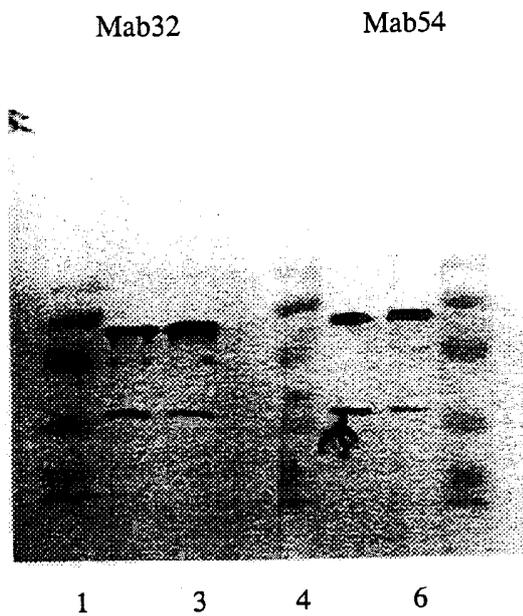
**FIGURA 2:** Construção do vector de expressão pRIT 14586



**FIGURA 3:** Construção de plasmídeo pRIT 14477 expressando a proteína de fusão Prot. D 1/3-MAGE-3-cauda His



**FIGURA 4:** Análise de transferência Western de proteína LPD-MAGE-3-His anticorpos monoclonais Mab 32 e Mab 54 de anti-MAGE-3



1, 4 e 7: peso molecular

2: lote 96K19 revelado com Mab 32

3: lote 96J22 revelado com Mab 32

4: lote 96K19 revelado com Mab 54

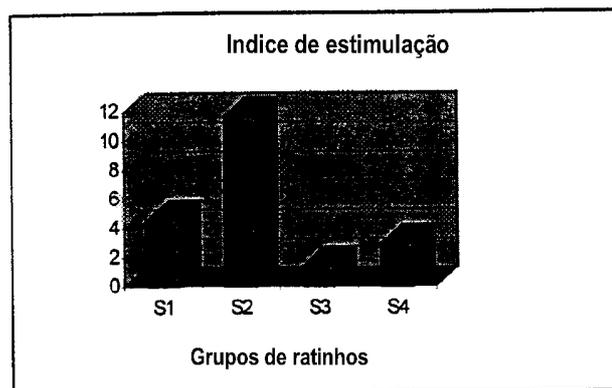
5: lote 96J22 revelado com Mab 54

**FIGURA 5:****IMUNOGENICIDADE DE MAGE-3 EM RATINHOS (C57BL6) ;**

Linfoproliferação em células de baço.

72 h de estimulação com His Mage 3 0,1 µg/mL em mesferas

Grupos de ratinho	Linha de base de incorporação de 3H timidina (CPM) : 0,1 µg/mL em mesferas
S1 LipoD Mage 3 His não formulado	12284
S2 LipoD Mage His + SBAS2	679
S3 SBAS2	805
S4 meio	1242

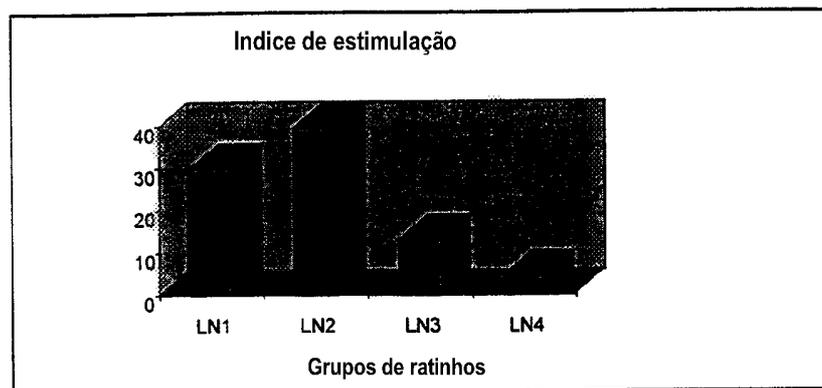


**FIGURA 6:**

Imunogenicidade de MAGE-3 em ratinhos (C57BL6);

Linfoproliferação em células de nódulos linfáticos.  
72 horas de estimulação com His Mage 3 1 µg/mL em pesferas

Grupos de ratinho	Linha de base de incorporação de 3H timidina (CPM) : 1 µg/mL em pesferas
LN1 LipoD Mage 3 His não formulado	47
LN2 LipoD Mage His + SBAS2	1025
LN3 SBAS2	251
LN4 meio	110



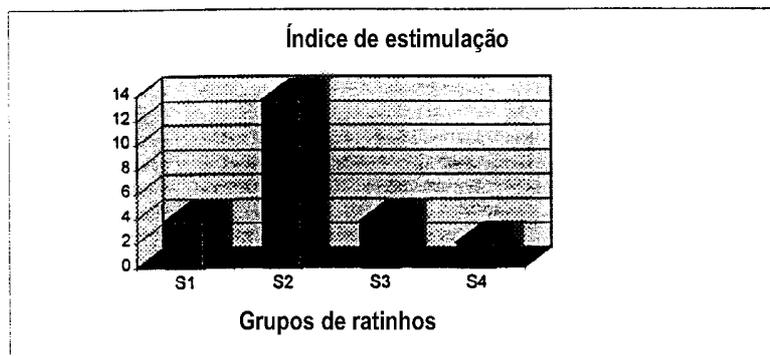
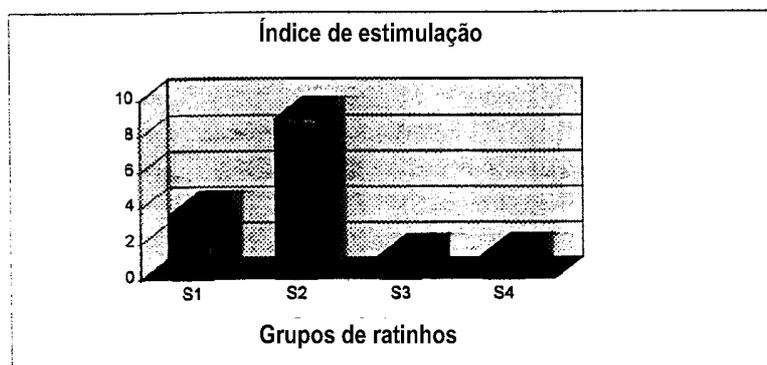
**FIGURA 7:**

IMUNOGENECIDADE DE MAGE-3 EM RATINHOS (BalbC);
--

Linfoproliferação em células de baço

72 h de estimulação      0,1 µg/mL His Mage 3 (A)  
 His Mage 3 como revestimento  
 de vesferas (B)

Grupos de ratinho	Incorporação de 3H timidina: cpm	
	nenhum	1µ/mL vesferas
S1 LipoD Mage 3 His não formulado	1002	1329
S2 LipoD Mage 3 His + SBAS2	1738	4997
S3 SBAS2	1685	3393
S4 meio	1535	1129

**A****B**

**FIGURA 8:**

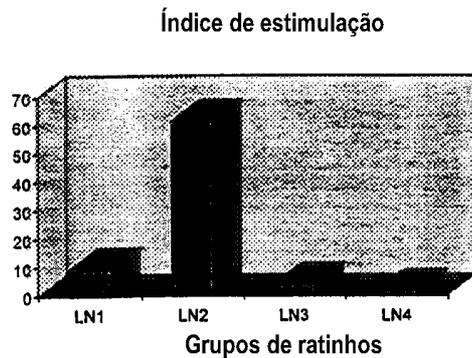
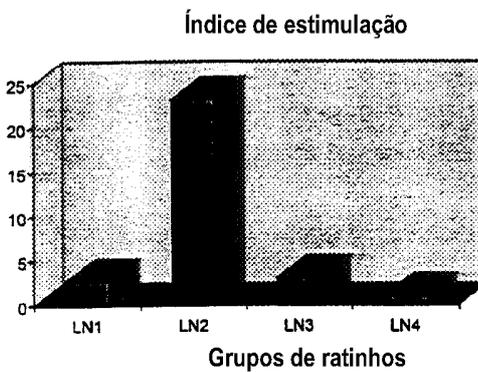
Imunogenicidade de MAGE-3 em ratinhos (BalbC);

Linfoproliferação em células de nódulos linfáticos popliteais.

72 h de estimulação 1  $\mu\text{g/mL}$  His Mage 3 (A)

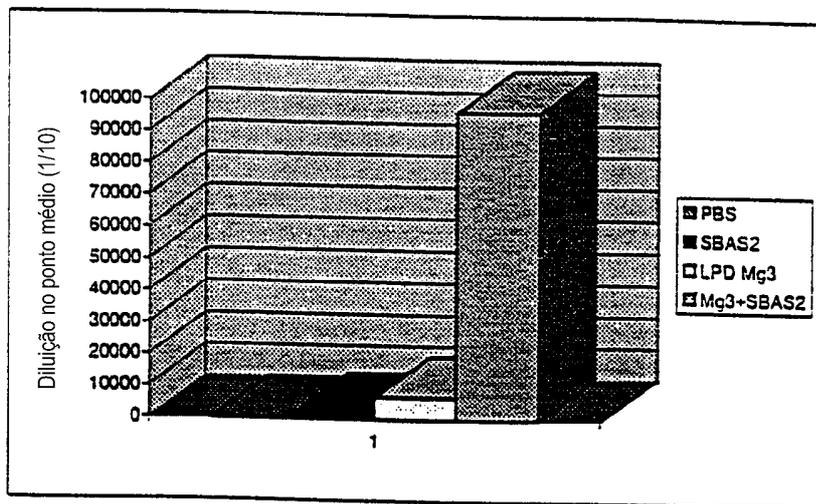
His Mage 3 como revestimento  
de vesferas (B)

Grupos de ratinho	Incorporação de 3H timidina: cpm	
	nenhum	1 $\mu\text{mL}$ vesferas
LN1 LipoD Mage 3 His não formulado	309	386
LN2 LipoD Mage 3 His + SBAS2	438	410
LN3 SBAS2	522	637
LN4 meio	318	399

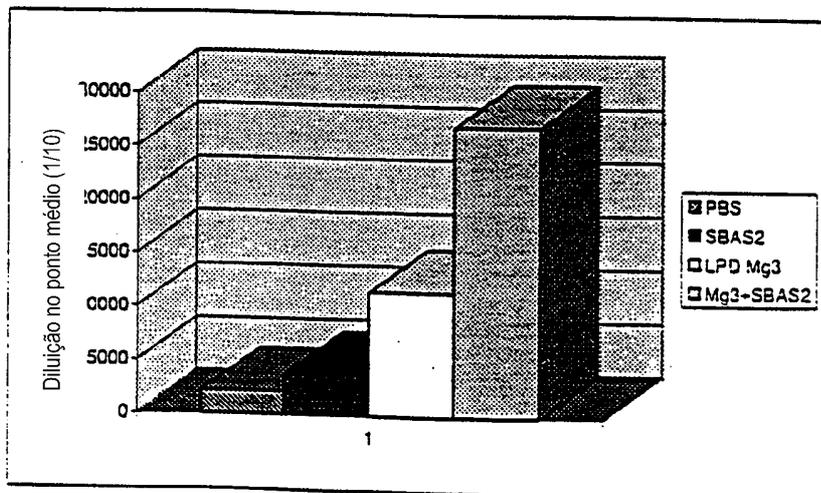
**A****B**

Anticorpos anti-MAGE3 no soro de ratinhos imunizados com LipD MAGE-3 His em SBAS2 ou não

Ratinhos BALB C

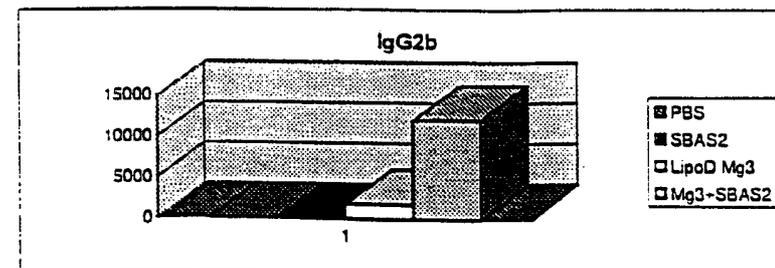
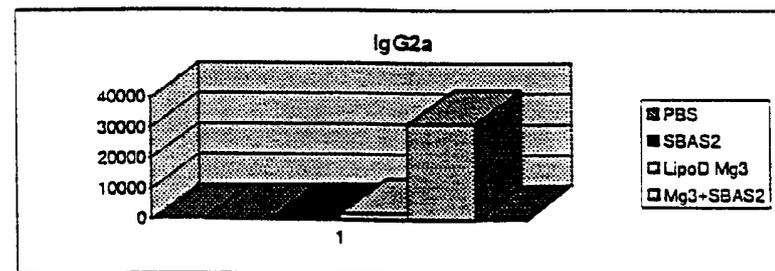
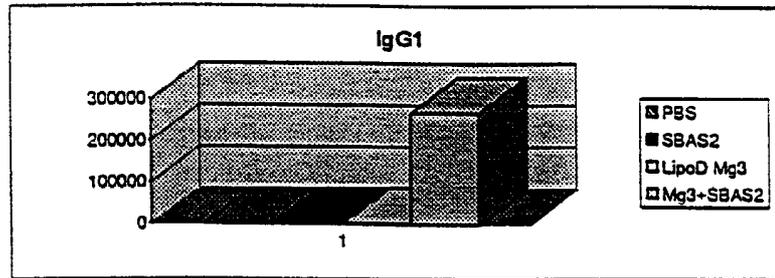
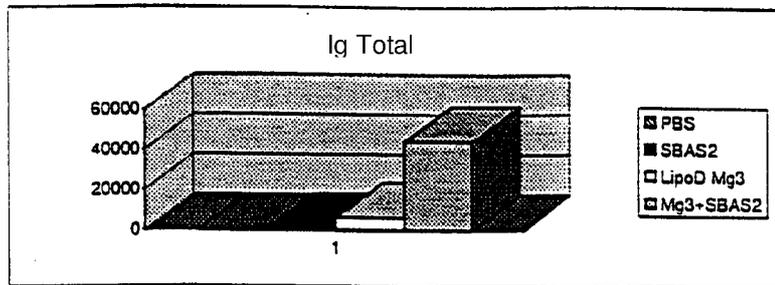


Ratinhos C57BL/6



Respostas de anticorpo específicas de subclasse em ratinhos Balb/c

	Tot. IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgA	IgM
PBS	0	0	0	0	0	0
SBAS2	733	719	378	11	0	0
LPD Mg3 His	6182	2049	2058	1835	0	0
LPD Mg3 H/SBAS2	44321	267884	31325	12160	0	0



Respostas de anticorpo específicas de subclasse em ratinhos C57BL/6

	Total IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgA	IgM
PBS	807	405	718	22,8	2,8	33,8
SBAS2	37	137	0	0	0	19
LPD Mg3His	5471	1343	332	4540	135	5
LPD Mg3H/SBAS2	11489	2477	2070	8118	55	46

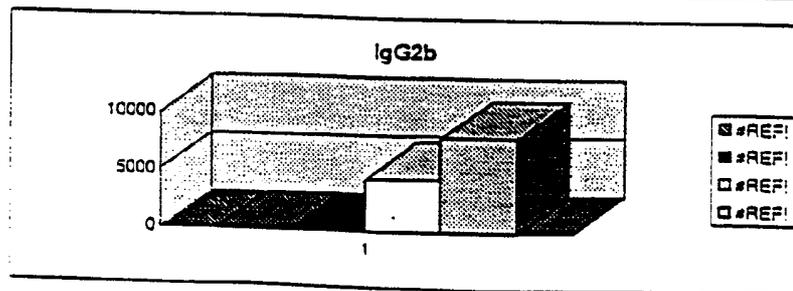
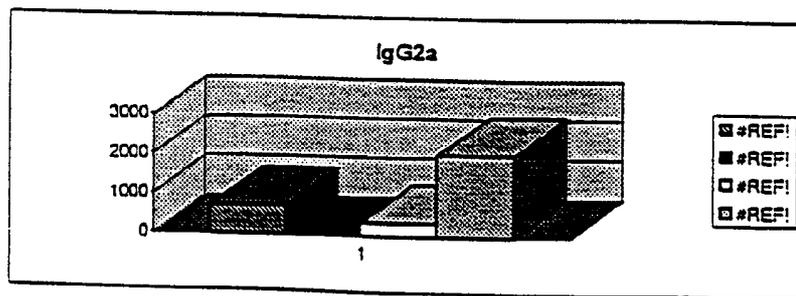
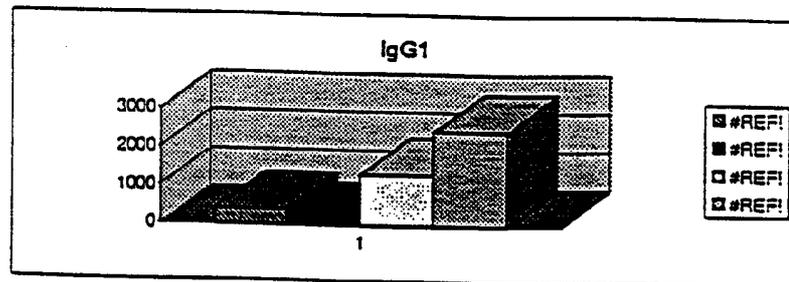
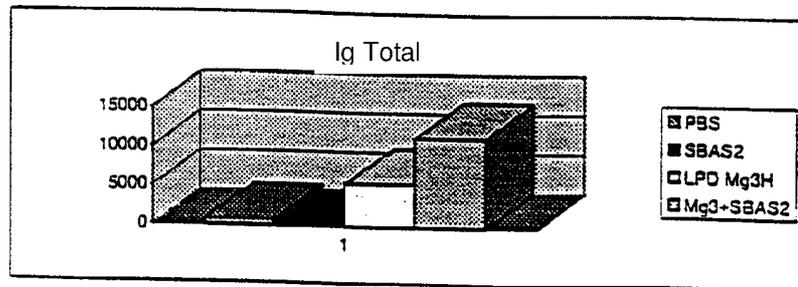
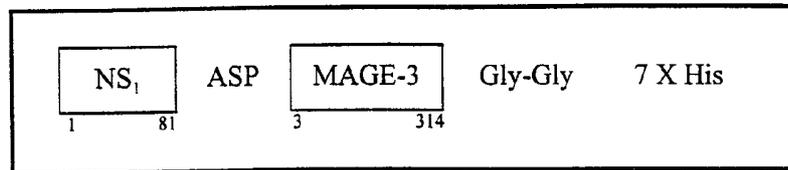


FIGURA 12



**FIGURA 13:** Construção de plasmídeo pRIT14426

Vector pTZ18R + cDNA Mage 3

(do Ludwig Institut – Th BOON)

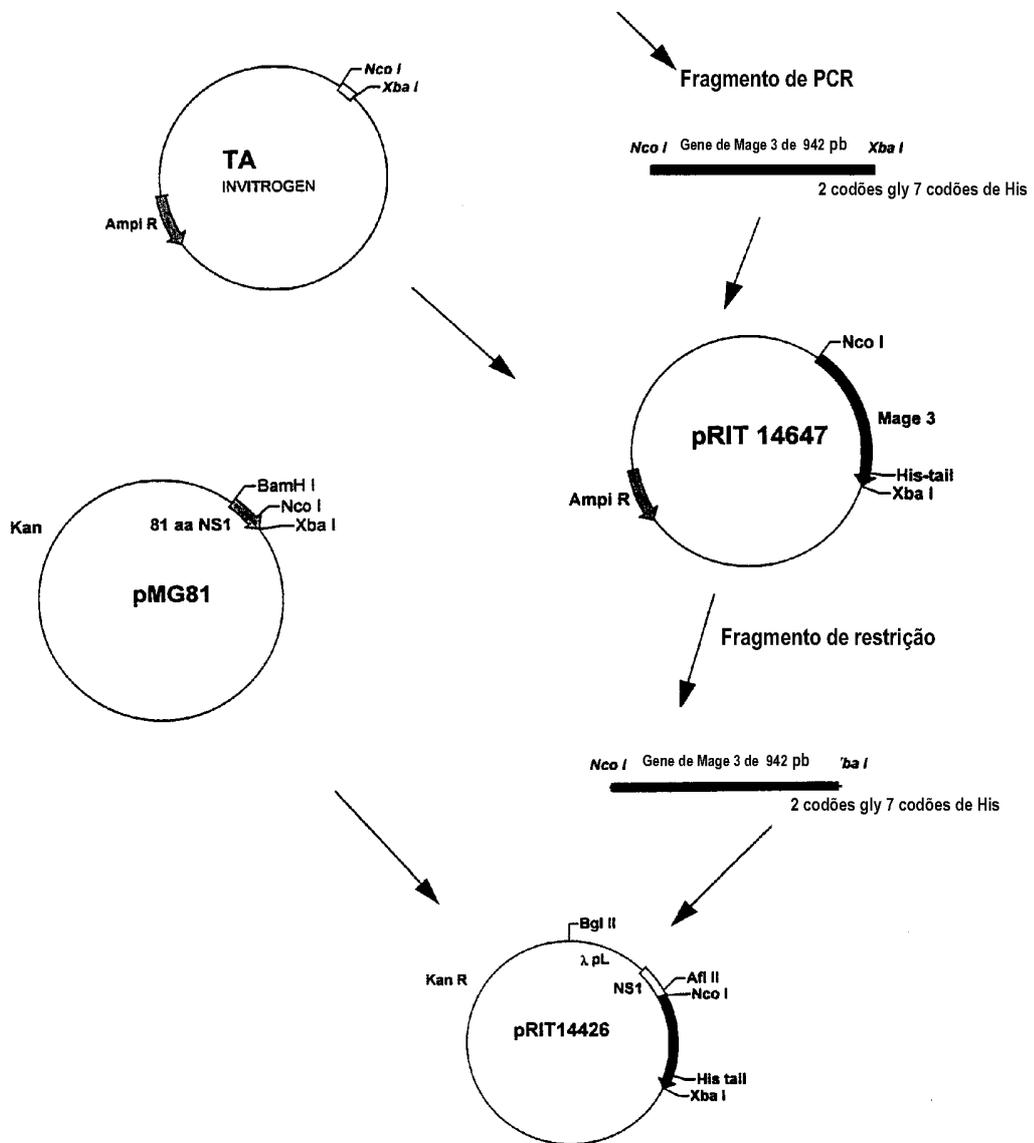
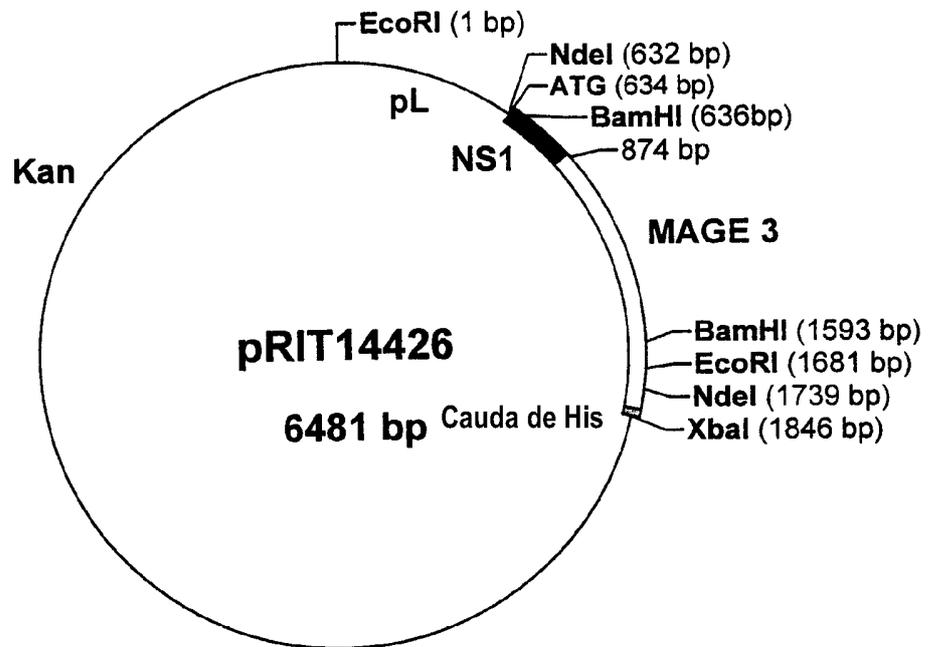
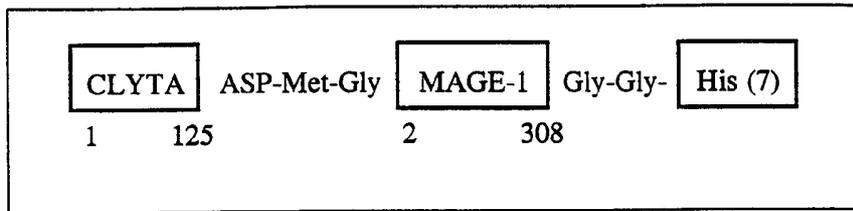


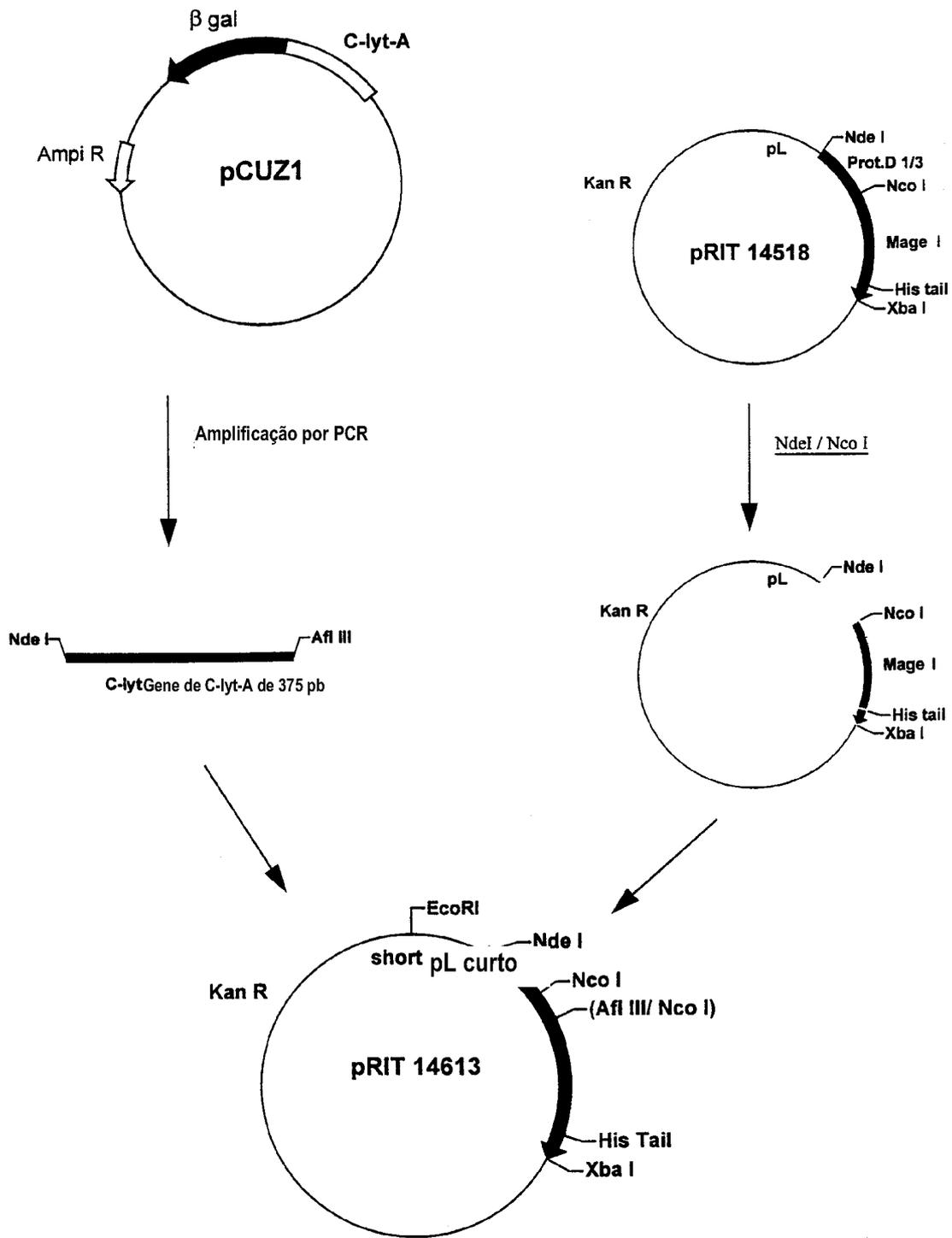
FIGURA 14

Mapa do plasmideo de pRIT14426





**FIGURA 16:** Construção de plasmídeo pRIT 14613



**FIGURA 17:** Construção de plasmídeo pRIT14614

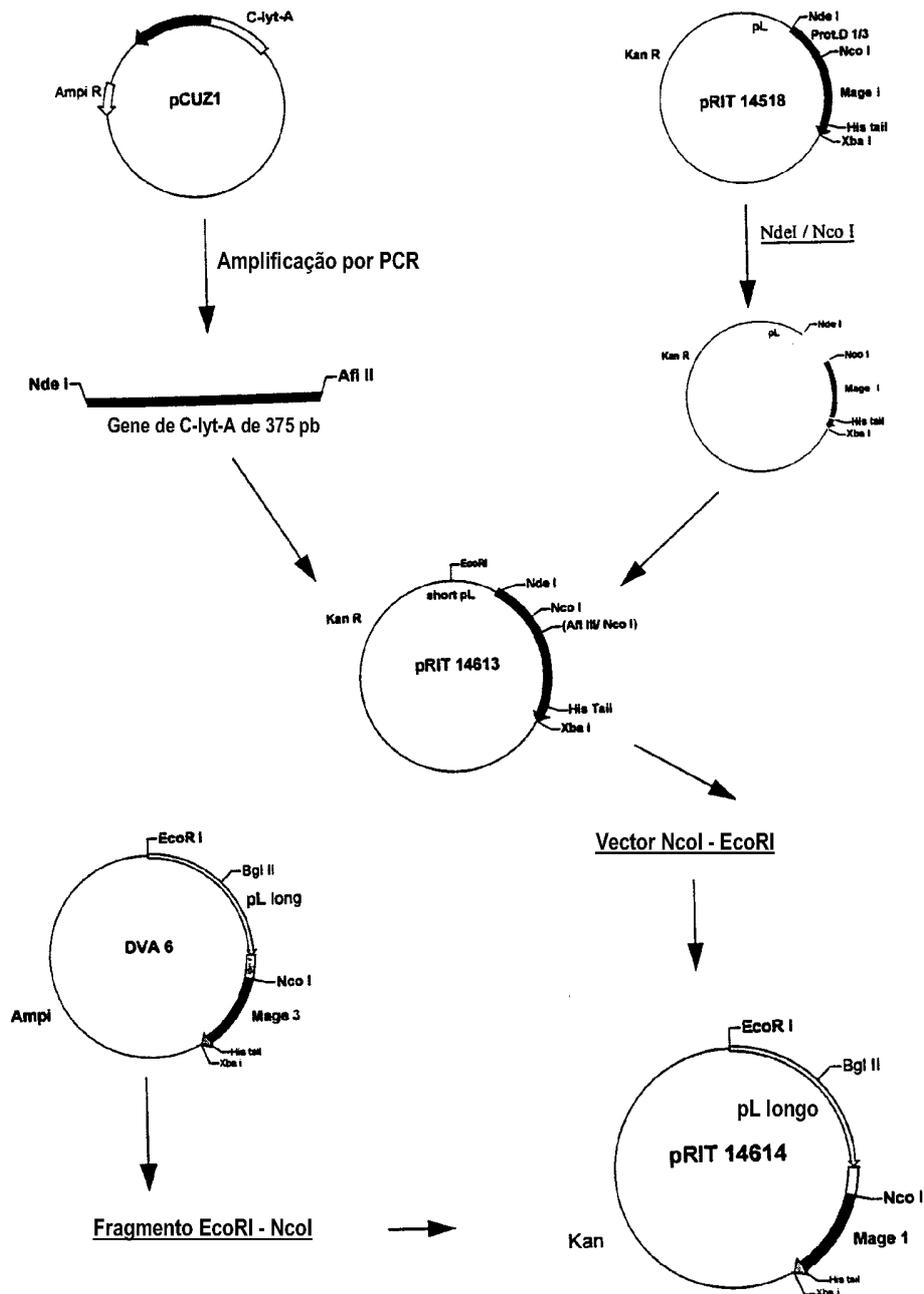
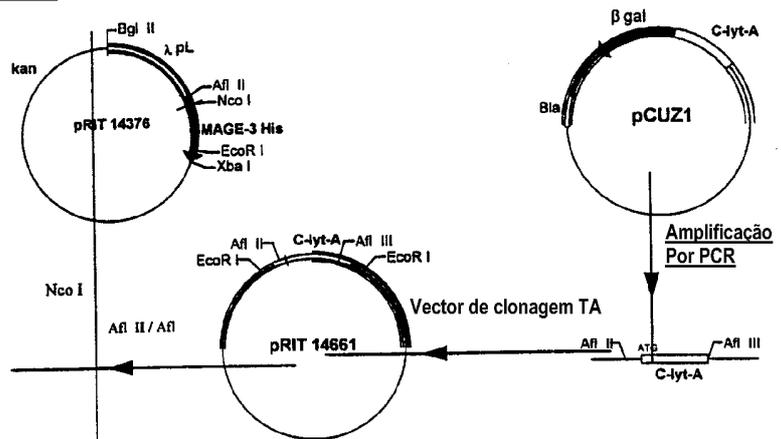


Figura-18

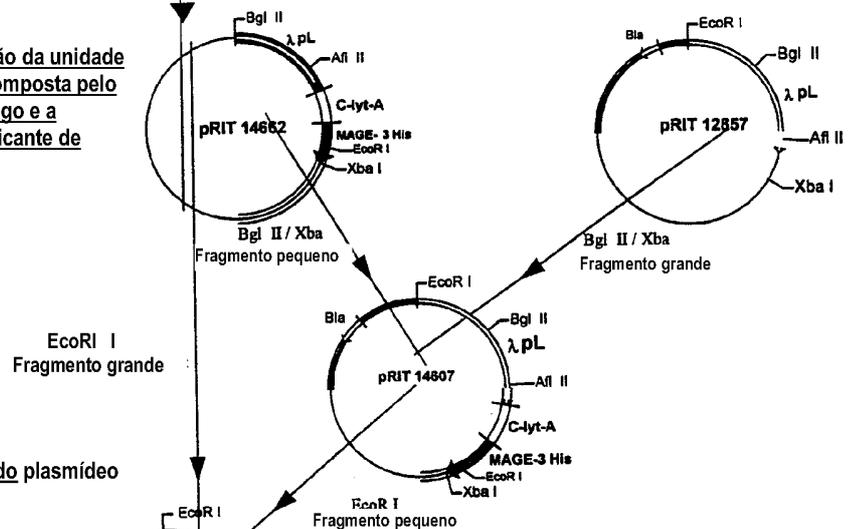
CLYTA Ala-Ser-Met-Leu-Asp MAGE-3 Gly-Gly- HIS (7)

FIGURA 19: Construção de plasmídeo pRIT 14646

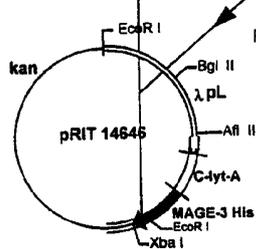
**I. Preparação do módulo de sequência codificante de CLYTA-Mage-3 His**



**II. Reconstituição da unidade de expressão composta pelo promotor pL longo e a sequência codificante de CLYTA-Mage-3**



**III. Preparação do plasmídeo pRIT14646**



## RESUMO

**"DERIVADOS DE ANTIGÉNIOS ASSOCIADOS A TUMORES DA FAMÍLIA MAGE,  
UTILIZADOS PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO COM EPÍTOPOS  
AUXILIARES T E DE COMPOSIÇÕES PARA VACINAÇÃO"**

A presente invenção refere-se a novas proteínas e à sua produção a partir da família MAGE. Em particular, a uma proteína MAGE fundida a um parceiro de fusão imunológico, tal como Lipoproteína D. Esses antigénios podem ser formulados para proporcionar vacinas para o tratamento de uma gama de tumores. Também se proporcionam novos métodos para purificar proteínas MAGE.