

(11) Número de Publicação: **PT 2300609 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/11 (2013.01) **C07K 14/255** (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2009.06.23**

(30) Prioridade(s): **2008.06.25 EP 08305327**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.03.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.11.20**
033/2014

(73) Titular(es):

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE
101 RUE DE TOLBIAC 75013 PARIS FR
INSTITUT PASTEUR DE LILLE FR**

(72) Inventor(es):

JEAN-CLAUDE SIRARD FR

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT**

(54) Epígrafe: **NOVOS COMPOSTOS IMUNOADJUVANTES À BASE DE FLAGELINA E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A NOVOS COMPOSTOS DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE FLAGELINA COM ORIGEM NA SALMONELLA ENTÉRICA QUE EXIBE UMA ACTIVIDADE ADJUVANTE IMUNITÁRIA IN VIVO.

RESUMO

"NOVOS COMPOSTOS IMUNOADJUVANTES À BASE DE FLAGELINA E SUAS UTILIZAÇÕES"

A presente invenção refere-se a novos compostos de péptidos derivados de flagelina com origem na *Salmonella entérica* que exhibe uma actividade adjuvante imunitária *in vivo*.

DESCRIÇÃO

"NOVOS COMPOSTOS IMUNOADJUVANTES À BASE DE FLAGELINA E SUAS UTILIZAÇÕES"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à indução e/ou estimulação da resposta imunitária num indivíduo ou num animal.

Refere-se, em particular, a novos compostos imunoadjuvantes, úteis para composições imunogénicas e vacinas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes permanece um objectivo principal da saúde pública global.

Em particular, vacinas denominadas "para mucosas" surgiram como uma alternativa potencial atractiva para vacinas injectáveis.

A administração a mucosas tem muitos atributos potencialmente desejáveis. Talvez a razão mais constrangedora para desenvolver técnicas de distribuição de vacinas para mucosas seja o desenvolvimento de uma primeira linha de defesa imunitária, gerando imunidade local no sítio de entrada na mucosa para muitos agentes patogénicos invasores.

Além disso, alguns investigadores relataram que existe um sistema imunitário da mucosa comum, no qual a imunidade da mucosa induzida num sítio pode conduzir à imunidade num sítio distal na mucosa (McGhee, J. R. *et al.*, The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992, 10:75-88).

Adicionalmente, a distribuição de um antigénio através de um sítio na mucosa possui o potencial para gerar também uma resposta imunitária sistémica.

Isto sugere que podem ser alcançados benefícios significativos através da distribuição de vacinas de um modo não invasivo, e. g., intranasalmente ou outra via da mucosa, para induzir imunidade contra uma vasta gama de agentes patogénicos que podem entrar em diferentes sítios da mucosa.

A maioria das vacinas actuais (vacinas para mucosas ou outras) são compostas por dois componentes principais: (i) o antigénio alvo de interesse terapêutico e (ii) composto(s) imunoadjuvante(s) que estimula(m) e/ou induz(em) imunogenicidade contra o referido antigénio.

A natureza dos imunoadjuvantes conhecidos varia grandemente, mas inclui, em particular, óleos minerais, extractos bacterianos, organismos vivos e atenuados e suspensões de metais de hidróxido de alumínio.

Mesmo se os adjuvantes proporcionarem um incremento das respostas imunitárias, a sua utilização pode também induzir efeitos colaterais adversos, nomeadamente em função da via de

administração utilizada. Portanto, os números de adjuvantes que são aprovados e eficazes em humanos permanecem relativamente limitados.

Avanços no campo de imunidade inata proporcionaram um melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que governam a regulação da resposta imunitária do hospedeiro.

Este melhor conhecimento do sistema imunitário permitiu a investigação e o desenvolvimento de novos imunoadjuvantes úteis potenciais.

Em particular, receptores de tipo Toll (TLR) são instrumentais na indução coordenada de imunidade inata e adaptativa em mamíferos. Uma vez que os TLR são expressos por uma vasta variedade de tipos de células, são capazes de despoletar imunidade em todo o corpo.

Após infecção por microrganismos patogénicos, os TLR reconhecem motivos conservados referidos como padrões moleculares associados a micróbios (MAMP). A participação dos TLR induz um programa de expressão genética dedicado à eliminação inata e à imunidade adquirida para microrganismos patogénicos. Por exemplo, os TLR induzem a produção de quimiocinas que, por sua vez, atraem especificamente os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) directamente envolvidos na eliminação microbiana inata. Além disso, os TLR promovem a secreção de mediadores imunitários pleiotrópicos (tal como $\text{TNF}\alpha$) e a maturação funcional de células dendríticas (DC) que se especializam na apresentação do antígeno aos linfócitos.

Consequentemente, os agonistas de TLR não estimulam apenas respostas imunitárias pró-inflamatórias “amplamente específicas”, mas também aumentam a resposta imunitária adaptativa a antígenos definidos, e são assim considerados como sendo imunoadjuvantes.

Apesar desses efeitos potencialmente benéficos, uma toxicidade sistémica de MAMP conduziu a esforços para desenvolver derivados que enviassem a actividade de MAMP em direcção à adjuvância. Na verdade, moléculas modificadas com propriedades únicas é um grande desafio na manipulação de respostas imunitárias.

Flagelinas bacterianas (os principais componentes dos flagelos em muitos agentes patogénicos bacterianos) são agonistas específicos, únicos para a activação de TLR5.

A flagelina FliC de *Salmonella* Serovar Typhimurium *enterica* (S. Typhimurium) é o paradigma para estudos sobre a estrutura-função do flagelo, imunidade e sinalização de TLR5.

É uma proteína de 494 aminoácidos com dois domínios distintos. As regiões amino- e carboxi-terminais “conservadas” formam um domínio que é essencial para a activação de TLR5.

O domínio do meio da flagelina FliC compreende aminoácidos não obrigatórios para a sinalização de TLR5. É designada como uma região “hipervariável”, uma vez que as sequências primárias variam grandemente em composição e tamanho de uma espécie bacteriana para outra. Em contraste, é conhecido que a região hipervariável é essencial para a antigenicidade da flagelina.

Foi demonstrado que a injeção intravenosa (i.v.) de flagelinas promove uma resposta sistémica, caracterizada pela produção de mediadores pró-inflamatórios (tais como TNF α ou IL-6) e activação de DC.

Além disso, as flagelinas desencadeiam mecanismos de defesa inatos e adaptativos específicos para a mucosa. Por exemplo, linhas de células epiteliais e a mucosa do pulmão regulam positivamente a produção de quimiocinas como CXCL8 (IL-8) e CCL20 que, por sua vez, recrutam PMN da mucosa e DC, respectivamente.

Vários autores também relataram que as flagelinas são potentes imunoadjuvantes da mucosa e sistémicos que induzem (i) respostas secretoras de anticorpo e/ou do soro e (ii) respostas celulares Th1 e Th2 às próprias flagelinas e a antigénios co-administrados.

Devido às suas potentes actividades imunoadjuvantes sistémicas e de mucosa, as flagelinas podem ser particularmente interessantes para o desenvolvimento de vacinas e, em particular, do tipo vacina para mucosa. Essa utilização foi proposta no documento WO-A-2004 022092.

Contudo, a maior parte dos referidos adjuvantes de tipo flagelina não são completamente adequados para essa aplicação de vacina e, em particular, para a referida estratégia de vacina para mucosa.

Na verdade, os adjuvantes de flagelina conhecidos apresentam efeitos colaterais significativos e, em particular, actividade

antigénica intrínseca e propriedades pró-inflamatórias sistémicas quando administrados *in vivo*.

Além disso, a maioria dos imunoadjuvantes do tipo flagelina conhecidos precisam de ser ligados fisicamente ao antigénio alvo, de modo a induzir uma potente resposta imunitária quando administrados *in vivo*. Este requisito obriga a manipulações complexas suplementares para obter uma ligação flagelina-antigénio adequada e a substância imunogénica útil final.

Existe assim uma necessidade para novos compostos que podem ser utilizados como adjuvantes imunológicos, em particular para induzir e/ou para aumentar a resposta imunitária de mucosa contra um antigénio, nomeadamente sem despoletar qualquer efeito colateral da inflamação sistémica significativa.

Estes novos compostos devem também, vantajosamente, ser capazes de despoletar uma resposta imunitária por uma mistura simples com o antigénio alvo.

A presente invenção propõe, então, novos compostos imunoadjuvantes que satisfazem esta necessidade, e que podem ser particularmente úteis para a produção de composições imunogénicas e de vacina (em particular de tipo para mucosa).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Verificou-se-se, de acordo com a invenção, novos compostos de péptido derivados de flagelina com origem em *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium do tipo da SEQ ID N° 1, que

apresentam uma actividade de adjuvante imunitária *in vivo* como ilustrado nos exemplos aqui presentes.

Foi também demonstrado, de acordo com a presente invenção, que estes novos compostos adjuvantes exibem propriedades de um adjuvante de mucosa particular, sem exercer efeitos pró-inflamatórios sistémicos significativos.

Os referidos novos compostos derivados da flagelina da invenção são assim particularmente úteis como substâncias imunoadjuvantes, vantajosamente para induzir e/ou aumentar uma resposta imunitária da mucosa.

A presente invenção refere-se, assim, a um composto imunoadjuvante de acordo com a reivindicação 1:

Formas de realização preferidas do composto imunoadjuvante da invenção são de aqui em diante definidas na descrição.

A invenção também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um composto imunoadjuvante como definido acima (ou na descrição seguinte), juntamente com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

A composição farmacêutica de acordo com a invenção compreende um composto imunoadjuvante como definido acima, juntamente com um ou mais antigénios.

A referida composição farmacêutica é assim, vantajosamente, uma composição imunogénica (*i. e.* uma composição que tem como objectivo induzir uma resposta imunitária contra um antigénio, *e. g.*, para produzir anticorpos) ou uma composição de vacina

(i. e., uma composição que tem como objectivo induzir uma resposta imunitária num indivíduo ou num animal de modo a tratar ou para prevenir uma doença).

De acordo com uma forma de realização preferida, a referida composição imunogénica ou a referida vacina compreende vantajosamente o referido composto imunoadjuvante da invenção que não está ligado covalentemente ao referido um ou mais antigénios.

A presente invenção também se refere ao composto imunoadjuvante como definido acima, para utilização como um medicamento (em particular para induzir e/ou para aumentar actividade de adjuvante de mucosa).

Esta invenção também se refere à utilização de um composto imunoadjuvante de acordo com a invenção, para o fabrico de uma composição farmacêutica, em particular, para induzir e/ou para aumentar uma resposta imunitária contra um ou mais antigénios diferentes de uma proteína de flagelina (em particular no compartimento da mucosa após administração pela via mucosa).

Esta invenção também se refere a (i) um ácido nucleico que codifica o composto do péptido imunoadjuvante como acima divulgado, (ii) um vector recombinante compreendendo, aqui inserido, o referido ácido nucleico, (iii) uma célula hospedeira transfectada ou transformada com o referido ácido nucleico ou com o referido vector recombinante.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Características e reactividade cruzada de flagelinas com a região hipervariável eliminada.

(A) Uma vista esquemática em 3D das flagelinas recombinantes.

A estrutura de flagelina FliC de tipo selvagem é apresentada no painel do lado esquerdo utilizando Pymol (<http://www.pymol.org>). No monómero, as regiões terminais (1-170 e 400-494) são dobradas fortemente em hélices α e formam um domínio estrutural envolvido na função de flagelo. O motivo 89-96 (preto) é essencial para a sinalização de TLR5. O domínio "hipervariável" FliC é principalmente constituído por estruturas β e voltas β .

Utilizando Swiss-Model (<http://www.expasy.org/spdbv/>), foi prevista uma estrutura global para FliC $_{\Delta 204-292}$ e FliC $_{\Delta 174-400}$, apresentando uma deleção parcial e total da região hipervariável, respectivamente.

Para FliC $_{\Delta 191-352}$, as posições de aminoácidos delineando a deleção são apresentadas no painel do lado esquerdo. FliC $_{\Delta 174-400}$ e FliC $_{\Delta 191-352}$ contêm ligantes GAAG e LELE na junção de deleção, respectivamente.

(B, C) Reactividade cruzada de soros específicos para FliC.

Foram obtidos soros hiperimunitários após administração s.c. de flagelina formulada com CFA para iniciação, seguido por reforços de IFA. O soro foi titulado em ELISA para FliC,

FliC_{Δ204-292}, FliC_{Δ191-352} e FliC_{Δ174-400}. Os resultados são representativos das 2 experiências. (B) Reactividade cruzada de soro anti-FliC. (C) Reactividade cruzada de soro anti-FliC_{Δ174-400}.

A significância estatística ($p > 0,05$ num teste de Mann-Whitney) é indicada por um asterisco.

Figura 2. Actividade pró-inflamatória epitelial e da mucosa de flagelinas com a região hipervariável eliminada.

(A, B) Activação de células epiteliais por flagelinas recombinantes.

As células epiteliais humanas foram activadas com flagelinas FliC, FliC_{Δ204-292}, FliC_{Δ191-352}, FliC_{Δ174400} ou FliC_{Δ174-400/89-96*} às concentrações indicadas. Células Caco-Rumbo contendo a fusão do repórter *CCL20-luc* foram activadas durante 6 h e a actividade da luciferase foi normalizada para a actividade máxima medida com níveis de FliC saturantes (A). As células epiteliais BEAS-2B brônquicas foram estimuladas durante 16 h antes de medir os níveis de IL-8 no sobrenadante. Os resultados são representativos de 1 das 2 experiências independentes (B).

(C-D) Estimulação da resposta inata da mucosa por flagelinas com deleção.

Flagelinas recombinantes ou preparações tratadas com tripsina (1 µg equivalente) foram administradas i.n. a murganhos anestesiados (n=3-5). Níveis de ARNm específicos para *CCL20* nos pulmões completos foram determinados 2 h mais tarde utilizando

qRT-PCR em tempo real (C). Seis horas após a instilação, BAL (barras pretas) e pulmões (barras brancas) foram amostradas para medir a concentração de CCL20 (D).

A significância estatística ($p > 0,05$) foi determinada num teste de Mann-Whitney.

Figura 3. Efeito adjuvante de flagelinas com uma deleção da região hipervariável.

Foram imunizados murganhos ($n=8$) i.n. com ovalbumina (OVA) ± flagelinas ou toxina da cólera (CT) nos dias 1 e 21.

No dia 35, foram medidos os títulos de IgG específicos para OVA no soro (A) e BAL (B).

A concentração de IgA específica para OVA em BAL foi determinada (C).

Os resultados são representativos de 1 de 2 experiências independentes. A significância estatística ($p > 0,05$) foi determinada num teste de Mann-Whitney.

Figura 4. Propriedades antigénicas intrínsecas de flagelinas sem uma região hipervariável.

Foram imunizados murganhos ($n=8$) i.n. com ovalbumina (OVA) ± flagelinas ou toxina da cólera (CT) ou LPS nos dias 1 e 21.

No dia 35, os títulos de IgG específicos para FliC foram medidos no soro (A) e BAL (B). Os resultados são representativos de 1 de 2 experiências independentes.

A significância estatística ($p > 0,05$) foi determinada num teste de Mann-Whitney.

Figura 5. Neutralização da sinalização de TLR5 por anticorpos específicos para a flagelina.

Murganhos NMRI foram imunizados s.c. na semana 1 com 1 μ g de flagelina FliC e CFA, seguido por reforços nas semanas 3, 5, 7 com FliC e IFA. Em condições de simulação, os animais foram tratados de modo semelhante com ovalbumina e adjuvantes ou adjuvantes isoladamente. As experiências foram realizadas na semana 9.

(A) Actividade neutralizadora de TLR5 *in vitro* de soro imunitário específico para a flagelina.

Células epiteliais Caco-Rumbo contendo a construção repórter CCL20-luc foram activadas durante 6h com a flagelina FliC incubada com 50% v/v de soro hiper-imune FliC (círculos brancos) ou simulado (círculos pretos). A actividade da luciferase foi determinada e normalizada para a actividade obtida com 100 ng/mL de FliC. Os resultados são representativos de 1 de 3 experiências independentes.

(B, C) Actividade neutralizante de TLR5 *in vivo* de soro imunitário específico para a flagelina.

Os animais imunizados (n=3) foram injectados i.v. com PBS (barras pretas) ou 0,1 µg (barras cinzentas) ou 1 µg de flagelina FliC (barras brancas). Os soros foram recolhidos 2 h mais tarde e as concentrações de CCL20 (B) e CXCL2 (C) foram determinadas por ELISA.

(D) A actividade neutralizante de soro imunitário.

Os animais (n=3 por dose) foram transferidos de forma passiva i.v. com várias quantidades de soro específico para a flagelina ou de simulação, e tratados 1 h mais tarde i.v. com flagelinas recombinantes, como indicado. A produção de quimiocina no soro 2 h após a exposição foi medida por ELISA.

A significância estatística ($p > 0,05$) foi determinada utilizando um teste de Mann-Whitney.

Figura 6. Actividade de resposta à dose intranasal das flagelinas FliC e FliC_{Δ174-400}

Os murganhos foram (n=3-5) instilados i.n. com várias quantidades de flagelinas FliC (quadrados pretos) ou FliC_{Δ174-400} (quadrados brancos). As concentrações de CCL20 (A) e CXCL2 (B) foram determinadas 6 h mais tarde em BAL utilizando uma ELISA.

A significância estatística ($p > 0,05$) foi determinada num teste de MannWhitney U.

Figura 7. Alteração da capacidade de activação sistémica da flagelina FliC_{Δ174-400} com a região hipervariável eliminada.

Várias quantidades de flagelina FliC (quadrados pretos) ou FliC_{Δ174-400} (quadrados brancos) foram administradas i.v. As concentrações de CCL20 (A) e CXCL2 (B) foram determinadas 2 h mais tarde no soro utilizando uma ELISA.

A significância estatística ($p > 0,05$) foi determinada num teste de Mann-Whitney.

Figura 8: Análise de SDS PAGE de várias flagelinas recombinantes com a região hipervariável eliminada

A Figura 8 consiste numa fotografia de uma electroforese de SDS PAGE de FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, FliC_{Δ138-405} e FliC_{Δ100-405} produzida de forma recombinante após coloração com Coomassie blue.

Figura 9: Análise de imunotransferência de várias flagelinas recombinantes com a região hipervariável eliminada

A Figura 9 consiste numa fotografia de uma electroforese de transferência de Western de FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, e FliC_{Δ138-405} e FliC_{Δ100-405} produzidos de forma recombinante após coloração com anticorpos anti-FliC.

Figura 10: Indução da produção de quimiocina CCL20 por várias flagelinas recombinantes com a região hipervariável eliminada

Estimulação da resposta inata sistémica por flagelinas com deleção.

As flagelinas recombinantes ou preparações tratadas com tripsina (10 µg equivalente) foram administradas i.p. a murganhos (n=2). Duas horas após a injeção, o soro foi amostrado para medir a concentração CCL20.

Figura 11: Indução da produção da quimiocina CXCL2 por várias flagelinas recombinantes com a região hipervariável eliminada

Estimulação da resposta inata sistémica por flagelinas com deleção.

Flagelinas recombinantes ou preparações tratadas com tripsina (10 µg equivalente) foram administradas i.p. a murganhos (n=2). Duas horas após injeção, os soros foram amostrados para medir a concentração de CXCL2.

Figura 12: Efeito adjuvante de FliC_{Δ174-400} recombinante para imunização contra antigénio gp140 do vírus HIV.

Os murganhos (n=6) foram imunizados i.n. com gp140 (5 µg) 6 ± flagelinas (1 µg) nos dias 1 e 21.

No dia 35, os títulos de IgG específicos para gpP140 foram medidos no soro (símbolos a preto) e BAL (símbolos a branco). Os resultados são representativos de 1 de 2 experiências independentes.

Figura 13: Perfil cromatográfico a 280 nm de um ciclo de purificação de FliC num substrato de imunoafinidade no qual os anticorpos monoclonais de murganho anti-FliC_{Δ174-400} foram imobilizados.

Figura 14: Análise de electroforese de várias fracções de cromatografia recolhidas durante um ciclo de purificação de FliC num substrato de imunoafinidade no qual os anticorpos monoclonais de murganho anti-FliC_{Δ174-400} foram imobilizados.

A Figura 14 consiste numa fotografia de uma electroforese de SDS PAGE de fracções recolhidas como descrito na Figura 13 após coloração com Coomassie blue.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção foi demonstrado que os novos compostos induzem uma actividade imunoadjuvante de mucosa *in vivo* permitindo a indução de uma resposta imunitária contra um antigénio alvo, quando os referidos novos compostos são administrados com o(s) antigénio(s) correspondentes adequado(s).

Nomeadamente, foi aqui demonstrado que os novos compostos adjuvantes da invenção exercem as suas propriedades imunoadjuvantes também após administração intranasal a murganhos. Os referidos compostos imunoadjuvantes da invenção são assim capazes de potenciar respostas imunitárias sistémicas e da mucosa.

Também foi demonstrado que o referido composto imunoadjuvante derivado da flagelina da invenção possui propriedades de adjuvante de mucosa mediada por TLR5, com efeito pró-inflamatório da mucosa *in vivo*, mas não demonstra qualquer efeito colateral pró-inflamatório sistémico significativo após injeção sistémica.

Além disso, os resultados contidos nos exemplos aqui apresentados demonstram que o referido composto imunoadjuvante derivado da flagelina não apresenta efeito antigénico intrínseco significativo, *i. e.*, a molécula de interesse previne ou atenua a potência para desencadear anticorpos específicos para a flagelina, nomeadamente no soro ou lavagem broncoalveolar (BAL) quando administrado por via intranasal.

Os resultados acima demonstram que o referido composto imunoadjuvante derivado da flagelina da invenção pode ser utilizado como um adjuvante eficaz da resposta imunitária, especialmente para induzir respostas imunitárias da mucosa.

O referido composto peptídico pode assim ser útil nomeadamente quando está compreendido em (i) composições de uma vacina mucosa para prevenir ou tratar doenças induzindo uma resposta imunitária da mucosa no corpo do organismo do indivíduo, ou em (ii) uma composição imunogénica para aumentar

ou despoletar uma resposta imunitária contra um antígeno desejado.

Em particular, como mostrado nos Exemplos aqui apresentados, a requerente verificou que, inesperadamente, a sinalização de TLR5 está compartimentada, uma vez que a flagelina FliC Δ 174-400 particular (*i. e.*, um péptido derivado da flagelina em que a sequência do péptido SEQ ID N° 1 da flagelina FliC da *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ATCC14028 é eliminada da posição 174 até à posição 400) estimula a imunidade na mucosa mas é desprovida de qualquer efeito pró-inflamatório sistémico significativo.

A requerente também estabeleceu que a flagelina FliC Δ 174-400 possui propriedades benéficas prominentes, devido à sua fraca capacidade para gerar anticorpos específicos para fliC neutralizantes.

Adicionalmente, verificou-se aqui que a flagelina FliC Δ 174-400 é fortemente atenuada para a sinalização sistémica comparada com a flagelina de tipo selvagem, enquanto a actividade da mucosa se manteve não afectada.

Também foi aqui demonstrado que outras flagelinas com a região hipervariável eliminada, incluindo FliC Δ 161-405 e FliC Δ 138-405 são dotadas com propriedades imunoadjuvantes.

Péptidos imunoadjuvantes da invenção

As verificações permitem à requerente conceber uma família de péptidos, que teriam as mesmas propriedades e vantagens que as flagelinas FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} e FliC_{Δ138-405}.

A referida família de péptidos é definida começando a partir das flagelinas FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} e FliC_{Δ138-405} estudadas nos Exemplos aqui apresentados e baseada na sequência peptídica da flagelina SEQ ID N° 1 e na estrutura cristalográfica do péptido, para prever versões truncadas que podem ter a actividade de estimulação de TLR5 restante.

A presente invenção refere-se, desse modo, vantajosamente ao composto imunoadjuvante compreendendo:

- a) um péptido N-terminal possuindo uma sequência de aminoácidos que começa no resíduo de aminoácido localizado na posição 1 da SEQ ID N° 1 e terminando num resíduo de aminoácidos seleccionado do grupo que consiste em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizados nas posições 99 até 173 da SEQ ID N° 1; e
- b) um péptido do C-terminal possuindo uma sequência de aminoácidos que começa num resíduo de aminoácidos seleccionado do grupo que consiste em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado nas posições 401 até 406 de SEQ ID N° 1 e terminando no resíduo de aminoácidos localizado na posição 494 de SEQ ID N° 1,

em que:

- o referido péptido C-terminal está directamente ligado ao péptido N-terminal, ou
- o referido péptido N-terminal e o péptido C-terminal estão ligados indirectamente, um ao outro, através de uma cadeia de espaçador intermediário.

O composto da invenção pode ser aqui designado indistintamente “composto imunoadjuvante” ou “péptido derivado de flagelina”.

Por “composto imunoadjuvante”, entende-se que o péptido derivado da flagelina da invenção pode induzir e/ou aumentar a resposta imunitária contra um antigénio quando administrado a um indivíduo ou um animal.

Também se pretende que signifique uma substância que actua, de um modo geral, para acelerar, prolongar ou aumentar a qualidade de respostas imunitárias específicas para um antigénio específico.

Como aí descrito, o referido composto imunoadjuvante pode ser utilizado numa vacina ou composição imunogénica, juntamente com um ou mais antigénios e excipientes farmacologicamente aceitáveis.

A sequência peptídica de SEQ ID N° 1 acima mencionada tem origem na flagelina FliC de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ATCC14028 (número de acesso AAL20871).

A numeração do polipéptido começa no primeiro aminoácido após a eventual metionina N-terminal (não apresentada na SEQ ID N° 1), que é tipicamente excisada pela aminopeptidase da metionina em células hospedeiras das bactérias como sub-mencionadas.

Os péptidos N-terminal e C-terminal do péptido da invenção derivado da flagelina possuem vantajosamente pelo menos 90%, e ainda mais, identidade de aminoácidos com a porção da sequência de aminoácidos correspondente da SEQ ID N° 1.

Descrições de identidade e sobre como pode ser determinada são bem conhecidas dos especialistas na técnica.

Como aqui pretendido, uma dada sequência de aminoácidos de interesse possui 90% ou mais de identidade em relação a uma sequência de aminoácidos de referência, em que a referida sequência de aminoácidos de interesse possui, pelo menos, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 69%, 97%, 98%, 99% ou 99,5% de identidade de aminoácidos com a referida sequência de aminoácidos de referência.

Para determinar a percentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos, as sequências são alinhadas para efeitos de comparação óptima. Por exemplo, podem ser introduzidos intervalos numa ou em ambas de uma primeira e uma segunda sequência de aminoácidos para um alinhamento óptimo e as sequências não homólogas podem ser ignoradas para efeitos de comparação.

Para efeitos de comparação óptima, a percentagem de identidade de duas sequências de aminoácidos pode ser calculada

com o CLUSTAL W (versão 1.82) com os seguintes parâmetros: (1) CPU MODE = ClustalW mp; (2) ALIGNMENT = « full » ; (3) OUTPUT FORMAT = « aln w/numbers » ; (4) OUTPUT ORDER = « aligned » ; (5) COLOR ALIGNMENT = « no » ; (6) KTUP (word size) = « default » ; (7) WINDOW LENGTH = « default » ; (8) SCORE TYPE = « percent » ; (9) TOPDIAG = « default » ; (10) PAIRGAP = « default » ; (11) PHYLOGENETIC TREE/TREE TYPE = « none » ; (12) MATRIX = « default » ; (13) GAP OPEN = « default » ; (14) END GAPS = « default » ; (15) GAP EXTENSION = « default » ; (16) GAP DISTANCES = « default » ; (17) TREE TYPE = « cladogram » et (18) TREE GRAP DISTANCES = « hide ».

Em particular, é entendido que podem ser realizadas modificações menores sem destruir as vantagens e a actividade do péptido da invenção derivado da flagelina.

Essas modificações estão incluídas dentro do significado das expressões “composto imunoadjuvante” ou “péptido derivado de flagelina” da invenção, desde que a actividade imunitária particular seja preservada, em particular as propriedades de adjuvante de mucosa mediada por TLR5 sem qualquer efeito colateral pró-inflamatório sistémico significativo.

Além disso, podem ser ligadas várias moléculas, covalentemente ou não covalentemente, ao péptido da invenção derivado da flagelina, incluindo, por exemplo, outros polipéptidos, carbo-hidratos, ácidos nucleicos ou lípidos.

Essas moléculas ligadas consistem eventualmente no antigénio contra o qual a resposta imunitária é desejada. Essas modificações estão incluídas na definição da invenção.

As modificações menores também se podem referir, por exemplo, a substituições conservadoras de aminoácidos que ocorrem naturalmente e bem como alterações estruturais que incorporam aminoácidos de ocorrência não natural, análogos de aminoácidos e mimetizadores funcionais. Por exemplo, um resíduo de aminoácido de Lisina é considerado como sendo uma substituição conservadora para o resíduo de aminoácido Arginina.

Assim, como aqui pretendido, um primeiro polipéptido possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com um segundo polipéptido de referência engloba os primeiros polipéptidos compreendendo uma ou mais diferenças de aminoácidos em comparação com o segundo polipéptido de referência e, em que as referidas diferenças de aminoácidos são seleccionadas a partir do grupo que consiste em (i) uma ou mais substituições de aminoácidos, (ii) uma ou mais deleções de aminoácidos e (iii) uma ou mais adições de aminoácidos ou qualquer combinação de (i), (ii) e (iii).

De um modo geral, a invenção engloba, por isso, variantes de polipéptidos possuindo uma ou mais substituições de aminoácidos, deleções ou adições, em comparação com um polipéptido de referência, de um modo preferido, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácidos, e/ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 deleções de aminoácidos e/ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 adições de aminoácidos em comparação com o polipéptido de referência.

Os especialistas na técnica sabem ou podem determinar que estrutura constitui análogos de aminoácidos e mimetizadores de aminoácidos funcionalmente equivalentes.

Como acima mencionado, os péptidos C-terminal e N-terminal do péptido da invenção derivado da flagelina podem estar directamente ligados, vantajosamente, covalentemente por uma ligação peptídica.

Numa forma de realização alternativa, os referidos péptidos N-terminal e C-terminal do péptido da invenção derivado da flagelina são ligados indirectamente, um ao outro, através de uma cadeia espaçadora.

A cadeia espaçadora deve ser escolhida de modo a não interferir com a actividade biológica do composto final e também de modo a que a imunogenicidade do composto final não seja significativamente aumentada.

A cadeia espaçadora é, de um modo preferido, constituída por aminoácidos ligados juntamente por ligações peptídicas e ligados covalentemente entre as sequências N-terminal e C-terminal do péptido da invenção derivado da flagelina. Assim, em formas de realização preferidas, a cadeia espaçadora consiste desde 1 até 20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas, em que os aminoácidos são seleccionados de 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente. Numa forma de realização mais preferida, os aminoácidos 1 até 20 são seleccionados de Gly, Ala, Pro, Asn, Gln, Cys, Lys. De um modo ainda mais preferido, a cadeia espaçadora é constituída da sequência $\text{NH}_2\text{-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH}$.

São também possíveis ligantes não peptídicos: por exemplo, ligantes alquilo. Estes ligantes alquilo podem ainda ser substituídos por qualquer grupo de impedimento não estérico, acilo inferior, halogénio, CN, NH_2 , fenilo, etc. Outro tipo de ligante não peptídico é um grupo polietilenoglicol.

Um especialista na técnica conhece bem estas cadeias espaçadoras e pode escolher a cadeia espaçadora adequada, nomeadamente dependendo das sequências do péptido N-terminal e do péptido C-terminal que tem de ligar uma à outra.

Além disso, o resíduo de aminoácidos asparagina da sequência C-terminal, localizado na posição do aminoácido 488 da SEQ ID N° 1, é substituído vantajosamente por um resíduo de serina.

Esta substituição foi introduzida para marcar especificamente o péptido da invenção derivado da flagelina. Essa substituição ocorre naturalmente em flagelinas de outra espécie bacteriana como *Legionella pneumophila*, sem alterar a actividade de estimulação de TLR5. Podem ser introduzidas outras substituições nas posições que não alteram a actividade de estimulação de TLR5 adjuvante para melhor marcar o péptido da invenção derivado da flagelina.

Formas de realização preferidas do péptido da invenção derivado da flagelina

De acordo com formas de realização preferidas, à luz da sequência peptídica da flagelina SEQ ID N° 1 e da estrutura cristalográfica, o péptido N-terminal do composto imunoadjuvante da invenção é vantajosamente seleccionado do grupo que consiste das sequências de aminoácidos 1-99, 1-137, 1-160 e 1-173 da SEQ ID N° 1.

Em particular, a estrutura 3D da flagelina FliC demonstra que o domínio N-terminal é organizado em 3 hélices alfa separadas por voltas beta seguidas por folhas beta e voltas beta. Retendo parte(s) destas estruturas secundárias no terminal N pode ser suficiente para reter a actividade de estimulação de TLR5 (e em particular a actividade de estimulação de TLR5 da mucosa), *i. e.*, as sequências de aminoácidos 1-99 da SEQ ID N° 1 contém as primeiras 2 hélices alfa, as sequências de aminoácidos 1-137 da SEQ ID N° 1 contém as primeiras 3 hélices alfa e a sequência de aminoácidos 1-173 da SEQ ID N° 1 contém as estruturas N-terminais encontradas na flagelina FliC_{Δ174-400}.

Noutras formas de realização preferidas, o referido péptido C-terminal do composto imunoadjuvante é seleccionado do grupo que consiste nas sequências de aminoácidos 401-494 e 406-494 da SEQ ID N° 1.

Em particular, as estruturas 3D da flagelina FliC demonstram que o domínio C-terminal é organizado em 2 hélices alfa separadas por voltas beta. A(s) parte(s) de retenção destas estruturas secundárias no terminal N podem ser suficientes para reter actividade de estimulação de TLR5 (e, em particular, actividade de estimulação de TLR5 da mucosa): as sequências de aminoácidos 401-494 da SEQ ID N° 1 é a sequência que se encontra na flagelina de FliC_{ΔΔ174-400} enquanto as sequências de aminoácidos 406-494 da SEQ ID N° 1 contém apenas as duas hélices alfa C-terminais secundárias.

Em certas formas de realização preferidas, o péptido N-terminal do composto imunoadjuvante da invenção consiste na sequência de aminoácidos que começa no resíduo de Alanina localizado na posição 1 da SEQ ID N° 1 e termina no resíduo de

aminoácidos localizado na posição da SEQ ID N° 1 seleccionada do grupo que consiste nos resíduos de aminoácidos localizados nas posições 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172 e 173.

Em certas formas de realização preferidas, o péptido C-terminal do composto imunoadjuvante da invenção consiste na sequência de aminoácidos que começa num resíduo de aminoácidos localizado na posição da SEQ ID N° 1 seleccionado do grupo que consiste nos resíduos de aminoácidos localizados nas posições 401, 402, 403, 404, 405 e 406 e termina no resíduo de Arginina localizado na posição 494 da SEQ ID N° 1.

Num aspecto específico destas formas de realização preferidas, o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal do composto imunoadjuvante da invenção são vantajosamente ligados, um ao outro, através da cadeia espaçadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH acima mencionada (*i. e.*, em substituição da sequência 174-400 eliminada); o resíduo de aminoácidos asparagina localizado na posição 488 da SEQ ID N° 1 também é vantajosamente substituído por um resíduo de serina.

Formas de realização ilustrativas desses compostos imunoadjuvantes descrevem as acima englobadas FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, e FliC_{Δ138-405} que são aqui apresentadas nos exemplos; e que são também descritas em maior detalhe mais adiante.

Ainda noutra forma de realização, os referidos péptidos N-terminal e C-terminal do composto imunoadjuvante de interesse

consistem nas sequências de aminoácidos 1-173 e 401-494 de SEQ ID N° 1, respectivamente.

Ainda noutra forma de realização, os referidos péptidos N-terminal e C-terminal do composto imunoadjuvante de interesse consistem nas sequências de aminoácidos 1-160 e 406-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente.

Ainda noutra forma de realização, os referidos péptidos N-terminal e C-terminal do composto imunoadjuvante de interesse consistem nas sequências de aminoácidos 1-137 e 406-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente.

Em algumas formas de realização, os compostos imunoadjuvantes, de acordo com a invenção, compreendem um resíduo de metionina adicional na sua extremidade N-terminal, especialmente quando os compostos são produzidos como proteínas recombinantes em células bacterianas.

Na forma de realização em que os referidos péptidos N-terminal e C-terminal do composto imunoadjuvante de interesse consistem nas sequências de aminoácidos 1-173 e 401-494 da SEQ ID N° 1, o péptido da invenção derivado da flagelina consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID N° 1, removida da sequência de aminoácidos que se estende desde a posição de aminoácidos 174 até à posição de aminoácidos 400. A sequência da flagelina-péptido da invenção também é denominada na presente descrição "FliC_{Δ174-400}" ou "flagelina FliC_{Δ174-400}".

De acordo com uma forma de realização preferida, o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal do composto imunoadjuvante da invenção estão ligados vantajosamente, um ao

outro, através da cadeia espaçadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH acima mencionada (*i. e.*, em substituição da sequência eliminada 174-400); o resíduo de aminoácidos da asparagina localizado na posição 488 da SEQ ID N° 1 é também vantajosamente substituído por um resíduo de serina.

O péptido da invenção derivado da flagelina assim obtido é uma sequência de 271 aminoácidos, em que a sequência peptídica consiste em SEQ ID N° 2.

A numeração do polipéptido começa no primeiro aminoácido após a eventual metionina N-terminal (não apresentada na SEQ ID N° 2), que é tipicamente excisado pela aminopeptidase da metionina em células hospedeiras das bactérias como mencionado abaixo.

Na forma de realização em que os referidos péptidos N-terminal e C-terminal do composto imunoadjuvante de interesse consistem nas sequências de aminoácidos 1-160 e 406-494 da SEQ ID N° 1, o péptido da invenção derivado da flagelina consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID N° 1, removida da sequência de aminoácidos que se estende desde a posição de aminoácidos 161 até à posição de aminoácidos 405. A sequência da flagelina-péptido da invenção é também denominada, na presente descrição como "FliC_{Δ161-405}" ou "flagelina FliC_{Δ161-405}".

De acordo com uma forma de realização preferida, o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal do composto imunoadjuvante da invenção estão vantajosamente ligados, um ao outro, através da cadeia espaçadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH acima mencionada (*i. e.*, na substituição da sequência eliminada 161-405); o resíduo de aminoácidos asparagina localizado na

posição 488 da SEQ ID N° 1 é também vantajosamente substituído por um resíduo de serina.

O péptido da invenção derivado da flagelina assim obtido é uma sequência de 253 aminoácidos, em que a sequência peptídica consiste na SEQ ID N° 25.

A numeração do polipéptido começa no primeiro aminoácido após a eventual metionina N-terminal (não apresentada na SEQ ID N° 25), que é tipicamente excisada pela aminopeptidase da metionina em células hospedeiras das bactérias como abaixo revelado.

Na forma de realização em que os referidos péptidos N-terminal e C-terminal do composto imunoadjuvante de interesse consistem nas sequências de aminoácidos 1-137 e 406-494 da SEQ ID N° 1, o péptido da invenção derivado da flagelina consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID N° 1, removida da sequência de aminoácidos que se estende da posição de aminoácidos 138 até à posição de aminoácidos 405. A sequência da invenção da flagelina-péptido é também denominada na presente descrição "FliC_{Δ138-405}" ou "flagelina FliC_{Δ138-405}".

De acordo com uma forma de realização preferida, o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal do composto imunoadjuvante da invenção estão vantajosamente ligados, um ao outro, através da cadeia espaçadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH acima mencionada (*i. e.*, em substituição da sequência eliminada 138-405); o resíduo de aminoácidos asparagina localizado na posição 488 da SEQ ID N° 1 é também vantajosamente substituído por um resíduo de serina.

O péptido da invenção derivado da flagelina assim obtido é uma sequência de 230 aminoácidos, em que a sequência peptídica consiste na SEQ ID N° 26.

A numeração do polipéptidos começa no primeiro aminoácido após a eventual metionina N-terminal (não apresentada na SEQ ID N° 26), que é tipicamente excisado pela aminopeptidase da metionina em células hospedeiras das bactérias como abaixo divulgado.

Na forma de realização em que os referidos péptidos N-terminal e C-terminal do composto imunoadjuvante de interesse consistem nas sequências de aminoácidos 1-99 e 406-494 da SEQ ID N° 1, o péptido da invenção derivado da flagelina consiste na sequência de aminoácidos SEQ ID N° 1, removida da sequência de aminoácidos que se estende desde a posição de aminoácidos 100 até à posição de aminoácidos 405. A sequência da invenção da flagelina-péptido é também designada na presente descrição "FliC_{Δ100-405}" ou "flagelina FliC_{Δ100-405}".

De acordo com uma forma de realização preferida, o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal do composto imunoadjuvante da invenção estão vantajosamente ligados um ao outro através da cadeia espaçadora NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH acima mencionada (*i. e.*, em substituição da sequência eliminada 100-405); o resíduo de aminoácidos asparagina localizado na posição 488 da SEQ ID N° 1 é também vantajosamente substituído por um resíduo de serina.

O péptido da invenção derivado da flagelina assim obtido é uma sequência de 192 aminoácidos, em que a sequência peptídica consiste na SEQ ID N° 27.

A numeração do polipéptido começa no primeiro aminoácido após a eventual metionina N-terminal (não apresentada na SEQ ID N° 27), que é tipicamente excisada pela aminopeptidase da metionina nas células hospedeiras das bactérias como revelado abaixo.

Síntese do péptido imunoadjuvante da invenção

O péptido da invenção derivado da flagelina pode ser sintetizado pelas células recombinantes obtidas por engenharia genética, ou através de qualquer um dos métodos para síntese química ou enzimática de péptidos, que são bem conhecidos do especialista na técnica.

1. Síntese pelas células recombinantes

O péptido derivado da flagelina de acordo com a invenção pode ser produzido de forma recombinante pelas células recombinantes que foram transfectadas com um ácido nucleico que codifica a sua sequência de aminoácidos e permite a sua produção eficaz nas células transfectadas.

Sequência de ácidos nucleicos que codifica o péptido da invenção derivado da flagelina

As modificações da referida sequência peptídica de flagelina pode ser criadas utilizando técnicas de mutagenese de ADN recombinante.

São conhecidos dos especialistas na técnica vários métodos para construir e modificar sequências de ADN e a escolha dos referidos métodos recombinantes.

As técnicas de “mutagénese recombinante” compreendem, por exemplo, mutagénese dirigida a um sítio e mutagénese por PCR (ver, em particular, Current Protocols in Molecular Biology, 2007 by John Wiley e Sons, Inc., Capítulo 8 e 15).

A referida reacção em cadeia pela polimerase (PCR) é particularmente útil para uma vasta gama de processos e aplicações de mutação. Os processos de mutagénese por PCR tornam possível modificar e construir qualquer ADN alvo facilmente e eficientemente. Isto inclui a introdução de, por exemplo, mutuações pontuais, deleções ou inserções.

Estas técnicas são implementadas, por exemplo, no gene *fliC* de tipo selvagem da SEQ ID N° 3, isolado de estirpes de *S. Typhimurium* ATCC14028 que codifica o péptido da flagelina identificado pela SEQ ID N° 1.

Numa forma de realização preferida, o gene *fliC* acima mencionado é eliminado por uma porção central do seu comprimento por mutagénese de PCR (ver, em particular, Current Protocols in Molecular Biology, 2007 by John Wiley e Sons, Inc., Capítulo 8 e 15), Utilizando pares de iniciadores adequados selecionados em função das sequências desejadas N-terminal e C-terminal pesquisadas para o péptido da invenção.

Por exemplo, com base num plasmídeo derivado de pBR322 contendo o referido gene *fliC* de tipo selvagem da SEQ ID N° 3,

sob o controlo do seu próprio promotor, os seguintes pares de iniciadores podem ser utilizados na técnica de mutagénese por PCR:

- SEQ ID N° 4 e SEQ ID N° 5, para os péptidos N-terminal e C-terminal consistindo nas sequências de aminoácidos 1-99 e 401-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente;
- SEQ ID N° 4 e SEQ ID N° 6, para os péptidos N-terminal e C-terminal consistindo nas sequências de aminoácidos 1-99 e 406-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente;
- SEQ ID N° 7 e SEQ ID N° 5, para os péptidos N-terminal e C-terminal consistindo nas sequências de aminoácidos 1-137 e 401-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente;
- SEQ ID N° 7 e SEQ ID N° 6, para os péptidos N-terminal e C-terminal consistindo nas sequências de aminoácidos 1-137 e 406-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente;
- SEQ ID N° 8 e SEQ ID N° 5, para os péptidos N-terminal e C-terminal consistindo nas sequências de aminoácidos 1-160 e 401-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente;
- SEQ ID N° 8 e SEQ ID N° 6, para os péptidos N-terminal e C-terminal consistindo nas sequências de aminoácidos 1-160 e 406-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente;
- SEQ ID N° 9 e SEQ ID N° 5, para os péptidos N-terminal e C-terminal consistindo nas sequências de aminoácidos 1-173 e 401-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente;
- SEQ ID N° 9 e SEQ ID N° 6, para os péptidos N-terminal e C-terminal consistindo nas sequências de aminoácidos 1-173 e 406-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente.

Para alterar a asparagina da posição 488 da SEQ ID N° 1 para uma serina, por exemplo, pode ser utilizada mutagénese dirigida

a um sítio com os seguintes iniciadores SEQ ID N° 10 e SEQ ID N° 11.

Para introduzir o ligante NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH na junção 1-99, 1-137, 1-160 ou 1-173 com 401-494 ou 406-494 dos péptidos recombinantes da flagelina, pode ser adicionada a seguinte sequência de ADN GGTGCAGCTGGA na extremidade 5' das sequências do iniciador SEQ ID N°5 e SEQ ID N°6, sendo origem a iniciadores denominados, respectivamente, "F-ligante-401" da sequência SEQ ID N° 12 e "F-ligante-406" de sequência SEQ ID N° 13.

A sequência de ADN adequada para produzir o péptido da invenção derivado da flagelina FliC_{Δ174-400}, é, por exemplo, da sequência SEQ ID 14.

Um ácido nucleico adequado para produzir o péptido da invenção derivado da flagelina FliC_{Δ161-405}, é, por exemplo, da sequência SEQ ID 28.

Um ácido nucleico adequado para produzir o péptido da invenção derivado da flagelina FliC_{Δ138-405}, é, por exemplo, da sequência SEQ ID 29.

Um ácido nucleico adequado para produzir o péptido da invenção derivado da flagelina FliC_{Δ100-405}, é, por exemplo, da sequência SEQ ID 30.

Seleção e Utilização de um Vector Replicável

A sequência de ácidos nucleicos aqui divulgada, codificando o péptido derivado da flagelina de interesse, pode ser inserida

num vector replicável para clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão.

Estão disponíveis ao público vários vectores. O vector pode, por exemplo, estar na forma de um plasmídeo, cosmídeo, partícula viral, ou fago. A sequência apropriada de ácidos nucleicos pode ser inserida no vector através de uma variedade de processos. Em geral, o ADN é inserido num sítio(s) de endonuclease(s) de restrição apropriado(s) utilizando técnicas conhecidas na técnica.

Os componentes de vector incluem, de um modo geral, mas não estão limitados a, uma ou mais de uma sequência sinal se a sequência for para ser excretada, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento intensificador, um promotor e uma sequência de terminação de transcrição.

A construção de vectores adequados contendo um ou mais destes componentes emprega técnicas de ligação convencionais que são conhecidas dos especialistas na técnica.

O péptido derivado da flagelina de interesse pode ser produzido recombinantemente não apenas directamente, mas também como um polipéptido de fusão com um polipéptido heterólogo, que pode ser uma sequência sinal ou outro polipéptido possuindo um sítio de clivagem específico no terminal N da proteína ou péptido maduros. Em geral, a sequência sinal pode ser um componente do vector ou pode ser uma parte do ADN que codifica o polipéptido de interesse que é inserido no vector. Uma sequência sinal pode ser uma sequência sinal procariótica seleccionada, por exemplo, do grupo da fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp ou líderes de enterotoxina II resistentes ao calor. Para a

secreção em leveduras, a sequência sinal pode ser, e. g., a invertase líder de levedura, factor alfa líder (incluindo factor alfa líder de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, estando o último descrito na Pat. U.S. Nº 5010182) ou líder da fosfatase ácida, a líder da glucoamilase de *C. albicans* (documento EP 362179 publicado a 4 de Abril de 1990), ou o sinal descrito em WO 90/13646 publicado a 15 de Nov. de 1990. Na expressão em células de mamíferos, podem ser utilizadas sequências sinal de mamíferos para dirigir a secreção da proteína, tais como sequências sinal de polipéptidos secretados da mesma espécie ou de espécies relacionadas, assim como líderes secretores virais.

Os vectores de expressão e clonagem contêm a sequência de ácidos nucleicos que permite que o vector se replique numa ou mais células hospedeiras seleccionadas. Essas sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequado para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2.mu. é adequada para a levedura e várias origens virais (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vectores de clonagem em células de mamíferos.

Os vectores de expressão e de clonagem irão, tipicamente, conter um gene de selecção, também denominado um marcador de selecção. Genes de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, e. g., ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos, e. g., o gene que codifica a racemase de D-alanina para Bacilos.

Um exemplo de marcadores de selecção adequados para células de mamíferos são aqueles que permitem a identificação de células competentes para incorporar o ácido nucleico que codifica o péptido derivado da flagelina de interesse, tal como DHFR ou timidina cinase. Uma célula hospedeira apropriada quando é empregue DHFR de tipo selvagem é a linha celular CHO deficiente em actividade de DHFR, preparada e propagada como descrito por Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980). Um gene de selecção adequado para utilização em leveduras é o gene *trp 1* presente no plasmídeo de leveduras YRp7. Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7: 141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene*, 10: 157 (1980). O gene *trp1* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de leveduras sem a capacidade para crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N° 44076 ou PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977).

Os vectores de expressão e de clonagem, normalmente, contêm um promotor ligado operacionalmente à sequência de ácidos nucleicos codificando o péptido derivado da flagelina para dirigir a síntese de ARNm. Os promotores reconhecidos por uma variedade de células hospedeiras potenciais são bem conhecidos. Os promotores adequados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem os sistemas da beta-lactamase e do promotor da lactose (Chang *et al.*, *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281: 544 (1979)), fosfatase alcalina, um sistema de promotor de triptofano (*trp*) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); documento EP 36776), e promotores híbridos tais como o promotor *tac* (deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)). Promotores para utilização em sistemas bacterianos também irão conter uma sequência de Shine-Dalgarno

(S.D.) ligada operacionalmente ao ADN que codifica o péptido derivado da flagelina de interesse.

Exemplos de sequências promotoras adequadas para utilização com hospedeiros de levedura incluem os promotores para a 3-fosfoglicerato cinase (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255: 2073 (1980)) ou outras enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4900 (1978)), tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexocinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutocinase, glucose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato cinase, triosefosfato isomerase, fosfoglucose isomerase e glucocinase.

Outros promotores de levedura que são promotores indutíveis tendo a vantagem adicional da transcrição controlada pelas condições de crescimento são as regiões promotoras para a álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradadores associados ao metabolismo do azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização da maltose e da galactose. Vectores e promotores adequados para utilização na expressão em leveduras são ainda descritos no documento EP 73657.

A transcrição de ácidos nucleicos de interesse a partir de vectores em células hospedeiras de mamíferos é controlada, por exemplo, através dos promotores obtidos dos genomas de vírus tais como o vírus polioma, vírus da varíola das aves documento(UK 2211504 publicado a 5 de Julho de 1989), adenovírus (tais como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite-B, e Vírus Símio 40 (SV40); por promotores de mamífero

heterólogos, e. g., o promotor da actina ou um promotor da imunoglobulina; e por promotores de choque térmico, desde que esses promotores sejam compatíveis com os sistemas da célula hospedeira.

A transcrição de um ADN que codifica o péptido derivado da flagelina de interesse por eucariotas superiores pode ser aumentada inserindo uma sequência intensificadora no vector. Os intensificadores são elementos de actuação cis do ADN, normalmente cerca de 10 até 300 pb, que actuam num promotor para aumentar a sua transcrição. Muitas sequências intensificadoras são agora conhecidas de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, .alfa.-fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo, irá utilizar-se um intensificador de um vírus de células eucarióticas. Exemplos incluem o intensificador SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o intensificador do promotor precoce de citomegalovírus, o intensificador do polioma no lado tardio da origem de replicação e intensificadores de adenovírus. O intensificador pode ser separado do vector numa posição a 5' ou 3' da sequência que codifica os polipéptidos de interesse, mas está, de um modo preferido, localizado no sítio 5' do promotor.

Vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas (células de leveduras, fungos, insectos, plantas, animais, humanas, ou nucleadas de outros organismos multicelulares) também irão conter sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilizar o ARNm. Essas sequências estão normalmente disponíveis da extremidade 5', ocasionalmente 3', regiões não traduzidas de ADN ou cADN eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção

não traduzida do ARNm que codifica o péptido derivado da flagelina de interesse.

Ainda outros métodos, vectores e células hospedeiras adequados para adaptação à síntese do péptido derivado da flagelina de interesse em cultura de células de cultura de vertebrados recombinantes são descritos em Gething *et al.*, *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281: 40-46 (1979); documentos EP 117060; e EP 117058.

Seleção e Transformação de Células Hospedeiras

As células hospedeiras são transfectadas ou transformadas com vectores de expressão ou clonagem aqui descritos para a produção de péptido derivado de flagelina e cultivadas em meios de nutriente convencionais modificados como apropriado para induzir promotores, transformantes de selecção ou amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas.

As condições de cultura, tais como meios, temperatura, pH e semelhantes, podem ser seleccionadas pelo especialista na técnica sem experimentação desnecessária. Em geral, princípios, protocolos e técnicas práticas para maximizar a produtividade de culturas celulares podem ser encontrados em *Mammalian Cells Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

São conhecidos do especialista na técnica métodos de transfecção, por exemplo, tratamento com CaPO_4 e electroporação. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é realizada utilizando técnicas convencionais apropriadas para

essas células. O tratamento de cálcio que emprega cloreto de cálcio, como descrito em Sambrook *et al.*, *supra*, ou a electroporação é, de um modo geral, utilizada para procariotas ou outras células que contêm barreiras de parede celular substanciais. A infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para a transformação de certas células vegetais, como descrito por Shaw *et al.*, *Gene* 23: 315 (1983) e documento WO 89/05859 publicado a 29 de Junho de 1989. Para as células de mamíferos sem essas paredes celulares, pode ser empregue o método da precipitação com fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Aspectos gerais das transformações do sistema de células hospedeiras de mamíferos foram descritos na Pat. U.S. N° 4399216. As transformações em leveduras são tipicamente realizadas de acordo com o método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) e Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Contudo, outros métodos para introduzir o ADN nas células, tais como por microinjecção nuclear, electroporação, fusão de protoplastos bacterianos com células intactas ou policatiões, *e. g.*, polibreno ou poliornitina, também podem ser utilizados. Para várias técnicas para transformar células de mamíferos, ver, Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) e Mansour *et al.*, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

Células hospedeiras adequadas para clonar ou expressar o ADN nos vectores aqui apresentados incluem células de procariotas, de levedura ou de eucariotas superiores.

Procariotas adequados incluem, mas não estão limitados a, eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, Enterobacteriaceae tais como *E. coli*. Várias estirpes de *E. coli* estão disponíveis ao público, tais

como a estirpe de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); estirpe de *E. coli* W3110 (ATCC 27,325); e K5772 (ATCC 53,635). Outras células hospedeiras procarióticas adequadas incluem Enterobacteriaceae, tais como *Escherichia*, e. g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e. g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e. g., *Serratia marcescans*, e *Shigella*, assim como Bacilli, tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (e. g., *B. licheniformis* 41P revelado em DD 266710 publicado a 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Estes exemplos são ilustrativos em vez de limitantes.

A estirpe SIN41 de *Salmonella typhimurium* (*fliC fljB*), é particularmente interessante para a produção do péptido derivado de flagelina, uma vez que estas células hospedeiras procarióticas não segregam quaisquer flagelinas (*Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:13722-7). Contudo, as flagelinas são secretadas através do sistema de secreção especializado: o denominado "Sistema de secreção de Tipo III". Curiosamente, a estirpe SIN41 produz todos os componentes do sistema de secreção de tipo III necessário para a secreção de flagelina ótima. A sequência de clonagem que codifica novos péptidos de flagelina sob o promotor *fliC* permite a secreção em grandes quantidades do péptido derivado de flagelinas de interesse na estirpe SIN41.

A estirpe W3110 é também interessante porque é uma estirpe hospedeira comum para fermentações do produto de ADN recombinante. De um modo preferido, a célula hospedeira segrega quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por exemplo, a estirpe W3110 pode ser modificada para realizar uma mutação genética nos genes que codificam proteínas endógenas para o hospedeiro, com exemplos desses hospedeiros incluindo *E. coli*

W3110 estirpe 1A2, que possui o genótipo completo tonA; *E. coli* W3110 estirpe 9E4, que possui o genótipo completo tonA ptr3; *E. coli* W3110 estirpe 27C7 (ATCC 55,244), que possui o genótipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan.sup.r; *E. coli* W3110 estirpe 37D6, que possui o genótipo completo tona ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan.sup.r; *E. coli* W3110 estirpe 40B4, que é a estirpe 37D6 com uma mutação de deleção degP de resistência a antibióticos não canamicina; e uma estirpe de *E. coli* que possui a protease periplásmica mutante divulgada na Pat. U.S. Pat. N° 4946783 publicado a 7 de Agosto de 1990. As estirpes de *E. coli* MG1655, MG1655 Δ fimA-H ou MKS12, a *fliD*- e a estirpe com deleção de -fimA-H- MG1655 são também candidatos interessantes para a produção de flagelinas recombinantes como proteínas secretadas (*Nat Biotechnol.* 2005; (4):475-81). Alternativamente, são adequados métodos de clonagem *in vitro*, e. g., PCR ou outras reacções de polimerase de ácidos nucleicos.

Além dos procariotas, os micróbios eucarióticos tais como fungos filamentosos ou leveduras, são hospedeiros de clonagem ou de expressão adequados para os vectores que codificam o péptido derivado de flagelina.

Saccharomyces cerevisiae é um microrganismo hospedeiro eucariótico inferior de utilização muito comum. Outros incluem *Schizosaccharomyces pombe* (Beach e Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; documento EP 139383 publicado em 2 de Maio de 1985); hospedeiros de *Kluyveromyces* (Pat. U.S. N° 4943529; Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)) tais como, e. g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii*

(ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183 070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tais como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394538 publicado a 31 de Out. 1990); e fungos filamentosos tais como, e. g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolytocladium* (documento WO 91/00357 publicado a 10 de Jan. de 1991) e hospedeiros de *Aspergillus*, tal como *A. nidulans* (Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilbum et al., *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) e *A. niger* (Kelly e Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]). As leveduras metilotrópicas são aqui adequadas e incluem, mas não estão limitadas a, leveduras capazes de crescer em metanol seleccionado a partir dos géneros que consistem em *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Rhodotorula*. Uma lista de espécies específicas que são exemplares desta classe de leveduras pode ser encontrada em C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

Células hospedeiras adequadas para a expressão dos ácidos nucleicos que codificam o péptido derivado da flagelina de interesse são derivados de organismos multicelulares. Exemplos de células invertebradas incluem células de insectos, tais como *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9, assim como células vegetais. Exemplos de linhas de células hospedeiras de mamíferos úteis incluem células de ovário de hamster chinês (CHO) e células COS. Exemplos mais específicos incluem a linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim

embrionária humana (células 293 ou 293 subclonadas para o crescimento em cultura de suspensão, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de murganho (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células do pulmão humanas (W138, ATCC CCL 75); células do fígado humanas (Hep G2, HB 8065); e tumor mamário humano (MMT 060562, ATCC CCL51). A selecção da célula hospedeira apropriada é considerada como estando dentro do especialista na técnica.

Métodos gerais para a purificação do péptido derivado da flagelina de interesse

As formas de péptido derivado da flagelina de interesse podem ser recuperadas do meio de cultura ou a partir de lisados das células hospedeiras.

Se ligado à membrana, pode ser libertado da membrana utilizando uma solução de detergente adequado (e. g., TRITON-- X.TM. 100) ou por clivagem enzimática.

As células empregues na expressão do ácido nucleico que codificam o péptido derivado da flagelina de interesse podem ser rebentadas através de vários meios físicos ou químicos, tais como ciclos de congelação-descongelação, sonicação, rebentamento mecânico, ou agentes de lise celular.

Pode ser desejável purificar o polipéptido de interesse a partir de proteínas ou polipéptidos da célula recombinante. Os seguintes processos são exemplares de processos de purificação

adequados: através de fraccionamento numa coluna de permuta iónica; precipitação em etanol; HPLC de fase reversa; cromatografia em sílica ou numa resina de permuta catiónica tal como DEAE; focagem cromatográfica; SDS-PAGE; precipitação com sulfato de amónia; filtração em gel utilizando, por exemplo, colunas de Sephadex G-75; de Proteína A Sepharose para remover contaminantes, tal como IgG; e colunas de quelante metálico para ligar formas marcadas no epitopo do péptido derivado da flagelina de interesse.

Podem ser empregues vários métodos de purificação de proteína e esses métodos são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (Springer-Verlag: Nova Iorque, 1982). Os passo(s) de purificação seleccionado(s) irão depender, por exemplo, da natureza do processo de produção utilizado e do péptido derivado da flagelina particular produzido.

Numa forma de realização preferida, o péptido derivado da flagelina é purificado a partir do sobrenadante de *S. Typhimurium* SIN41 recombinante (*fliC fljB*), como divulgado nos Exemplos.

Em particular, foram cultivadas *Salmonella* em meio Luria-Bertani (LB) durante 6-18 horas, a 37 °C, com agitação. O sobrenadante foi filtrado e saturado com 60% de sulfato de amónio (Sigma Aldrich, USA). Os materiais precipitados foram recuperados por centrifugação, solubilização em Tris/HCl a 20 mM pH 7,5 e depois diálise. As proteínas foram ainda purificadas através de rondas sucessivas de hidroxapatite, permuta aniónica, e cromatografia de exclusão de tamanho (Bio-Rad

Laboratories, USA; GE Healthcare, Suécia). Por último, as proteínas foram esgotadas de lipopolissacáridos (LPS) utilizando uma coluna de polimixina B (Pierce, USA). Utilizando o ensaio de Limulus (Associates of Cape Cod Inc., USA), a concentração de LPS residual foi determinada como sendo inferior a 30 pg LPS por µg de flagelina recombinante.

Purificação do péptido derivado da flagelina de interesse por cromatografia de imunoafinidade

Noutras formas de realização, um péptido derivado da flagelina, de acordo com a invenção, pode ser purificado por separação num substrato de cromatografia de imunoafinidade.

O referido substrato de cromatografia de imunoafinidade compreende anticorpos anti-flagelina que foram aí imobilizados. Por anticorpos "anti-flagelina", pretende-se aqui que os anticorpos que se ligam a uma flagelina nativa ou a uma flagelina com deleção da região hipervariável, incluindo aqueles abrangidos pela presente invenção.

De um modo preferido, os anticorpos anti-flagelina consistem em anticorpos monoclonais, incluindo anticorpos anti-flagelina de murganho.

Foi demonstrado, de acordo com a invenção, que os anticorpos anti-flagelina que foram obtidos por um método compreendendo um passo de imunizar murganhos com a flagelina FliC_{Δ174-400} com deleção da região hipervariável que é divulgada noutra local nesta descrição, reconhecem a flagelina nativa e qualquer uma

das flagelinas com uma região hipervariável eliminada que são aqui divulgados.

Assim, em certas formas de realização preferidas de um substrato de cromatografia de imunoafinidade, o referido substrato compreende anticorpos monoclonais de murganho dirigidos contra FliC_{Δ174-400}.

O referido substrato de cromatografia de afinidade preferido pode ser preparado como se segue

- As ascites de murganho contendo anticorpos monoclonais anti-FliC_{Δ174-400} foram purificadas em colunas Econo-Pac proteína A (N° 732-2022 Affi-gel; Bio-Rad).
- Os anticorpos monoclonais anti-FliC_{Δ174-400} purificados resultantes (que podem ser também denominados "B23C5") foram acoplados covalentemente através de grupos amino primários a uma coluna de N-hidroxissuccinimida-activada Sepharose™ de elevado desempenho (N° 17-0716-01 Hitrap NHS activated HP de GE Healthcare), dando origem à coluna de afinidade específica para a flagelina. O rendimento da acoplagem foi de 98%.

Como apresentado nos exemplos aqui referidos, a coluna de afinidade específica para a flagelina acima permite uma separação altamente específica da flagelina nativa e assim também de qualquer uma das flagelinas com a região hipervariável eliminada que são aqui divulgadas, dos outros constituintes proteicos ou não proteicos contidos na amostra de partida.

Um método para purificar a flagelina ou qualquer uma das flagelinas com uma região hipervariável eliminada que são aqui reveladas é descrito abaixo:

- Sobrenadantes contendo flagelina da cultura de *S. Typhimurium* SIN41 recombinante ou *E. coli* foram centrifugados, filtrados através de uma membrana de 0,22 μm , diluídos um para um com tampão de ligação (75 mM Tris-HCl pH8) e aplicado a uma coluna de afinidade específica para a flagelina descrita acima.
- Depois, a coluna de afinidade específica para a flagelina foi lavada com 15-20 CV (volume da coluna) do tampão de ligação.
- Depois, as proteínas foram eluídas com 3 CV de tampão de eluição (100 mM de glicina-HCl, 0,5 M de NaCl, pH 2,7) e as fracções foram imediatamente neutralizadas com 500 μL de Tris 1,5 M pH 8,9 para evitar a exposição prolongada a pH ácido.
- Depois, a coluna foi regenerada com 10 CV de tampão de ligação e armazenada, a 4 °C, com 0,02% de azida de sódio.

Um perfil de cromatografia típico é ilustrado na Figura 13, que apresenta (i) a curva de absorvência (O.D.) a 280 nm (linha com caixas quadradas a cheio) e (ii) a curva de condutividade eléctrica. Os números com setas na Figura 13 correspondem aos períodos de tempo em que as fracções do líquido fluem da coluna foram recolhidos sucessivamente à luz de outras análises do seu conteúdo em flagelina (ver Figura 14 e o parágrafo abaixo). As fracções recolhidos numeradas consistem em, respectivamente:

- n° 1- 5 µL da amostra antes de aplicar (3 µg)= quantidade total colocada =900 µg
- n° 2- 20 µL da amostra aplicada após corrida na coluna
- n° 3- 20 µL da lavagem da coluna
- n° 4 - 20 µL da lavagem da coluna
- n° 5, 6 & 7- 20 µL de cada uma das respectivas fracções após tampão de eluição: quantidade total = 900 µg
- n° 8 - 20 µL de reequilíbrio da coluna

A Figura 14 apresenta a fotografia de um ensaio de transferência de Western que foi realizada utilizando as fracções 1 até 8 referidas na Figura 13 como o material de partida respectivo.

2. Síntese química

Em certas formas de realização, um péptido da invenção pode ser sintetizado através de técnicas convencionais da síntese de péptidos químicos.

Por exemplo, a sequência peptídica derivada de flagelina de interesse pode ser produzida através da síntese do péptido directo utilizando técnicas de fase sólida, como aquelas descritas por Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis (W.H. Freeman Co.: San Francisco, Calif., (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154 (1963); Fields GB, Noble RL; 1990; *Int. J. Pept. Protein Res.*; Vol. 35 : 161-214).

A síntese de proteínas *in vitro* pode ser realizada utilizando técnicas manuais ou por automação. A síntese automatizada pode ser realizada, por exemplo, com um

Sintetizador de Péptidos da Applied Biosystems (Foster City, Calif.) utilizando as instruções do fabricante.

Várias porções do péptido de interesse podem ser sintetizados quimicamente separadamente e combinadas utilizando métodos químicos ou enzimáticos para produzir o péptido de interesse de comprimento total.

Composições compreendendo um péptido da invenção derivado da flagelina

Um outro objectivo da invenção consiste numa composição, em particular uma composição farmacêutica, compreendendo um composto adjuvante como definido na presente descrição, em combinação, nomeadamente, com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

A presente invenção também pertence a uma composição imunogénica compreendendo um composto imunoadjuvante como definido na presente descrição, juntamente com um ou mais antigénios.

Uma "composição imunogénica", assim que foi administrada a um indivíduo ou um animal, induz uma resposta imunitária protectora contra o referido um ou mais antigénio(s) que está (estão) aqui compreendidos.

A presente invenção também se refere a uma composição de vacina compreendendo um composto imunoadjuvante como definido na presente descrição, juntamente com um ou mais antigénios.

Como aqui utilizado, uma composição de vacina, uma vez administrada ao indivíduo ou ao animal, induz uma resposta imunitária protectora contra, por exemplo, um microrganismo, ou para proteger eficazmente o indivíduo ou o animal contra infecção.

Uma composição de vacina é útil para a prevenção ou melhoramento de um estado patológico que irá responder favoravelmente à modulação da resposta imunitária.

Imunoadjuvante

Como acima mencionado, o termo “imunoadjuvante” quando utilizado em referência a uma composição imunogénica ou vacina, pretende significar uma substância que actua de um modo geral para acelerar, prolongar ou aumentar a qualidade de respostas imunitárias específicas para um antigénio.

O imunoadjuvante pode também reduzir vantajosamente o número de imunizações ou a quantidade de antigénio necessária para imunização para protecção.

Antigénio

Pode ser utilizada uma variedade de substâncias como antigénios num composto ou formulação, de tipo imunogénico ou vacina. Por exemplo, podem ser utilizados agentes patogénicos virais e bacterianos atenuados e inactivados, macromoléculas purificadas, polissacáridos, toxóides, antigénios recombinantes, organismos contendo um gene estranho de um agente patogénico,

péptidos sintéticos, ácidos polinucleicos, anticorpos e células tumorais para preparar (i) uma composição imunogénica útil para induzir uma resposta imunitária num indivíduo ou (ii) uma vacina útil para tratar uma condição patológica.

Portanto, um péptido da invenção derivado da flagelina pode ser combinado com uma vasta variedade de antigénios para produzir uma composição imunogénica ou uma vacina útil para induzir uma resposta imunitária num indivíduo.

Os especialistas na técnica serão capazes de seleccionar um antigénio apropriado para tratar uma condição patológica particular e saberão como determinar se um antigénio bruto ou isolado é favorecido numa formulação de vacina particular.

Os especialistas na técnica serão também capazes de determinar se é preferível ligar covalentemente ou ligar não covalentemente, o imunoadjuvante da invenção ao referido um ou mais antigénios.

Os presentes testes *in vivo* demonstraram que a actividade de adjuvante de mucosa não necessita de qualquer ligação entre o péptido derivado da flagelina de interesse e o antigénio alvo, quando administrados juntamente pela via da mucosa e na via intranasal particular.

Pode ser preparado um antigénio isolado utilizando uma variedade de métodos bem conhecidos na técnica. Um gene que codifica qualquer polipéptido imunogénico pode ser isolado e clonado, por exemplo, em células bacterianas, de leveduras, de insectos, de répteis ou de mamíferos utilizando métodos recombinantes bem conhecidos na técnica e descritos, por

exemplo, em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1992) e em Ansubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1998). Um número de genes que codificam antigénios de superfície de agentes patogénicos virais, bacterianos e protozoários foram clonados com sucesso, expressos e utilizados como antigénios para o desenvolvimento de vacina. Por exemplo, o principal antigénio de superfície do vírus da hepatite B, HbsAg, a subunidade P da toxina da cólera, a enterotoxina de *E. coli*, a proteína de circunsporozoíto do parasita da malária e um antigénio de membrana da glicoproteína do vírus Epstein-Barr, assim como antigénios de célula tumoral, foram expressos em vários sistemas de vector/hospedeiro bem conhecidos, purificados e utilizados nas vacinas.

Um péptido da invenção derivado da flagelina induz uma resposta imunitária inata através do sistema de mucosa mediado por TLR5 que pode aumentar beneficemente uma resposta imunitária a um antigénio recombinante.

Uma célula patologicamente aberrante para ser utilizada numa vacina pode ser obtida a partir de qualquer fonte tal como um ou mais indivíduos que possuem uma condição patológica ou células cultivadas *ex vivo* ou *in vitro* obtidas de um ou mais desses indivíduos, incluindo um indivíduo específico a ser tratado com a vacina resultante.

Moléculas imunomoduladoras

Também pode ser utilizada uma variedade de moléculas imunomoduladoras em combinação com o péptido da invenção

derivado da flagelina, para alterar uma resposta imunitária num indivíduo. O tipo de alteração desejada irá determinar o tipo de molécula imunomoduladora seleccionada para ser combinada com o referido péptido da invenção derivado da flagelina.

Por exemplo, para aumentar a resposta imunitária inata, o péptido da invenção derivado da flagelina pode ser combinado com outra molécula imunomoduladora que promove uma resposta imunitária inata, tal como outra região PAMP ou conservada conhecida ou suspeita de induzir uma resposta imunitária inata. São conhecidas uma variedade de PAMP para estimular as actividades de diferentes membros da família de receptores de tipo toll.

Esses PAMP podem ser combinados para estimular uma combinação particular de receptores de tipo toll que induzem um perfil de citocina benéfico. Por exemplo, podem ser combinados PAMP para estimular um perfil de citocina que induz uma resposta imunitária Th1 ou Th2.

Podem ser combinados outros tipos de moléculas imunomoduladoras que promovem respostas imunitárias humorais ou mediadas por células com um péptido da invenção derivado da flagelina. Por exemplo, as citocinas podem ser administradas para alterar o equilíbrio das respostas imunitárias Th1 e Th2. Os especialistas na técnica saberão como determinar as citocinas apropriadas úteis para obter uma alteração benéfica na resposta imunitária para uma condição patológica particular.

Administração do péptido da invenção derivado da flagelina

O péptido da invenção derivado da flagelina será administrado numa "quantidade imunogénica" com uma ou mais moléculas, que pretendem significar uma quantidade, tal como um antigénio ou outra molécula imunomoduladora, necessária para despoletar uma resposta imunitária.

A dosagem do péptido da invenção derivado da flagelina, independentemente ou em combinação com uma ou mais moléculas, irão depender, por exemplo, da condição patológica a ser tratada, o peso e a condição das terapias individuais e anteriores ou simultâneas. A quantidade apropriada considerada para ser uma dose imunogénica para uma aplicação particular do método pode ser determinado pelos especialistas na técnica. Os especialistas na técnica irão entender que a condição do doente necessita de ser monitorizada através do curso da terapia e que a quantidade da composição que é administrada pode ser ajustada de acordo com a resposta do doente à terapia.

Como uma vacina imunoadjuvante, o péptido derivado de flagelinas da invenção pode contribuir para a eficácia da vacina através de, por exemplo, aumentando a imunogenicidade de antigénios mais fracos, tais como antigénios altamente purificados ou recombinantes, reduzindo a quantidade do antigénio necessário para uma resposta imunitária, reduzindo a frequência de imunização necessária para proporcionar imunidade protectora, melhorar a eficácia de vacinas em indivíduos com respostas imunitárias reduzidas ou enfraquecidas, tais como recém-nascidos, idosos e indivíduos imunocomprometidos, e aumentar a imunidade a um tecido alvo, tal como imunidade da

mucosa ou promover a imunidade humoral ou mediada por células ou induzindo um perfil de citocina particular.

O péptido da invenção derivado da flagelina induz uma resposta imunitária inata através da activação do sistema TLR5, em particular, aqui, a resposta da mucosa mediada por TLR5 quando administrada pela via mucosa.

Em particular, os testes *in vivo* demonstram que o péptido da invenção derivado da flagelina apresenta actividade de adjuvante de mucosa, que permite potenciar as respostas sistémicas e da mucosa contra um antigénio alvo.

A resposta imunitária inata aumenta a resposta imunitária a um antigénio estimulando a resposta imunitária adaptativa. Portanto, uma combinação do péptido da invenção derivado da flagelina, com um ou mais antigénios, proporciona uma composição imunogénica eficaz ou vacina para induzir uma resposta imunitária num indivíduo.

Uma combinação de um antigénio e/ou molécula imunomoduladora, com um péptido da invenção derivado da flagelina, pode ser testada numa variedade de estudos toxicológicos pré-clínicos e de segurança bem conhecidos na técnica.

Por exemplo, essa combinação pode ser avaliada num modelo animal no qual se verificou que o antigénio é imunogénico e que pode ser imunizados de modo reprodutível pela mesma via proposta para testes clínicos em humanos.

Uma combinação de um antigénio e/ou molécula imunomoduladora, com um péptido da invenção derivado da flagelina, pode ser testada, por exemplo, através de uma abordagem apresentada pelo Center for Biologics Evaluation and Research/Food and Drug Administration e National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Goldenthal, KL *et al.*, *AID Res Hum Retroviruses*, 9: S45-9 (1993)).

Os especialistas na técnica saberão como determinar para uma combinação particular de antigénio e/ou molécula imunomoduladora, com péptido da invenção derivado da flagelina, a carga de antigénio apropriada, a via de imunização, volume de dose, pureza do antigénio e regime de vacinação útil para tratar uma condição patológica particular numa espécie animal particular.

Uma composição imunogénica ou uma vacina da invenção, para induzir uma resposta imunitária, pode ser administrada a uma solução ou suspensão juntamente com um meio farmacêuticamente aceitável.

Esse meio farmacêuticamente aceitável pode ser, por exemplo, água, soro fisiológico tamponado com fosfato, solução fisiológica normal ou outro soro fisiológico tamponado fisiologicamente, ou outro solvente ou veículo, tais como glicol, glicerol e óleo, tal como azeite, ou um éster orgânico injectável. Um meio farmacêuticamente aceitável também podem conter lipossomas ou micelas, e pode conter complexos imunoestimuladores preparados misturando os antigénios para o polipéptido ou péptido com detergente e um glicósido, tal como Quil A.

Outros métodos para preparar e administrar um péptido da invenção derivado da flagelina num meio farmacologicamente aceitável são apresentados abaixo, em referência aos compostos que induzem uma resposta da mucosa mediada por TLR5.

A composição imunogénica ou vacina da invenção pode ser administrada por uma variedade de vias para estimular uma resposta imunitária. Por exemplo, estas moléculas imunomoduladoras podem ser distribuídas subcutaneamente, intradermicamente, intralinfaticamente, intramuscularmente, intratumoralmente, intravesicularmente, intraperitonealmente e intracerebralmente.

Os especialistas na técnica saberão como seleccionar vias de distribuição apropriadas para formulações particulares do péptido derivado de flagelinas da invenção.

Numa forma de realização preferida da invenção, os métodos de vacinação para tratar ou prevenir a infecção num mamífero compreende a utilização da vacina da invenção para ser administrada por particularmente uma superfície da mucosa (e.g., ocular, intranasal, oral, gástrica, pulmonar, intestinal, rectal, vaginal ou tracto urinário).

As vias de distribuição nasal podem ser úteis para induzir respostas imunitárias de mucosa e sistémicas. São possíveis vários dispositivos para distribuição conveniente e eficaz das formulações à cavidade nasal e aos tecidos pulmonares.

A via de distribuição nasal pode ser particularmente interessante neste caso uma vez que o péptido da invenção derivado da flagelina apresenta uma actividade de adjuvante

significativa no compartimento da mucosa, sem ter qualquer efeito colateral pró-inflamatório sistémico significativo.

Num protocolo de vacinação, a vacina pode ser vantajosamente administrada através da via da mucosa, como uma dose única ou, de um modo preferido, várias vezes *e. g.*, duas, três ou quatro vezes por semana ou a intervalos mensais, de acordo com um modo de iniciação/reforço. A dosagem apropriada depende de vários parâmetros.

O protocolo de vacinação pode ser um protocolo da mucosa restricto ou um protocolo misto, no qual a dose de iniciação da vacina é administrada pela mucosa *e. g.*, por via intranasal e a dose de reforço(s) é (são) parentericamente administrado(s) ou vice-versa.

Formulação

Métodos de preparação de formulações ou composições farmacêuticas incluem o passo de colocar o(s) ingrediente(s) activo(s) em associação com o veículo e, opcionalmente, um ou mais ingredientes acessórios.

Em geral, as formulações são preparadas colocando uniformemente e intimamente o(s) ingrediente(s) activo(s) em associação com veículos líquidos ou veículos sólidos divididos finamente, ou ambos e, depois, se necessário, moldar o produto.

Formas de dosagem líquida para administração oral dos ingredientes activos incluem emulsões, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires farmacêuticamente aceitáveis.

Adicionalmente ao(s) ingrediente(s) activo(s), as formas de dosagem líquida podem conter diluentes inertes normalmente utilizados na técnica, tais como, por exemplo, água ou outros solventes, agentes solubilizantes e emulsificadores, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, álcool benzílico, benzoato de benzilo, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, óleos (em particular, óleo de semente de algodão, amendoim, milho, gérmen, azeite, rícino e sésamo), glicerol, álcool tetra-hidrofurílico, polietilenoglicóis e ésteres de ácido gordo de sorbitano e suas misturas.

Além de diluentes inertes, as composições orais podem também incluir adjuvantes, tais como agentes humidificantes, agentes emulsificantes e de suspensão, agentes adoçantes, aromatizantes, corantes, perfumantes e conservantes.

Suspensões, adicionalmente ao(s) ingrediente(s) activo(s), podem conter agentes de suspensão como, por exemplo, álcoois de isoestearilo etoxilados, polioxietileno sorbitol e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, meta-hidróxido de alumínio, bentonite, agar-agar e tragacanto e suas misturas.

As formulações das composições farmacêuticas da invenção para administração rectal ou vaginal podem ser apresentadas como um supositório, que pode estar preparado misturando o(s) ingrediente(s) activo(s) com um ou mais excipientes ou veículos não irritantes adequados compreendendo, por exemplo, manteiga de cacau, polietilenoglicol, uma cera de supositório ou salicilato e que é sólido à temperatura ambiente, mas líquido à temperatura corporal e, portanto, irá derreter no recto ou na cavidade vaginal e libertar o(s) ingrediente(s) activo(s). As formulações

da presente invenção que são adequadas para administração vaginal também incluem pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações em spray contendo esses veículos são conhecidos na técnica como sendo apropriados.

As composições farmacêuticas desta invenção adequadas para a administração parentérica compreendem o(s) ingrediente(s) activo(s) em combinação com uma ou mais soluções aquosas ou não aquosas isotónicas estéreis farmacêuticamente aceitáveis, dispersões, suspensões ou emulsões, ou pós estéreis que podem ser reconstituídos em soluções ou dispersões estéreis injectáveis ou imediatamente antes de utilizar, que podem conter antioxidantes, tampões, solutos que se tornam na formulação isotónica com o sangue dos agentes pretendidos recipientes ou de suspensão ou de espessamento.

Exemplos de veículos aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregues nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol e semelhantes) e as suas misturas adequadas, óleos vegetais, tais como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis, tais como oleato de etilo. Pode ser mantida uma fluidez apropriada, por exemplo, através da utilização de materiais de revestimento, tais como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões e através da utilização de agentes tensioactivos.

Estas composições também podem conter adjuvantes, tais como agentes humidificantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. Também pode ser desejável incluir agentes isotónicos, tais como açúcar, cloreto de sódio e semelhantes nas composições. Adicionalmente, a absorção prolongada da forma

farmacêutica injectável pode ser alcançada pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tal como monoestearato de alumínio e gelatina.

As formas de depósito injectáveis são realizadas formando matrizes microencapsuladas do(s) ingrediente(s) activo(s) em polímeros biodegradáveis, tais como polilactídeo-poliglicólido. Dependendo da proporção do(s) ingrediente(s) activo(s) para o polímero, e a natureza do polímero particular empregue, a taxa de libertação do(s) ingrediente(s) activo(s) pode ser controlada. Exemplos de outros polímeros biodegradáveis incluem poli(ortoésteres) e poli(anidridos). Também são preparadas formulações injectáveis de depósito encapsulando o(s) ingrediente(s) activo(s) em lipossomas ou em microemulsões que são compatíveis com o tecido corporal. Os materiais injectáveis podem ser esterilizados, por exemplo, por filtração através de um filtro de retenção de bactérias.

As formulações podem ser apresentadas em recipientes selados de dose unitária ou multi-dose, por exemplo, ampolas e frascos, e podem ser armazenados num estado liofilizado requerendo apenas a adição do veículo líquido estéril, por exemplo, água para injeção, imediatamente antes da utilização. As soluções e suspensões de injeção extemporânea podem ser preparadas a partir de pós estéreis, grânulos e comprimidos do tipo descrito acima.

A quantidade de antigénio e composto imunoadjuvante na composição de vacina de acordo com a invenção, as dosagens administradas, são determinadas através de técnicas bem conhecidas dos especialistas na técnica farmacêutica, tomando em consideração esses factores como o antigénio particular, a

idade, sexo, peso, espécie e estado do animal ou doente particular, e a via de administração.

Numa forma de realização preferida, a composição de vacina de acordo com a invenção, compreende ainda um ou mais componentes seleccionados do grupo que consiste em agentes tensioactivos, promotores de absorção, polímeros de absorção de água, substâncias que inibem a degradação enzimática, álcoois, solventes orgânicos, óleos, agentes de controlo de pH, conservantes, agentes de controlo de pressão osmótica, propulsores, água e suas mistura.

A composição de vacina, de acordo com a invenção, pode ainda compreender um veículo farmacêuticamente aceitável. A quantidade do veículo irá depender das quantidades seleccionadas para os outros ingredientes, a concentração desejada do antigénio, a selecção da via de administração, oral ou parentérica, etc. O veículo pode ser adicionado à vacina em qualquer momento conveniente. No caso de uma vacina liofilizada, o veículo pode, por exemplo, ser adicionado imediatamente antes da administração. Alternativamente, o produto final pode ser fabricado com o veículo.

Exemplos de veículos apropriados incluem, mas não estão limitados a, água estéril, soro fisiológico, tampões, soro fisiológico tamponado com fosfato, cloreto de sódio tamponado, óleos vegetais, Meio Mínimo Essencial (MEM), MEM com tampão HEPES, etc.

Opcionalmente, a composição de vacina da invenção pode conter adjuvantes convencionais, secundários, em quantidades variáveis dependendo do adjuvante e do resultado desejado. A

quantidade habitual varia desde cerca de 0,02% até cerca de 20% em peso, dependendo dos outros ingredientes e do efeito desejado.

Exemplos de adjuvantes secundários adequados incluem, mas não estão limitados a, estabilizadores; emulsificadores; hidróxido de alumínio; fosfato de alumínio; ajustadores de pH tais como hidróxido de sódio, ácido clorídrico, etc.; tensioactivos, tais como Tween.RTM. 80 (polisorbato 80, disponível comercialmente de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.); lipossomas; adjuvante iscom; glicopéptidos sintéticos, tais como dipéptidos de muramilo; extensores, tais como dextrano ou combinações de dextrano, por exemplo, com fosfato de alumínio; carboxipolimetileno; paredes celulares bacterianas, tais como extracto de parede celular de micobactérias; seus derivados, tais como *Corynebacterium parvum*; *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis*, por exemplo, Calmette Guerin de Bovino (BCG); proteínas de vaccinia ou de vírus da varíola animal; os adjuvantes de partícula subviral, tais como orbivírus; toxina da cólera; N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina (piridina); monofosforil lípido A; brometo de dimetildioctadecilamónio (DDA, comercialmente disponível em Kodak, Rochester, N.I.); sintéticos e suas misturas. Desejavelmente, o hidróxido de alumínio é misturado com outros adjuvantes secundários ou um imunoadjuvante, tal como Quil A.

Exemplos de estabilizadores adequados incluem, mas não estão limitados a, sacarose, gelatina, peptona, extractos de proteína digerida, tais como NZ-Amina ou NZ-Amina AS. Exemplos de emulsificadores incluem, mas não estão limitados a, óleo mineral, óleo vegetal, óleo de amendoim e outros óleos

convencionais, metabolizáveis, não tóxicos úteis para composições de vacinas injectáveis ou intranasais.

Para o objectivo desta invenção, estes adjuvantes são aqui identificados como "secundários", meramente para contrastar com o composto imunoadjuvante acima descrito, consistindo num activador de Rho GTPase, que é um ingrediente essencial na composição de vacina para o seu efeito em combinação com uma substância antigénica para aumentar significativamente a resposta imunitária humoral a uma substância antigénica. Os adjuvantes secundários são principalmente incluídos na formulação de vacina como auxiliares de processamento, embora certos adjuvantes possuam propriedades que aumentam imunologicamente até certo ponto e têm um duplo objectivo.

Podem ser adicionados conservantes convencionais à composição de vacina em quantidades eficazes que variam desde cerca de 0,0001% até cerca de 0,1% em peso. Dependendo do conservante empregue na formulação, quantidades abaixo ou acima deste intervalo podem ser úteis. Conservantes típicos incluem, por exemplo, sorbato de potássio, metabissulfito de sódio, fenol, metil parabeno, propil parabeno, timerosal, etc.

A escolha de uma composição de vacina inactivada, modificada ou de outro tipo e o método de preparação da formulação de composição de vacina melhorada da presente invenção são conhecidas ou rapidamente determinadas pelos especialistas na técnica.

Uma quantidade farmacologicamente eficaz do composto imunoadjuvante, de acordo com a invenção, pode ser administrada, por exemplo oralmente, parentericamente ou de outra forma, e de

preferência pela via da mucosa, simultaneamente com, sequencialmente a ou pouco tempo após a administração de uma substância antigénica de modo a potenciar, acelerar ou estender a imunogenicidade do antigénio.

Embora a dosagem da composição de vacina dependa nomeadamente do antigénio, espécies do hospedeiro vacinado ou para ser vacinado, etc., a dosagem de uma quantidade farmacologicamente eficaz da composição de vacina estará normalmente no intervalo entre cerca de 0,01 µg a cerca de 500 µg (e em particular 50 µg a cerca de 500 µg) do composto imunoadjuvante da invenção por dose (baseado nomeadamente nos resultados apresentados na figura 6).

Embora a quantidade da substância antigénica particular na combinação influencie a quantidade do composto imunoadjuvante de acordo com a invenção, necessária para melhorar a resposta imunitária, é contemplado que o profissional de saúde possa facilmente ajustar a quantidade eficaz de dosagem do composto imunoadjuvante através de testes de rotina para satisfazer as circunstâncias particulares.

Como uma regra geral, a composição de vacina da presente invenção é convenientemente administrada oralmente, parentericamente (subcutaneamente, intramuscularmente, intravenosamente, intradermicamente ou intraperitonealmente), intrabucalmente, intranasalmente ou transdermicamente. A via de administração contemplada pela presente invenção dependerá da substância antigénica e os co-formulantes. Por exemplo, se a composição de vacina contém saponinas, embora não tóxicas oralmente ou intranasalmente, deve ter-se cuidado para não injectar os glicósidos de sapogenina na corrente sanguínea uma

vez que funcionam como hemolíticos fortes. Também, muitos antigénios não serão eficazes se tomados oralmente. De um modo preferido, a composição de vacina é administrada subcutaneamente, intramuscularmente ou intranasalmente.

A dosagem da composição de vacina será dependente, nomeadamente, do antigénio seleccionado, da via de administração, espécie e outros factores convencionais. É contemplado que uma pessoa com experiência normal na técnica pode, fácil e prontamente, titular a dosagem apropriada para uma resposta imunogénica para cada antigénio para conseguir a quantidade de imunização eficaz e o método de administração.

Como já especificado alguns na presente descrição, um outro objectivo da invenção é uma composição de vacina de acordo com a invenção, para administração a uma superfície de mucosa.

Este modo de administração apresenta um grande interesse. De facto, as membranas mucosas contêm numerosas células dendríticas e células de Langerhans, que são excelentes células de detecção de antigénio e de apresentação de antigénio. As membranas mucosas estão também ligadas a órgãos linfóides, denominados tecido linfoide associado a mucosas, que são capazes de transmitir uma resposta imunitária a outras áreas das mucosas. Um exemplo de um tal epitélio é a membrana epitelial nasal, que consiste praticamente numa única camada de células epiteliais (epitélio pseudoestratificado) e a membrana mucosa do tracto respiratório superior está ligada aos dois tecidos linfóides, aos adenóides e às amígdalas. A extensa rede de capilares sanguíneos sob a mucosa nasal de elevada densidade de células B e T, são particularmente adequadas para proporcionar um rápido

reconhecimento do antigénio e proporcionar uma rápida resposta imunológica.

De um modo preferido, a superfície da mucosa é seleccionada do grupo consistindo nas superfícies das mucosas do nariz, pulmões, boca, olho, ouvido, tracto gastrointestinal, tracto genital, vagina, recto e da pele.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Efeito imunoadjuvante de flagelinas com a região hipervariável eliminada

Materiais e métodos

Produção de flagelinas recombinantes.

As flagelinas recombinantes têm origem na flagelina FliC de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ATCC14028 (número de acesso AAL20871).

As flagelinas FliC e FliC_{Δ205-293} foram isoladas a partir das estirpes de *S. Typhimurium* SIN22 (fljB) e SJW46, como descrito previamente (Yoshioka et al., 1995. Flagellar filament structure and cell motility of *Salmonella typhimurium* mutants lacking part of the outer domain of flagellin. *J. Bacteriol.* 177:1090-1093; Didierlaurent et al., 2004. Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Development of Th2-Type Response. *J. Immunol.* 172: 6922-6930; Sierra et al, 2001, Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 98:13722-13727) ou adquiridas a Alexis Biochemicals (Suíça).

As construções que codificam FliC_{Δ174-400} e FliC_{Δ191-352} foram produzidas por PCR num plasmídeo derivado de pBR322 portador do gene *fliC* do tipo selvagem SEQ ID N° 3, sob o controlo do seu próprio promotor e utilizando os seguintes pares de iniciadores: AGCACCattcagcgtatccagacc (SEQ ID N° 15)/GCTGGTgctacaaccaccgaaaac (SEQ ID N° 16) e TCGAGatatacctgtaaacagttgcagcc (SEQ ID N° 17)/ACTCGAGgacggtacatccaaaactgcac (SEQ ID N° 18) (bases que codificam um ligante estão em itálico).

A mutagénese dirigida ao sítio foi também efectuada no plasmídeo portador de FliC_{Δ174-400}, de modo a substituir os resíduos 89-96 (QRVRELAV) envolvidos na detecção de TLR5 pelas correspondentes sequências de uma flagelina sem sinal (DTVKVKAT); a proteína resultante foi, deste modo, FliC_{Δ174-400/89-96*}.

Em FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ191-352} e FliC_{Δ1741-400/89-96*}, a asparagina localizada a 6 resíduos da extremidade foi alterada para uma serina.

As flagelinas truncadas foram purificadas a partir do sobrenadante do recombinante *S. Typhimurium* SIN41 (*fliC fljB*), como se segue. A *Salmonella* foi cultivada em meio líquido Luria-Bertani (LB) durante 18 horas, a 37 °C, com agitação. O sobrenadante foi filtrado e saturado com 60% de sulfato de amónio (Sigma Aldrich, USA). Os materiais precipitados foram recuperados por centrifugação, solubilização em 20 mM de Tris/HCl pH 7,5 e depois diálise. As proteínas foram depois purificadas por sucessivas rondas de cromatografia em

hidroxiapatite e troca iónica (Bio-Rad Laboratories, USA). Por último, as proteínas foram separadas do lipopolissacárido (LPS) utilizando uma coluna de polimixina B (Pierce, USA). Utilizando o ensaio Limulus (Associates of Cape Cod Inc., USA), a concentração residual de LPS foi determinada como sendo inferior a 30 pg de LPS por µg de flagelina recombinante.

Quando especificado, as flagelinas foram tratadas durante 1 h, a 37 °C, com 0,017% de tripsina-EDTA (Invitrogen, USA) para hidrolisar totalmente as proteínas, seguidas por aquecimento a 70 °C durante 1 h para inactivar a tripsina. As proteínas foram analisadas utilizando SDS-PAGE convencional e imunotransferência com anticorpos policlonais específicos para FliC.

Experiências com animais.

Murganhos fêmea NMRI (6-8 semanas de idade) foram adquiridos a Charles River Laboratories (França) e mantidos numa unidade isenta de patogénicos específica num estabelecimento acreditado (N° A59107; Institut Pasteur de Lille). Todas as experiências cumpriram os regulamentos correntes nacionais e institucionais e directivas éticas.

Para hiperimunização, os animais foram injectados subcutaneamente (s.c.) com a flagelina FliC (1 µg por injeção) emulsificada em 200 µL de adjuvante completo de Freund (CFA)/PBS no dia 1 e adjuvante incompleto de Freund (IFA)/PBS nos dias 21, 35 e 49. No dia 63, foram dados aos murganhos 200 µL de flagelina/PBS i.v. e foram sacrificados 2 h mais tarde por injeção intraperitoneal (i.p.) de 5 mg de pentobarbital de

sódio (CEVA Santé Animale, França) para amostragem de soro e tecido e análise.

Para caracterizar a resposta inata da mucosa e propriedades do adjuvante, 20 µL de proteínas de PBS foram administradas intranasalmente (i.n.) a murganhos anestesiados i.p. com 1,5 mg de quetamina (Merial, França) e 0,3 mg de xilazina (Bayer, Alemanha) por 25 g de animal.

Para estudar as respostas pró-inflamatórias, os murganhos foram amostrados às 2 h (para ensaios de ARN e expressão genética) ou 6 h (para testar a produção de citocinas).

Para ensaios de imunização, os murganhos foram administrados i.n. com PBS ± ovalbumina sem LPS (OVA) (20 µg, Sigma, grau VII, USA) ± flagelinas (1 µg) nos dias 1 e 21. Lavagens broncoalveolares (BAL) e soro foram amostrados no dia 35.

Para avaliar a neutralização, os soros imunes e simulados foram aquecidos durante 30 min, a 56 °C, para inactivar o complemento. As diluições seriadas do soro (em 200 µL de PBS) foram passivamente transferidos para animais pela via i.v. 1 h antes da activação sistémica com flagelinas. Em algumas experiências, os soros foram misturados com flagelinas diluídas em PBS e administradas i.n. para testar a neutralização nas mucosas.

As BAL foram colhidas após a injeção intratraqueal de 1 mL de PBS com Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Suíça) e clarificadas por centrifugação.

As amostras de sangue foram colhidas e coaguladas à temperatura ambiente, com o soro a ser então separado por centrifugação.

Os extractos de proteína do pulmão foram preparados por homogeneização do tecido com 2 mL de T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce, USA) suplementado com inibidores de protease. Todas as amostras foram armazenadas, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, antes da análise.

Análise das respostas de anticorpo específicas para antigénio.

Os níveis de anticorpos específicos para OVA ou flagelina no soro e amostras BAL foram avaliadas utilizando ELISA.

Resumidamente, OVA (20 μg por poço em tampão fosfato 0,2 M a pH 6,5) e flagelina FliC (100 ng por poço em PBS) foram revestidas em microplacas MaxiSorp (Nalge Nunc Int., USA), durante a noite, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas as microplacas foram lavadas com PBS/Tween20 a 0,05% e depois bloqueadas com PBS/Leite em Pó a 1% durante 1 h à temperatura ambiente.

As diluições seriadas de amostras foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente antes do desenvolvimento. Anticorpos Biotinilados anti-IgG ou IgA de murganhos (Southern Biotechnology Associates, USA), estreptavidina conjugados com HRP (GE Healthcare, USA) e 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (Becton Dickinson Bioscience, USA) foram utilizados como reagentes de desenvolvimento. A reacção foi interrompida por adição de H_2SO_4 e a DO a 450 nm foi determinada.

O título de IgG foi definido como o recíproco da maior diluição de amostra que produz um valor de absorvência de 0,15 DO para OVA e 0,5 OD para FliC e foi sistematicamente em comparação com um soro de referência. Os títulos são dados como médias geométricas de títulos dos murganhos individuais.

Os níveis de IgA total e IgA específica para OVA em BAL foram medidos e normalizados utilizando uma curva de calibração com IgA comercial de murganho (Sigma). A proporção de IgA específica (expressa em ng de IgA específica para OVA por µg de IgA total) foi determinada para cada murganho.

ELISA específica para citocinas e expressão de genes.

Os níveis de CXCL2 e CCL20 de murganho e IL-8 humana (CXCL8) foram medidos em soro, BAL, pulmão total e/ou sobrenadante da cultura de células utilizando kits ELISA comerciais (R&D Systems, USA).

O ARN total de pulmões de murganho foi extraído com o Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel, Alemanha) e reversamente transcrito com o High-Capacity cADN Archive Kit (Applied Biosystems, USA). O ADNc resultante foi amplificado utilizando SYBR Green-based real-time PCR (Applied Biosystems).

Os iniciadores específicos são CGTCATCCATGGCGAACTG (SEQ ID N° 19)/GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT (SEQ ID N° 20) (ACTB, que codifica para a β-actina), TTTTGGGATGGAATTGGACAC (SEQ ID N° 21)/TGCAGGTGAAGCCTTCAACC (SEQ ID N° 22) (CCL20), e CCCTCAACGGAAGAACCAAA (SEQ ID N° 23)/CACATCAGGTACGATCCAGGC

(SEQ ID N° 24) (CXCL2). Os níveis relativos de ARNm ($2^{\Delta\Delta Ct}$) foram determinados por comparação de (a) os limiares dos ciclos de PCR (Ct) para o gene de interesse e ACTB (ΔCt) e (b) valores de ΔCt para grupos tratados e de controlo ($\Delta\Delta Ct$), como descrito previamente (Sierro *et al.*, 2001, Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13722-13727).

Ensaaios à base de células

A linha de células de adenocarcinoma do cólon humano Caco-2 foi estavelmente transfetada com o plasmídeo portador de um gene de luciferase sob o controlo do promotor humano *CCL20* (Rumbo *et al.*, 2004, Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterol.* 127:213-223), dando origem à linha Caco-Rumbo.

Estas células epiteliais intestinais foram cultivadas em Meio Eagle Modificado de Dulbecco suplementado com 10% de soro de vitela fetal, 10 mM de HEPES, aminoácidos não essenciais 1X, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL) e (para seleção de transgenes) 0,7 mg/mL G418 (Invitrogen).

A linha de células epiteliais brônquicas humanas BEAS-2B foi cultivada em meio nutriente F12 de Kaigh suplementado como para meio Caco-Rumbo mais 1 mM de piruvato de sódio e mistura de insulina-transferrina-selénio (Invitrogen).

As células foram estimuladas com flagelinas recombinantes durante 6 h para os ensaios de luciferase ou durante 16 h antes da recolha do sobrenadante para ELISA.

A actividade de luciferase em extractos de células foi medida utilizando o Bright Glo Luciferase Assay (Promega, USA). A luminescência relativa (RLU) foi normalizada como uma percentagem da actividade máxima com flagelina do tipo selvagem para o teste de activação com as flagelinas recombinantes. Para o teste de neutralização *in vitro*, a RLU foi normalizada como uma percentagem da actividade máxima para cada proteína: $[(RLU_{\text{tratados}}/RLU_{\text{não tratados}})/(RLU_{\text{max}}/RLU_{\text{não tratados}})] \times 100$.

Análise estatística.

As diferenças estatísticas foram analisadas utilizando o teste Mann-Whitney e foram consideradas como sendo significativas para valores de $p < 0,05$. A menos que especificado o contrário, os resultados são expressos como médias aritméticas \pm desvio padrão.

Resultados

Deleção da região hipervariável da flagelina impede a antigenicidade mas não modificou actividade estimuladora de TLR5

Duas novas moléculas de flagelina (FliC $_{\Delta 191-352}$ e FliC $_{\Delta 174-400}$, compostas respectivamente por 336 e 271 aminoácidos) foram construídas por deleção interna (Fig. 1A).

Como um controlo, utilizou-se a variante previamente caracterizada FliC $_{\Delta 204-292}$, que possui uma deleção parcial no domínio antigénico (Yoshioka et al., 1995, Flagellar filament structure and cell motility of *Salmonella typhimurium* mutants

lacking part of the outer domain flagellin. *J. Bacteriol.* 177:1090-1093) (Fig. 1A).

Como um controlo negativo para experiências *in vitro* e *in vivo*, mutações que impedem a sinalização de TLR5 foram introduzidas em FliC_{Δ174-400}, produzindo a proteína recombinante FliC_{Δ174-400/89-96*}.

As estruturas deduzidas das respectivas flagelinas indicaram que o motivo 89-96 e a estrutura geral das regiões conservadas foram inalteradas (Fig. 1A).

Com a excepção de FliC_{Δ204-292}, as variantes foram incapazes de complementar a mobilidade das bactérias deficientes em flagelina e foram segregadas no sobrenadante da cultura.

A seguir, avaliou-se a antigenicidade intrínseca das flagelinas recombinantes. Para este fim, concentrações saturantes de flagelinas foram colocadas como revestimento de microplacas e pesquisadas por ELISA, utilizando um soro hiperimunitário específico para FliC ou FliC_{Δ174-400}.

Como ilustrado na Fig. 1B, observou-se títulos de anticorpo 3 a 10 vezes inferiores quando o soro anti-FliC foi titulado contra as variantes FliC do que contra a FliC do tipo selvagem.

Em contraste, a reactividade do soro hiperimunitário específico para FliC_{Δ174-400} foi semelhante, qualquer que seja a flagelina alvo (Fig. 1C).

Estes resultados sugerem que a região hipervariável central é o alvo principal para anticorpos anti-flagelina.

Por último, pensou-se estabelecer se as moléculas recombinantes retinham ou não alguma actividade estimuladora de TLR5.

A análise de resposta a dose foi efectuada utilizando células repórter Caco-Rumbo e a linha de células epiteliais do pulmão BEAS-2B. A activação foi avaliada por medição da actividade de luciferase em células Caco-Rumbo e secreção de IL-8 por células BEAS-2B (linhas de células epiteliais do intestino humano são repórteres únicos da actividade estimuladora da flagelina/TLR5, com base na expressão das quimiocinas CCL20, também conhecidos como “quimiocinas activadas e reguladas no fígado” ou “LARC, e IL-8).

Como apresentado na Fig. 2A-B, FliC Δ 204-292, FliC Δ 191-352 e FliC Δ 174-400 foram todos potentes activadores de células. Os valores de EC50' respectivos das flagelinas variaram ligeiramente com o tipo de célula mas caiu no intervalo previamente descrito de ng/mL (Smith et al., 2003, Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagelina protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* 4:1247-1253).

Verificou-se que a actividade das flagelinas recombinantes era totalmente dependente de TLR5, uma vez que FliC Δ 174-400/89-96* foi incapaz de activar as células epiteliais.

O requisito para a sinalização de TLR5 foi ainda confirmado utilizando macrófagos da medula óssea derivados de murganhos deficientes em TLR5; as células não sintetizam qualquer IL-12

p40 após estimulação com flagelinas recombinantes (dados não apresentados).

Flagelinas com deleção estimulam respostas inatas da mucosa dependentes de TLR5

A estimulação de TLR5 por flagelinas recombinantes foi então estudada *in vivo* por via das mucosas.

Para este fim, a expressão de CCL20 e CXCL2 nos pulmões de murganhos tratados i.n. com flagelinas foi quantificada utilizando qRT-PCR (Fig. 2C).

Em 2 horas, os níveis pulmonares de ARNm de CCL20 foram cerca de 30 vezes superiores em animais tratados com flagelinas selvagens ou recombinantes do que nos animais tratados de forma simulada.

Além disso, a produção da quimiocina CCL20 foi detectada 6 h pós-instilação, em homogenados de pulmão e BAL (Fig. 2D). Em experiências de controlo, FliC Δ 174-400/89-96* e as flagelinas digeridas com tripsina não induzem este tipo de efeito. Observações semelhantes foram observadas para CXCL2 (dados não apresentados).

Estes resultados confirmaram que a resposta pró-inflamatória *in vivo* foi exclusivamente devida às flagelinas recombinantes.

No geral, as flagelinas com deleções na região hipervariável apresentaram propriedades pró-inflamatórias das mucosas equivalentes às do FliC de tipo selvagem equivalente.

Flagelinas recombinantes exibem actividade de adjuvante de mucosa

De modo a caracterizar as propriedades do adjuvante das nossas moléculas recombinantes, foram estudadas as respostas de anticorpo em soro e em secreções após imunizações i.n.

A ovalbumina (OVA) foi utilizada como um antigénio modelo, formulado com ou sem as várias flagelinas ou com a toxina da cólera (CT) como um adjuvante de mucosa convencional de ouro.

A co-administração de FliC com OVA aumentou significativamente a resposta de IgG específica para OVA (em soro e BAL, cerca de 300 e 100 vezes, respectivamente), em comparação com os animais imunizados com OVA isolado (Fig. 3^a-B).

Além disso, a resposta de IgA específica para OVA foi melhorada em BAL, sugerindo, deste modo, que FliC promove a arquétipo de resposta secretora de anticorpo de um adjuvante para a mucosa (Fig. 3C). De modo interessante, o efeito de FliC foi semelhante ao de CT.

Como o FliC, as flagelinas recombinantes FliC_{Δ204-292}, FliC_{Δ191-352} e FliC_{Δ174-400} foram deste modo capazes de potenciar as respostas sistémicas e das mucosas.

Em contraste, FliC_{Δ174-400/89-96*} e as flagelinas tratadas com tripsina não possuíam potência (Fig. 3 e Tabela 1).

Deste modo, a deleção da região hipervariável das flagelinas não influencia significativamente as propriedades de adjuvante de mucosa mediada por TLR5. Os nossos dados mostraram também que os efeitos respectivos das moléculas recombinantes na imunidade inata e adaptativa são correlacionadas.

Deleção da região hipervariável impede a capacidade para estimular os anticorpos anti-flagelina.

Espera-se que a deleção do domínio antigénico diminua a resposta imunitária específica para a flagelina e, deste modo, qualquer neutralização da imunidade mediada por TLR5, especialmente com administração repetida.

Decidiu-se portanto avaliar a eficácia da imunização i.n. no que respeita à indução de anticorpos específicos de FliC.

Como apresentado, FliC estimulou uma forte resposta de IgG no soro e BAL (Tabela 1 e Fig. 4). Em contraste, FliC $_{\Delta 204-292}$ desencadeou níveis de anticorpo 10 vezes inferiores em ambos os fluidos do que o FliC e um efeito mais pronunciado foi observado após imunização com FliC $_{\Delta 191-352}$ e FliC $_{\Delta 174-400}$.

Em conclusão, os domínios antigénicos e imunoestimuladores das flagelinas são funcionalmente não acoplado. Portanto, FliC $_{\Delta 191-352}$ e FliC $_{\Delta 174-400}$ são moléculas de interesse para prevenir ou atenuar a produção de anticorpos específicos para uma flagelina com actividade neutralizante.

Anticorpos específicos para a flagelina neutralizam a sinalização mediada por TLR5.

As flagelinas bacterianas são conhecidas por estimular fortes respostas de anticorpo, que são principalmente dirigidas contra a região hipervariável. Colocou-se a hipótese que os anticorpos anti-flagelina neutralizarão a actividade estimuladora de TLR5 das flagelinas.

Deste modo, os murganhos foram imunizados s.c. com a flagelina FliC ou uma preparação simulada (PBS isolado ou a irrelevante ovalbumina antigénio (OVA) formulada em CFA), seguida por reforços com IFA. A análise ELISA revelou que os soros anti-FliC exibiram os títulos de IgG específicos $> 10^6$, enquanto os títulos de soros simulados estiveram abaixo do limiar do ensaio de detecção (10^2).

Como acima mencionado, as linhas de células epiteliais do intestino humano são úteis como repórteres únicos da actividade estimuladora de flagelina/TLR5, com base na expressão da quimiocina CCL20 (também conhecida como "quimiocina activada e regulada no fígado", LARC).

Deste modo, utilizando células Caco-Rumbo portadoras do gene da luciferase sob o controlo do promotor CCL20, é aqui demonstrado que um soro anti-FliC é capaz de neutralizar totalmente a actividade de FliC agonista de TLR5 (Fig. 5A).

O efeito neutralizante de anticorpos específicos de FliC na sinalização de TLR5 foi depois directamente avaliado em animais imunizados. Para este fim, as respostas sistémicas pró-

inflamatórias em murganhos (produção de quimiocinas CCL20 e CXCL2) foram estudados após injeção i.v. de FliC (Fig. 5B-C).

Em animais imunizados de forma simulada, uma exposição FliC desencadeou um aumento significativo nos níveis de soro de CCL20 e CXCL2, em comparação com uma exposição a PBS.

Em contraste, a produção de quimiocina em animais imunizados com FliC não foi melhorada por qualquer das exposições. Utilizando transferência passiva de soro em animais naïve, foi encontrada uma correlação próxima entre a quantidade de anticorpo injectado e a resposta inata sistémica, como mostrado na Fig. 5D.

Em conclusão, a imunidade pré-existente para a flagelina pode neutralizar a actividade estimulada por TLR5 dos últimos, *in vitro e in vivo*.

Isto não é o caso com FliC_{Δ174-400}, que é fortemente impedida na sua capacidade para promover a produção de anticorpos específicos para a flagelina, incluindo os anticorpos neutralizantes, como divulgado anteriormente de acordo com a figura 4.

As doses eficazes necessárias para iniciar as respostas inatas mediadas por TLR5 pela via i.n., foi determinada. FliC e FliC_{Δ174-400} apresentaram perfis semelhantes de resposta à dose e a dose de 0,1 µg dose foi seleccionada para subseqüentes ensaios de neutralização (Fig. 6).

Para este fim, os animais foram hiperimunizados i.n. com FliC para estimular respostas fortes, de IgG das mucosas

específicas para FliC (título médio - 45000) e depois expostos i.n. com 0,1 µg de flagelinas FliC ou FliC_{Δ174-400}. A produção de quimiocina pró-inflamatória em BAL foi monitorizada.

Exposição a FliC ou FliC_{Δ174-400} levou à produção de CCL20 (4,28± 1,98 vs 1,08± 0,54 ng/mL e 2,48± 1,22 vs 0,93± 0,48 ng/mL em murganhos imunizados de forma simulada e com FliC, respectivamente) conforme observado em animais naíves.

Respostas das mucosas e sistémicas dependentes de TLR5 dependem em diferentes extensões da região hipervariável da flagelina.

Também se pretendia estudar a neutralização por anticorpos específicos para a flagelina de respostas dependentes de TLR5 induzidas após injeção i.v. das flagelinas recombinantes.

Para analisar a activação sistémica da imunidade inata, a produção em quimiocinas CCL20 circulantes pró-inflamatórias e a CXCL2 foi medida por ELISA no soro (Fig. 7).

Inesperadamente, observou-se que FliC_{Δ174-400} foi cerca de 100 vezes impedida na sua capacidade para desencadear efeitos sistémicos pró-inflamatórios, em comparação com o FliC de tipo selvagem.

Enquanto 10 mg de FliC_{Δ174-400} estimularam uma pequena produção de quimiocina, a variante mutada no motivo de TLR5 FliC_{Δ174-400}/89-96* foi desprovida de actividade (0,85 ± 0,27 vs 0,02 ± 0,00 ng/mL para CCL20).

Isto contrastou com FliC_{Δ204-292} e FliC_{Δ191-352}, que foram ambos potentes activadores como FliC.

Deste modo, certos determinantes moleculares na região hipervariável (ou dependente da última) são necessários para a estimulação sistémica de TLR5 mas não uma estimulação de TLR5 das mucosas. Tomadas como um todo, os resultados indicam que a activação de TLR5 nos compartimentos das mucosas e sistémico é controlada por mecanismos distintos.

Exemplo 2: Actividade biológica de flagelinas com uma região hipervariável eliminada selecionada do grupo consistindo em FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} e FliC_{Δ138-405}. Produção de flagelinas recombinantes com uma região hipervariável eliminada.

Várias flagelinas com uma região hipervariável eliminada foram recombinantemente produzidas efetuando o mesmo método conforme divulgado no Exemplo 1 acima, nomeadamente FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405}, e FliC_{Δ138-405} e FliC_{Δ100-405}.

As Figuras 8 e 9 apresentam análises das referidas proteínas recombinantemente produzidas.

A Figura 8 mostra o resultado de uma electroforese SDS PAGE que foi efectuada com as proteínas recombinantes recolhidas a partir do sobrenadante da cultura das células bacterianas recombinantes de *S. typhimurium* SIN41 correspondentes, após um passo de precipitação de proteína com TCA.

A Figura 9 mostra o resultado de um ensaio de transferência de Western utilizando anticorpos policlonais anti-FliC que foi

efectuado no sobrenadante da cultura das células bacterianas recombinantes correspondentes *S. typhimurium* SIN41, após um passo de precipitação de proteína com TCA.

Actividade biológica das flagelinas com uma região hipervariável eliminada FliC_{Δ174-400} FliC_{Δ161-405} e FliC_{Δ138-405}.

O efeito do FliC_{Δ174-400}, FliC_{Δ161-405} e FliC_{Δ138-405} na indução de CCL20 e CXCL2 foi ensaiado, efetuando o ensaio ELISA específico para citocinas que é descrito no Exemplo 1.

Resumidamente, C3H/HeJ (TLR4-deficiente) foram injectados intraperitonealmente com 10 µg das várias flagelinas recombinantes com a remoção das posições 174-400, 161-405, e 138-405.

Após 2 h, o soro foi amostrado e processado para ELISA específica para citocinas (CCL20 e CXCL2).

A preparação de flagelina foi derivada do sobrenadante de *Salmonella* recombinante que foi previamente precipitada com sulfato de amónio e dialisada (Fig. 8 e 9). Uma vez que esta preparação bruta pode ser contaminada com endotoxina, utilizaram-se murganhos deficientes em sinalização de TR4 uma vez que o LPS pode ser um principal contaminante nesta preparação bruta. Adicionalmente, utilizou-se o tratamento com tripsina para demonstrar que a atividade biológica está presente na fracção de proteína das preparações brutas.

Os resultados são apresentados nas figuras 10 (indução de CCL20) e 11 (indução de CXCL2).

Os resultados das figuras 10 e 11 sugerem que as flagelinas recombinantes FliC $\Delta_{161-405}$ e FliC $\Delta_{138-405}$ são competentes para a sinalização *in vivo* como descrito para FliC $\Delta_{174-400}$.

Os resultados sugerem que FliC $\Delta_{161-405}$ e FliC $\Delta_{138-405}$ são agonistas eficazes de TLR5 e, portanto, podem representar compostos adjuvantes eficazes.

Exemplo 3: Actividade adjuvante de FliC $\Delta_{174-400}$ nas respostas imunitárias contra o antigénio gp40 do vírus HIV1.

Os protocolos de imunização e a análise de respostas específicas para antigénio do anticorpo são as mesmas como descrito no Exemplo 1, excepto para características específicas que podem ser especificadas a seguir.

Resumidamente, actividade adjuvante da Flagelina FliC nativa e FliC $\Delta_{174-400}$ recombinante no antigénio gp140 de HIV1 foi efectuado como se segue: murganhos NMRI (n=8) foram imunizados no dia 1 e no dia 21 intranasalmente com 20 μ L de PBS contendo gp140 (5 μ g per murganhos) sem ou com FliC ou FliC $\Delta_{174-400}$ (1 μ g por murganho).

O soro e as lavagens broncoalveolares (BAL) foram amostrados no dia 35 e o título de anticorpo foi determinado por ELISA específica para gp140.

Os resultados são apresentados na Figura 12, em que cada símbolo representa murganhos individuais e a barra representa a média geométrica.

Os símbolos significam murganhos administrados intranasalmente com, respectivamente: (i) Círculos: HIV1 gp140 isolado; (ii) diamante: HIV1 gp140 + FliC $_{\Delta 174-400}$; (iii) triângulo: gp140 + FliC.

Os títulos de anticorpo a partir das amostras de soro são representados como símbolos a cheio na parte esquerda da Figura 12 (símbolos a preto). Os títulos de anticorpo a partir das amostras de lavagem broncoalveolar são representados como símbolos a branco na parte direita da Figura 12.

Os resultados mostram que várias flagelinas com região hipervariável removida como definido na presente descrição consistem em compostos imunoadjuvantes eficazes.

Tabela 1: Respostas imunitárias sensíveis a protease induzidas por flagelinas recombinantes*

Imunização intranasal*	Anti- IgG OVA **				Anti- IgG FliC **			
	soro		BAL		soro		BAL	
	média	SD	média	SD	média	SD	média	SD
PBS	ND***	0,0	ND	0,0	ND	0,0	ND	0,0
OVA	2,4	0,8	1,1	0,7	ND	0,0	ND	0,0
FliC + OVA	5,7	0,1	3,9	0,5	5,9	0,6	3,0	0,7
FliC $_{\Delta 204-292}$ + OVA	5,5	0,9	3,4	0,8	3,3	0,8	1,0	0,5
FliC $_{\Delta 191-352}$ + OVA	4,5	1,3	2,9	0,9	2,2	0,3	ND	0,0
FliC $_{\Delta 174-400}$ +OVA	4,9	0,9	2,7	0,9	2,0	0,1	0,1	0,2
TRP + OVA	3,4	1,2	1,3	0,8	ND	0,0	ND	0,0
FliC/TRP + OVA	2,8	0,5	1,1	0,6	ND	0,0	0,3	0,3
FliC $_{D204-292}$ /TRP + OVA	3,0	1,4	0,8	1,0	ND	0,0	ND	0,0

(continuação)

Imunização intranasal*	Anti- IgG OVA **				Anti- IgG FliC **			
	soro		BAL		soro		BAL	
	média	SD	média	SD	média	SD	média	SD
FliC _{D191-352} /TRP + OVA	2,6	0,7	0,8	0,9	ND	0,0	ND	0,0
FliC _{D174-400} /TRP + OVA	2,6	0,4	1,1	0,9	ND	0,0	ND	0,0

*Murganhos (n=8) foram imunizados com PBS, ovalbumina (OVA), OVA + flagelinas/péptidos derivados de flagelina ou OVA + flagelinas tratadas com tripsina (TRP) nos dias 1 e 21. No dia 35, os títulos de IgG específicos para OVA- e FliC- foram medidos no soro e BAL.

Significância estatística (p>0,05) foi determinada num teste de Mann-Whitney. **Valores são expressos como Log10 (títulos recíprocos) ± desvio padrão (SD). Em soro e BAL, o limite de detecção é 2 e 0,3 (1/100 de diluição de soro e 1/2 de diluição de BAL), respectivamente.

***"ND" significa "Não detectado".

Tabela 2: Sequências

(continuação)

SEQ ID N°	Tipo	Descrição
1	péptido	Flagelina (FliC)
2	péptido	FliC _{Δ174-400}
3	ácido nucleico	Flagelina (FtiC)
4	ácido nucleico	iniciador
5	ácido nucleico	iniciador
6	ácido nucleico	iniciador
7	ácido nucleico	iniciador
8	ácido nucleico	iniciador
9	ácido nucleico	iniciador
10	ácido nucleico	iniciador
11	ácido nucleico	iniciador

(continuação)

SEQ ID N°	Tipo	Descrição
12	ácido nucleico	iniciador
13	ácido nucleico	iniciador
14	ácido nucleico	FliC _{Δ174-400}
15	ácido nucleico	iniciador
16	ácido nucleico	iniciador
17	ácido nucleico	iniciador
18	ácido nucleico	iniciador
19	ácido nucleico	iniciador
20	ácido nucleico	iniciador
21	ácido nucleico	iniciador
22	ácido nucleico	iniciador
23	ácido nucleico	iniciador
24	ácido nucleico	iniciador
25	péptido	FliC _{Δ161-405}
26	péptido	FliC _{Δ138-405}
27	péptido	FliC _{Δ100-405}
28	ácido nucleico	FliC _{Δ161-405}
29	ácido nucleico	FliC _{Δ138-405}
30	ácido nucleico	FliC _{Δ100-405}

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
(INSERM)

<120> Novos compostos imunoadjuvantes e sua utilização

<130> V882EU - INSERM

<160> 30

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 494

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica*

<400> 1

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

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
20 25 30

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

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110

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

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
 130 135 140

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

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln Gln
 165 170 175

Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala Asp
 180 185 190

Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr Gly
 195 200 205

Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp Asp
 210 215 220

Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr Gly
 225 230 235 240

Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu Val
 245 250 255

Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro Ala
 260 265 270

Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp Leu
 275 280 285

Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr Ala
 290 295 300

Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile Asp
305 310 315 320

Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr Gln
325 330 335

Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala Asp
340 345 350

Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp Gly
355 360 365

Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser Lys
370 375 380

Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala Ala
385 390 395 400

Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala
405 410 415

Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe
420 425 430

Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser
435 440 445

Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn
450 455 460

Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala
465 470 475 480

Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
485 490

<210> 2

<211> 271

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica*

<400> 2

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

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
20 25 30

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

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
100 105 110

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

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
130 135 140

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

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Gly Ala Ala
165 170 175

Gly Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu
180 185 190

Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg
195 200 205

Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr
210 215 220

Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser
225 230 235 240

Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu
245 250 255

Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
260 265 270

<210> 3

<211> 1488

<212> ADN

<213> *Salmonella enterica*

<400> 3

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60
tcccagtcog ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgog tatcaacagc 120
gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgogaa catcaaaggt 180
ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgogcagac cactgaaggc 240
gogctgaacg aatcaacaa caacctgog cgtgtgogtg aactggoggt tcagtctgct 300
aacagcacca actcccagtc tgacctogac tccatccagg ctgaaatcac ccagcogctg 360
aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gogtgaaagt cctggogcag 420
gacaacaccc tgaccatcca ggttggogcc aacgacggtg aaactatoga tatogatctg 480
aagcogatca actctcagac cctgggtctg gatagcgtga atgtgcaaca aaaatataag 540
gtcagcogata cggctgcaac tgttacagga tatgcccogata ctacgattgc tttagacaat 600
agtactttta aagcctcggc tactggtctt ggtggtactg accagaaaat tgatggogat 660
ttaaatttg atgatacogac tggaaaatat tacgocaaag ttaccggttac ggggggaact 720
ggtaaagatg gctattatga agtttccggt gataagacga acggtgaggt gactcttgc 780
ggcggogcga cttccccgct tacaggtgga ctacctgogca cagcaactga ggatgtgaaa 840

aatgtacaag ttgcaaatgc tgatttgaca gaggctaaag ccgcattgac agcagcaggt	900
gttaccggca cagcatctgt tgттааgatg tcttatactg ataataacgg taaaactatt	960
gatggtggtt tagcagttaa ggtaggcgat gattactatt ctgcaactca aaataaagat	1020
ggttcataa gtattaatac tacgaaatac actgcagatg acggtacatc caaaactgca	1080
ctaaacaaac tgggtggcgc agacggcaaa accgaagttg tttctattgg tggtaaaact	1140
tacgctgcaa gtaaagccga aggtcacaac tttaaagcac agcctgatct ggcggaagcg	1200
gctgctacaa ccaccgaaaa cccgctgcag aaaattgatg ctgctttggc acaggttgac	1260
acgttacggt ctgacctggg tgcggtacag aaccgtttca actccgctat taccaacctg	1320
ggcaacaccg taacaacct gacttctgcc cgtagccgta tcgaagattc cgactacgcg	1380
accgaagttt ccaacatgtc tcgcgcgag attctgcagc aggccggtac ctccgttctg	1440
gcgcaggcga accaggttcc gcaaaacgtc ctctctttac tgcgtaa	1488

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 4

agcagactga accgccag 18

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 5
gctacaacca ccgaaaacc 19

<210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 6
aaccgcgctgc agaaaattg 19

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 7
caggactttc acgccggtt 18

<210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 8

cttcagatcg atatcgatag tttcac

26

<210> 9

<211> 18

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 9

attcagcgta tccagacc

18

<210> 10

<211> 27

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 10

gttccgcaaa gcgtcctctc tttactg

27

<210> 11

<211> 27

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 11

cagtaaagag aggacgcttt gcggaac

27

<210> 12

<211> 31

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 12

ggtgcagctg gagctacaac caccgaaaac c

31

<210> 13

<211> 31

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 13

ggtgcagctg gaaacccgct gcagaaaatt g

31

<210> 14

<211> 819

<212> ADN

<213> *Salmonella enterica*

<400> 14

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa 60
tcccagtcgg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc 120
gcgaaagacg atgcggcagc tcagggcatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt 180
ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgagac cactgaaggc 240
gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggc tcagtctgct 300
aacagcacca actcccagtc tgacctcgac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgctg 360
aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctggcgcag 420
gacaacaccc tgaccatcca ggttgggtgcc aacgacggtg aaactatcga tatcgatctg 480
aagcagatca actctcagac cctgggtctg gatacgtga atggtgctgc tgggtgctaca 540
accaccgaaa acccgctgca gaaaattgat gctgctttgg cacaggttga cacgttacgt 600
tctgacctgg gtgcggtaca gaaccgtttc aactccgcta ttaccaacct gggcaacacc 660
gtaaacaacc tgacttctgc ccgtagccgt atcgaagatt ccgactacgc gaccgaagtt 720
tccaacatgt ctgcgcgca gattctgcag caggccggta cctccgttct ggcgcaggcg 780

aaccaggttc cgcaaagcgt cctctcttta ctgcttaa 819

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 15

agcaccattc agcgtatcca gacc

24

<210> 16

<211> 24

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 16

gctggtgcta caaccaccga aaac

24

<210> 17

<211> 27

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 17

tcgagatatc ctgtaacagt tgcagcc

27

<210> 18

<211> 29

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 18

actcgaggac ggtacatcca aaactgcac 29

<210> 19

<211> 19

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 19

cgtcatccat ggcgaactg 19

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 20
gcttctttgc agctccttcg t 21

<210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 21
ttttgggatg gaattggaca c 21

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 22
tgcaggtgaa gccttcaacc 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 23

ccctcaacgg aagaaccaa

20

<210> 24

<211> 21

<212> ADN

<213> sequência artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 24

cacatcaggt acgatccagg c

21

<210> 25

<211> 253

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica*

<400> 25

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

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
20 25 30

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

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110

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

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
 130 135 140

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

Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln
 165 170 175

Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn
 180 185 190

Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala
 195 200 205

Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met
 210 215 220

Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln
 225 230 235 240

Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
 245 250

<210> 26

<211> 230

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica*

<400> 26

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

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
20 25 30

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

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
100 105 110

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

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu
130 135 140

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

Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly
165 170 175

Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser
180 185 190

Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln
195 200 205

Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser
210 215 220

Val Leu Ser Leu Leu Arg
225 230

<210> 27

<211> 192

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica*

<400> 27

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

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
20 25 30

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

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
85 90 95

Gln Ser Ala Gly Ala Ala Gly Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala
100 105 110

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

Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu
130 135 140

Thr Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val
145 150 155 160

Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val
165 170 175

Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Ser Val Leu Ser Leu Leu Arg
180 185 190

<210> 28

<211> 765

<212> ADN

<213> *Salmonella enterica*

<400> 28

atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tgcgtgttga cccagaataa cctgaacaaa 60
tcccagtcg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc 120
gcaaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccgtt ttaccgcaa catcaaaggt 180
ctgactcagg cttcccgtaa cgtaacgac ggtatctcca ttgvcgagac cactgaaggc 240
gvcgtgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgvcgtg aactggvcggt tcagttctgt 300
aacagcacca actcccagtc tgacctgcac tccatccagg ctgaaatcac ccagvcgctg 360
aacgaaatcg accgtgtatc vcgvcagact cagttcaacg gvcgtgaaagt cctggvcgag 420
gacaacaccc tgaccatcca ggttgggtgcc aacgvcggtg aaactatcga tatvcgatctg 480
aaggggtgcag ctggaaaccc gctgcagaaa attgatgctg ctttggcaca ggttgacacg 540
ttacgttctg acctgggtgc ggtacagaac cgtttcaact vcgctattac caacctgggc 600
aacaccgtaa acaacctgac ttctgcccgt agccgtatcg aagattccga ctacvcgacc 660
gaagtttcca acatgtctcg vcgvcagatt ctgcagcagg ccggtacctc cgttctggcg 720
cagvcgaacc aggttccgca aagvcctcctc tctttactgc gttaa 765

<210> 29

<211> 696

<212> ADN

<213> *Salmonella enterica*

<400> 29

```
atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa      60
tcccagtccg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgtctt ccggtctgcg tatcaacagc     120
gcgaaagacg atgcggcagg tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt     180
ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgcagac cactgaaggc     240
gcgctgaacg aaatcaacaa caacctgcag cgtgtgctg aactggcggg tcagtctgct     300
aacagcacca actcccagtc tgacctgcac tccatccagg ctgaaatcac ccagcgcctg     360
aacgaaatcg accgtgtatc cggccagact cagttcaacg gcgtgaaagt cctgggtgca     420
gctggaaacg cgctgcagaa aattgatgct gctttggcac aggttgacac gttacgttct     480
gacctgggtg cggtagacaa ccgtttcaac tccgctatta ccaacctggg caacaccgta     540
aacaacctga cttctgcccg tagccgtatc gaagattccg actacgcgac cgaagtttcc     600
aacatgtctc gcgcgcagat tctgcagcag gccggtacct ccgttctggc gcaggcgaac     660
caggttccgc aaagcgtcct ctctttactg cgtaa                                  696
```

<210> 30

<211> 582

<212> ADN

<213> *Salmonella enterica*

<400> 30

```
atggcacaag tcattaatac aaacagcctg tcgctgttga cccagaataa cctgaacaaa      60
tcccagtcctg ctctgggcac cgctatcgag cgtctgttct cgggtctgog tatcaacagc    120
gcgaaagacg atgcggcagc tcaggcgatt gctaaccggt ttaccgcgaa catcaaaggt    180
ctgactcagg cttcccgtaa cgctaacgac ggtatctcca ttgcgagac cactgaaggc     240
gcgctgaacg aatcaacaa caacctgcag cgtgtgcgtg aactggcggg tcagtctgct     300
ggcgcagctg gaaaccctct gcagaaaatt gatgctgctt tggcacaggt tgacacgtta    360
cgttctgacc tgggtgcggt acagaaccgt ttcaactccg ctattaccaa cctgggcaac    420
accgtaaaca acctgacttc tgcccgtagc cgtatcgaag attccgacta cgcgaccgaa    480
gtttccaaca tgtctcgcgc gcagattctg cagcaggccg gtacctccgt tctggcgcag    540
gcgaaccagg ttccgcaaag cgctctctct ttactgcggt aa                        582
```

Lisboa, 7 de Fevereiro de2014

REIVINDICAÇÕES

1. Composto imunoadjuvante compreendendo:

a) um péptido N-terminal possuindo, pelo menos, 90% identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início no resíduo de aminoácido localizado na posição 1 da SEQ ID N° 1 e terminando num resíduo de aminoácidos seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizados na posições 99 a 173 de SEQ ID N° 1; e

b) um péptido C-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início num resíduo de aminoácido seleccionado ,do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado nas posições 401 a 406 de SEQ ID N° 1 e terminando no resíduo de aminoácidos localizado na posição 494 de SEQ ID N° 1, em que:

- o referido péptido N-terminal está directamente ligado ao referido péptido C-terminal, ou

- o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal estão ligados indirectamente, um ao outro, através de uma cadeia espaçadora, em que a cadeia espaçadora consiste em 1-20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas, em que os aminoácidos são seleccionados dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente e em que o composto não é SEQ ID N°: 15,

628, 630, 632, 634, 713, 715, 717, 719 ou 721 do documento WO 2009/128950.

2. Composto imunoadjuvante compreendendo:

a) um péptido N-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início a partir do resíduo de aminoácido localizado na posição 1 DE SEQ ID N° 1 e terminando num resíduo de aminoácidos seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado nas posições 99 a 173 de SEQ ID N° 1; e

b) um péptido C-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início num resíduo de aminoácido seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado nas posições 401 a 406 de SEQ ID N° 1 e terminando no resíduo de aminoácidos localizado na posição 494 de SEQ ID N° 1, em que:

- o referido péptido N-terminal está directamente ligado ao referido péptido C-terminal, ou

- o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal estão ligados indirectamente, um ao outro, através de uma cadeia espaçadora, em que a cadeia espaçadora consiste em 1-20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas, em que os aminoácidos são seleccionados a partir dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente em que o referido péptido N-terminal é

seleccionado do grupo consistindo nas sequências de aminoácidos 1-99, 1-137, 1-160 e 1-173 de SEQ ID N° 1.

3. Composto imunoadjuvante compreendendo:

a) um péptido N-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início do resíduo de aminoácido localizado na posição 1 de SEQ ID N° 1 e terminando num resíduo de aminoácidos seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado nas posições 99 a 173 de SEQ ID N° 1; e

b) um péptido C-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início num resíduo de aminoácido seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado nas posições 401 a 406 de SEQ ID N° 1 e terminando no resíduo de aminoácido localizado na posição 494 de SEQ ID N° 1, em que:

- o referido péptido N-terminal está directamente ligado ao referido péptido C-terminal, ou

- o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal estão ligados indirectamente, um ao outro, através de uma cadeia espaçadora, em que a cadeia espaçadora consiste em 1-20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas, em que os aminoácidos são seleccionados dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente, em que o referido péptido C-terminal é

seleccionado do grupo consistindo nas sequências de aminoácidos 401-494 e 406-494 de SEQ ID N° 1.

4. Composto imunoadjuvante de acordo com qualquer das reivindicações 2 ou 3, em que os referidos péptidos N-terminal e C-terminal consistem nas sequências de aminoácidos 1-173 e 401-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente.
5. Composto imunoadjuvante de acordo com qualquer das reivindicações 2-3, em que os referidos péptidos N-terminal e C-terminal consistem nas sequências de aminoácidos 1-160 e 406-494 da SEQ ID N° 1, respectivamente.
6. Composto imunoadjuvante de acordo com qualquer das reivindicações 2-3, em que os referidos péptidos N-terminal e C-terminal consistem nas sequências de aminoácidos 1-137 e 406-494 de SEQ ID N° 1, respectivamente.
7. Composto imunoadjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, em que o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal são ligados indirectamente, um ao outro, através de uma cadeia espaçadora intermediária consistindo na sequência do péptido $\text{NH}_2\text{-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH}$.
8. Composto imunoadjuvante compreendendo:
 - a) um péptido N-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início desde o resíduo de aminoácido localizado na posição 1 da SEQ ID N°1 e terminando num resíduo de aminoácidos seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos

resíduos de aminoácidos localizado na posições 99 a 173 de SEQ ID N° 1 ; e

b) um péptido C-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início num resíduo de aminoácido seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado nas posições 401 a 406 de SEQ ID N° 1 e terminando no resíduo de aminoácidos localizados na posição 494 de SEQ ID N° 1, em que:

- o referido péptido N-terminal está directamente ligado ao referido péptido C-terminal, ou

- o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal estão ligados indirectamente, um ao outro, através de uma cadeia espaçadora, em que a cadeia espaçadora consiste em 1-20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas, em que os aminoácidos são seleccionados a partir dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente

em que o resíduo de aminoácido asparagina localizado na posição 488 de SEQ ID N° 1 é substituído por uma serina.

9. Composto imunoadjuvante de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o referido composto compreende um resíduo de metionina adicional na extremidade N-terminal.

10. Composição farmacêutica compreendendo um composto imunoadjuvante de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 9, juntamente com um ou mais excipientes farmacologicamente aceitáveis.

11. Composição imunogénica compreendendo um composto imunoadjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, juntamente com um ou mais antígenos.
12. Composição de vacina compreendendo um composto imunoadjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, juntamente com um ou mais antígenos.
13. Composição imunogénica de acordo com a reivindicação 11 ou a composição de vacina de acordo com a reivindicação 12, em que o referido composto imunoadjuvante não está covalentemente ligado ao referido um ou mais antígenos.
14. Composto imunoadjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, para utilização como um medicamento.
15. Utilização de um composto imunoadjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, para a preparação de uma composição farmacêutica.
16. Ácido nucleico que codifica o composto imunoadjuvante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9.
17. Vector recombinante compreendendo, nele inserido, o ácido nucleico da reivindicação 16, o ácido nucleico que codifica um composto imunoadjuvante compreendendo:

a) um péptido N-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de

aminoácidos com início desde o resíduo de aminoácido localizado na posição 1 de SEQ ID N° 1 e terminando num resíduo de aminoácidos seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado na posições 99 a 173 de SEQ ID N° 1; e

b) um péptido C-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início num resíduo de aminoácido seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado nas posições 401 a 406 de SEQ ID N° 1 e terminando no resíduo de aminoácidos localizado na posição 494 de SEQ ID N° 1, em que:

- o referido péptido N-terminal está directamente ligado ao referido péptido C-terminal, ou

- o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal estão ligados indirectamente, um ao outro, através de uma cadeia espaçadora, em que a cadeia espaçadora consiste em 1-20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas, em que os aminoácidos são seleccionados dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente.

18. Célula hospedeira transfetada ou transformada com o vector recombinante da reivindicação 17 ou com um ácido nucleico que codifica um composto imunoadjuvante compreendendo:

a) um péptido N-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com

início desde o resíduo de aminoácido localizado na posição 1 de SEQ ID N° 1 e terminando num resíduo de aminoácidos seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizados nas posições 99 a 173 de SEQ ID N° 1; e

b) um péptido C-terminal possuindo, pelo menos, 90% de identidade de aminoácidos com a sequência de aminoácidos com início num resíduo de aminoácido seleccionado do grupo consistindo em qualquer um dos resíduos de aminoácidos localizado na posições 401 a 406 de SEQ ID N° 1 e terminando no resíduo de aminoácidos localizado na posição 494 de SEQ ID N° 1, em que:

- o referido péptido N-terminal está directamente ligado ao referido péptido C-terminal, ou

- o referido péptido N-terminal e o referido péptido C-terminal estão ligados indirectamente, um ao outro, através da cadeia espaçadora, em que a cadeia espaçadora consiste em 1-20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas, em que os aminoácidos são seleccionados dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente.

Lisboa, 7 de Fevereiro de 2014

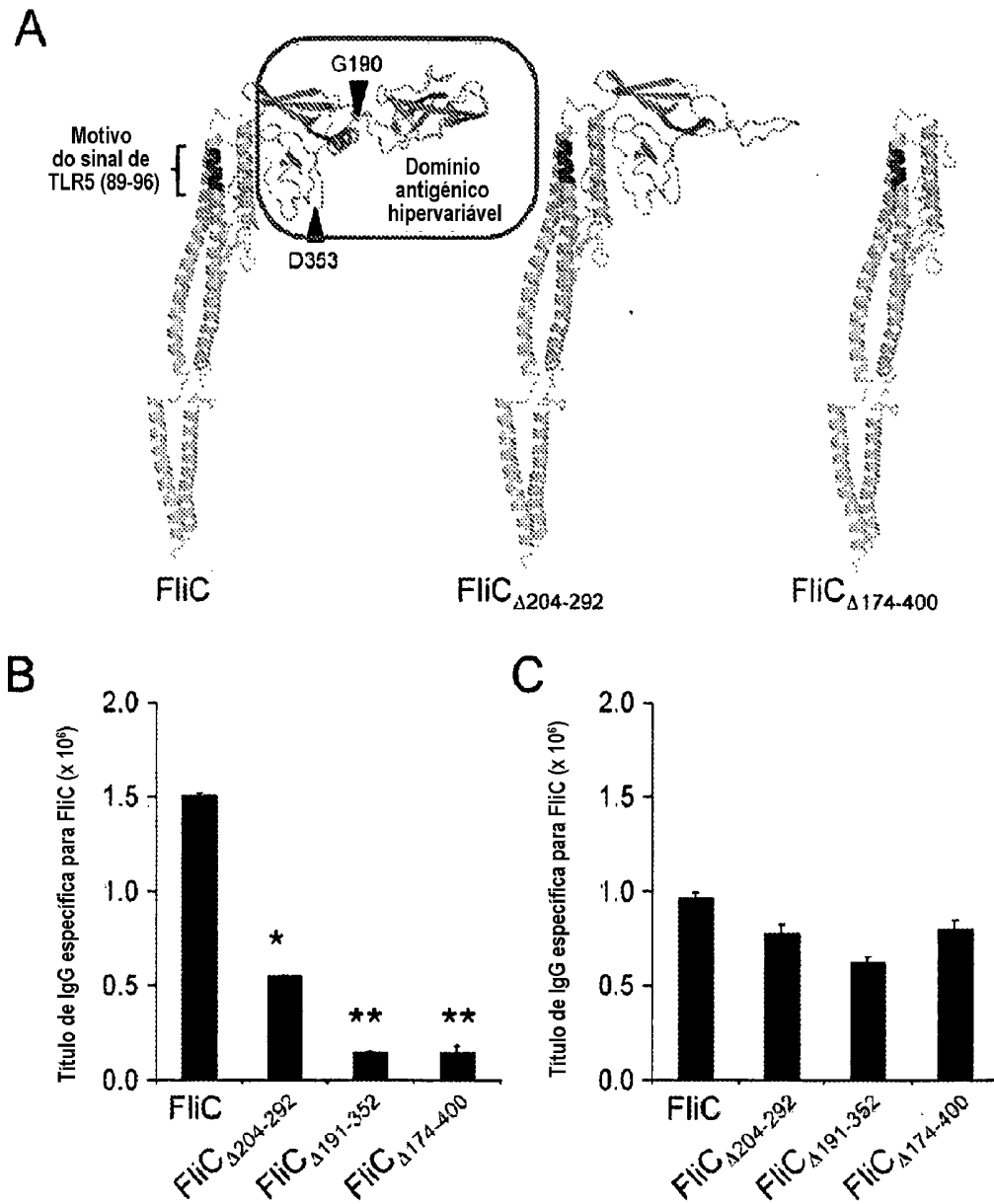


Figura 1

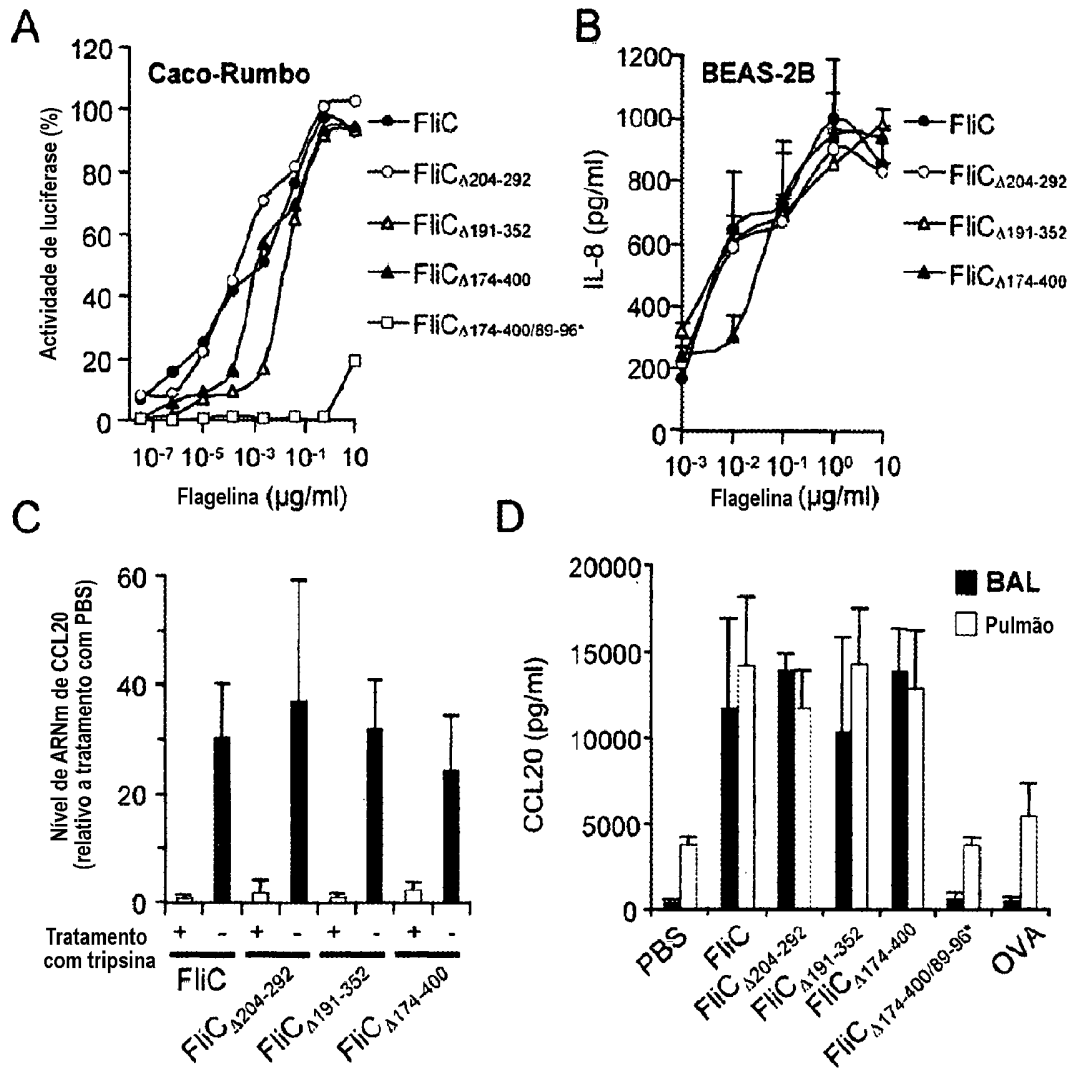


Figura 2

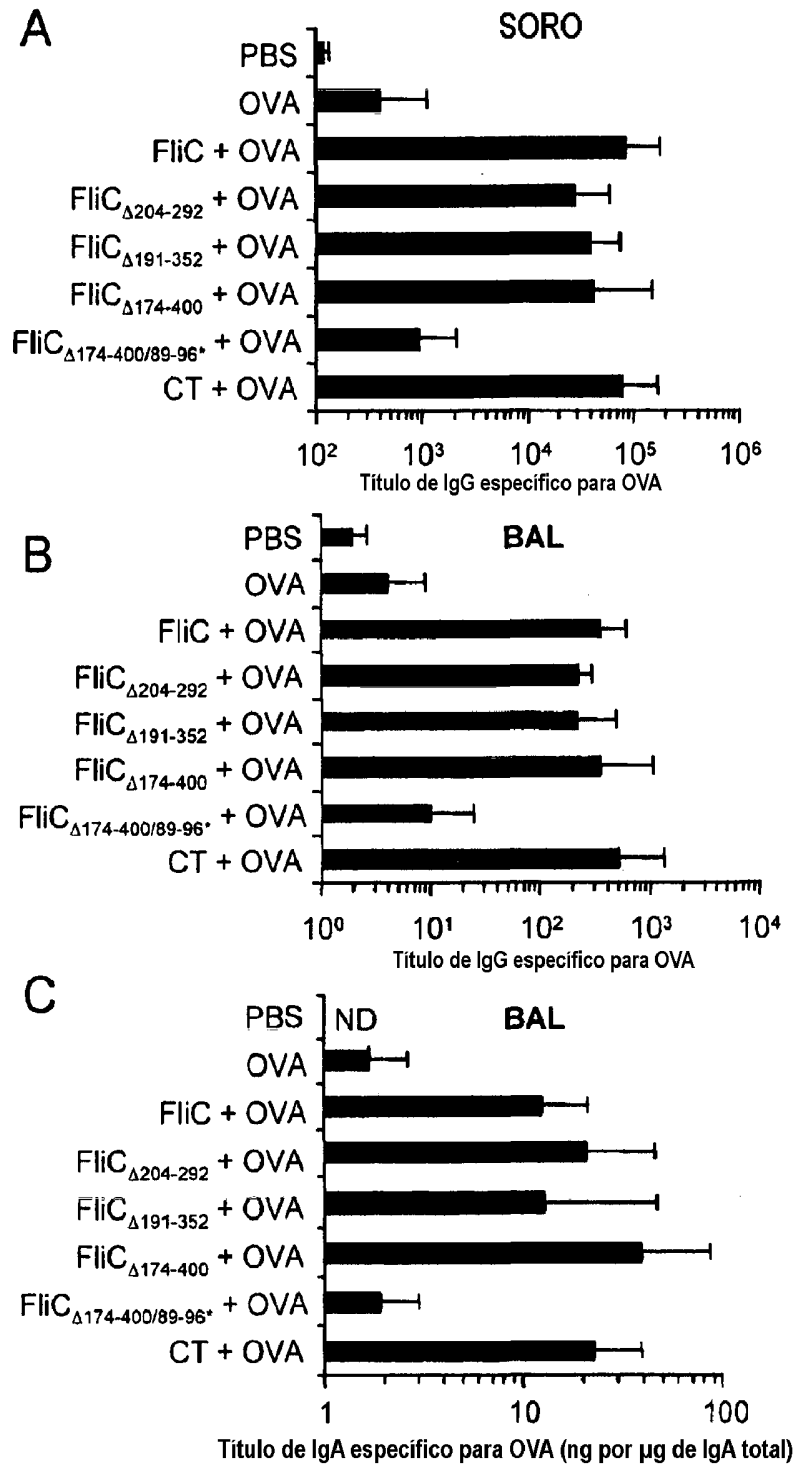


Figura 3

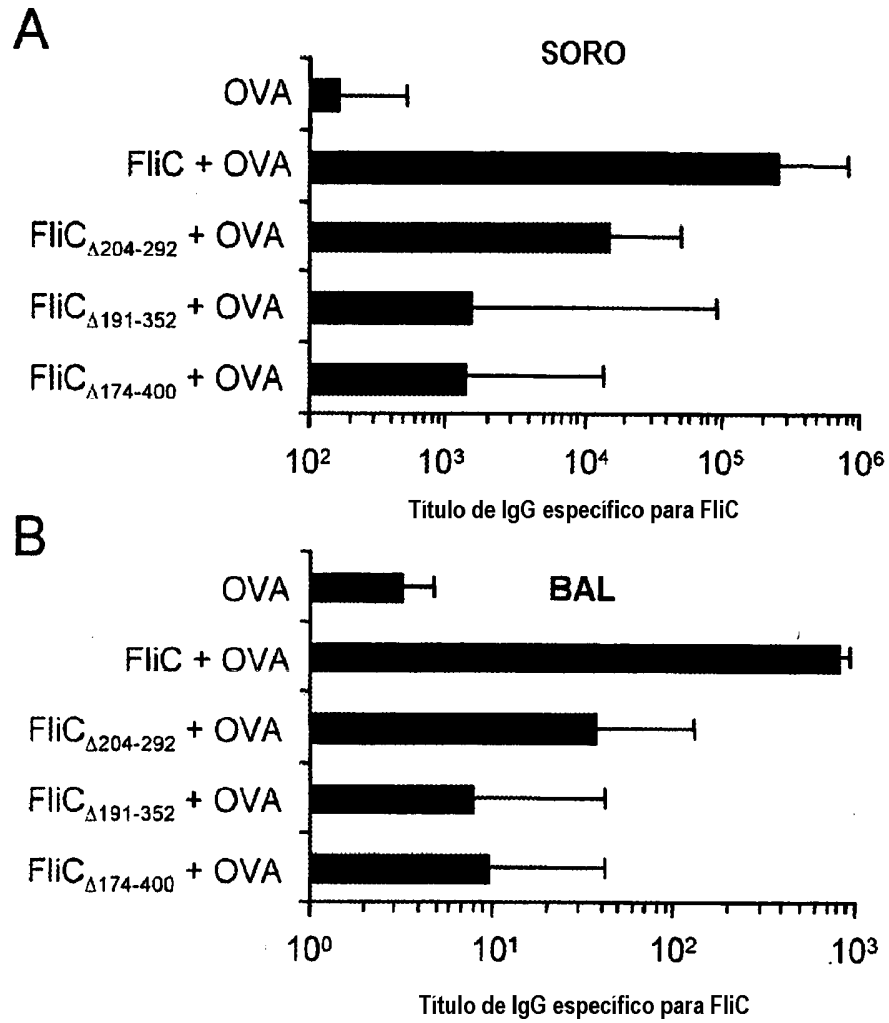


Figura 4

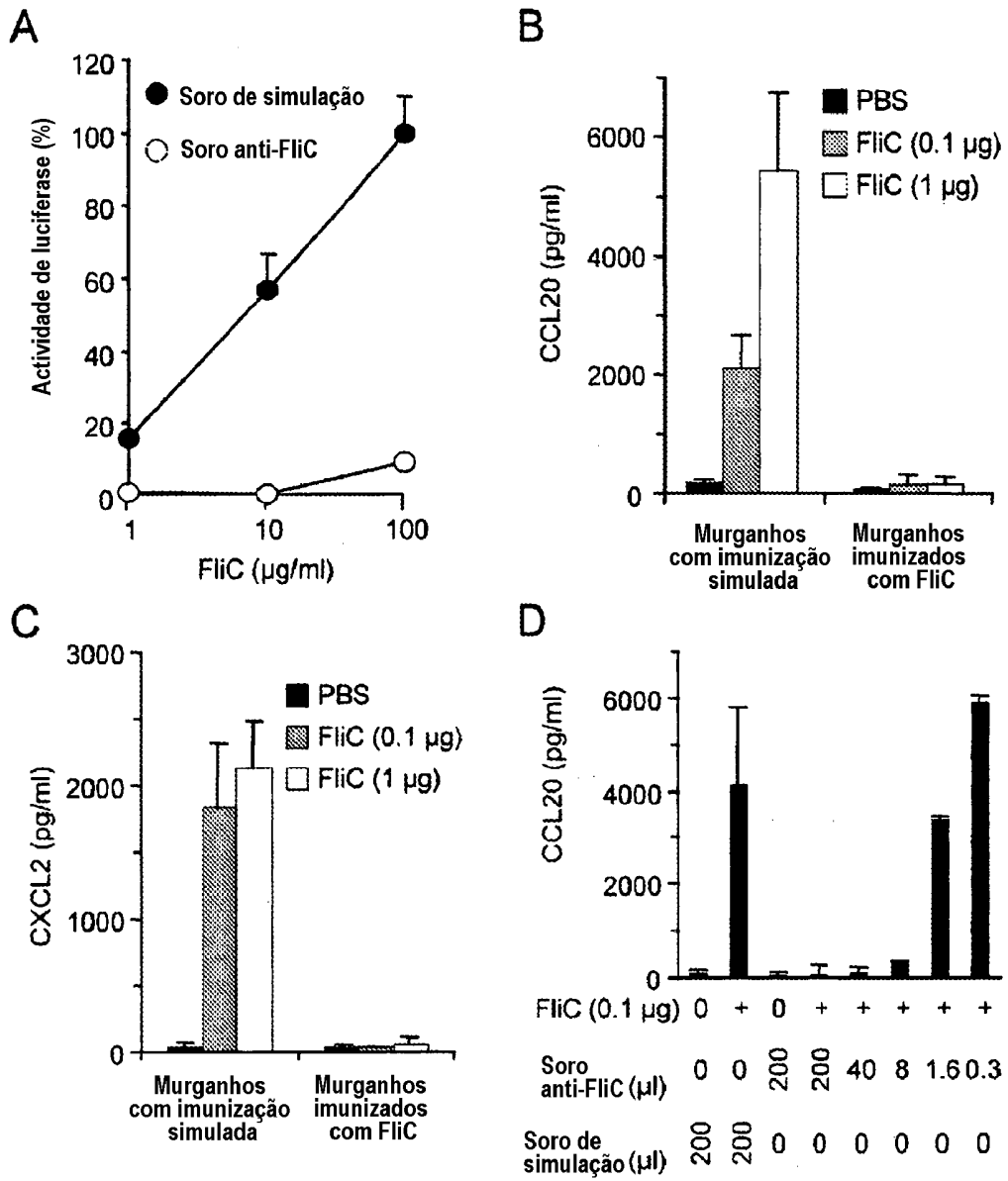


Figura 5

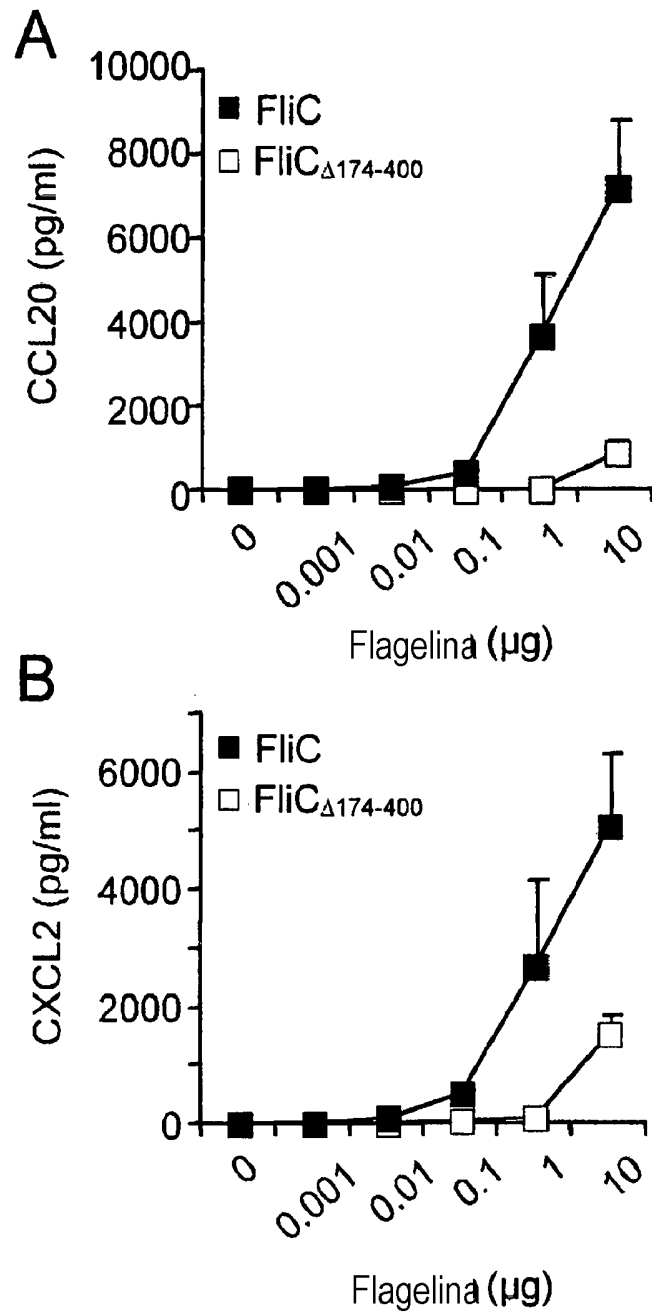


Figura 6

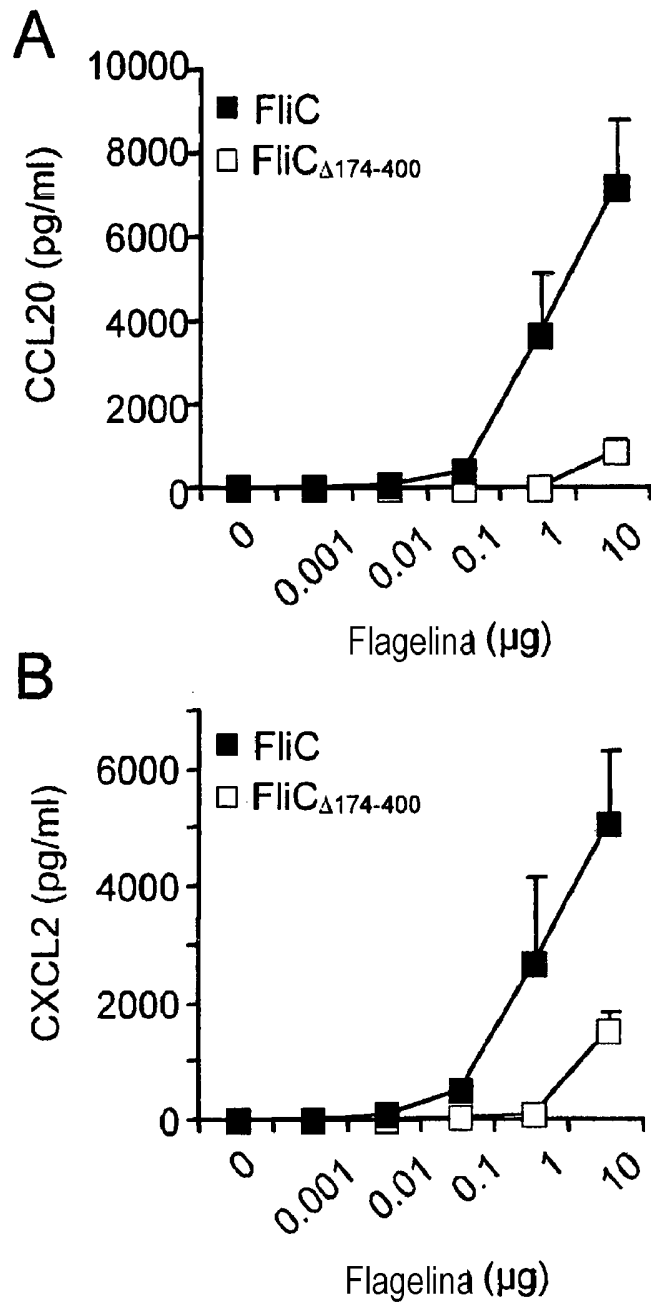


Figura 7

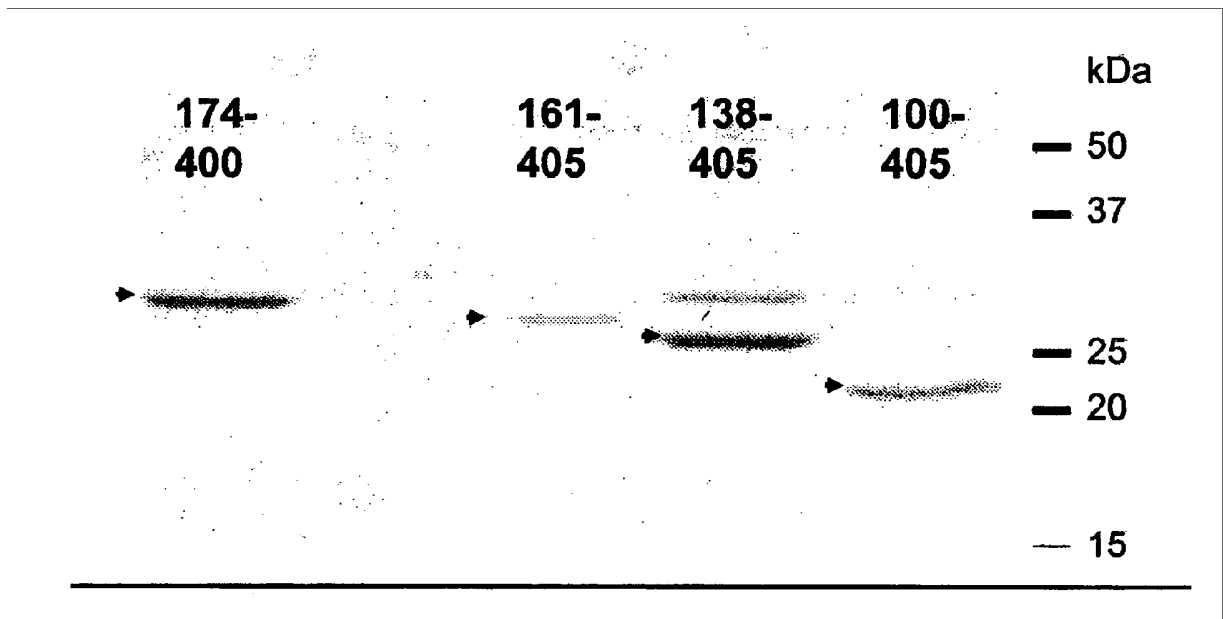


Figura 8

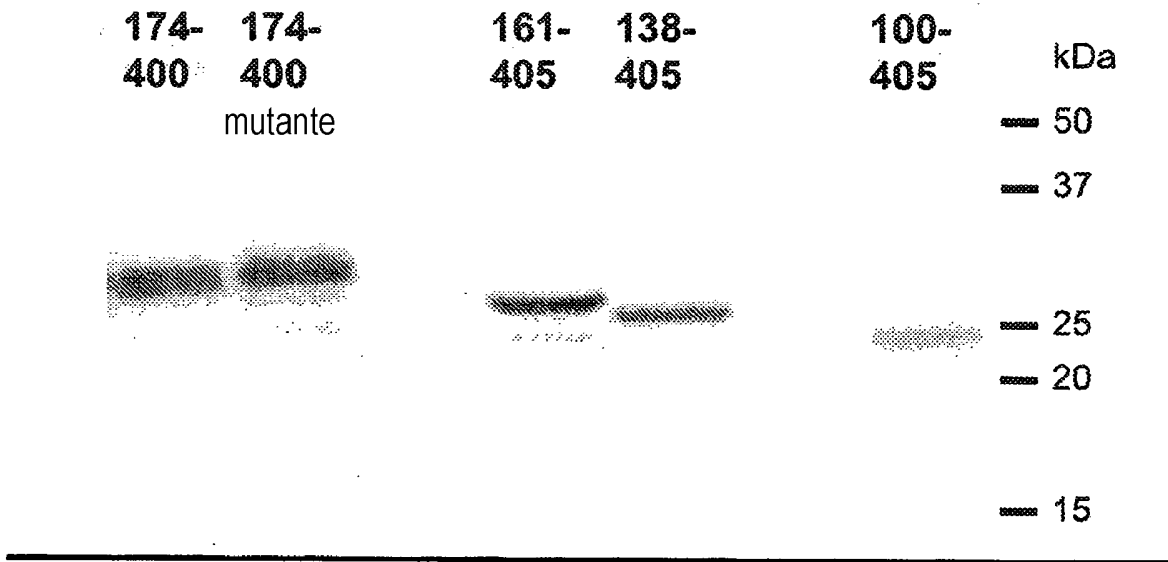


Figura 9

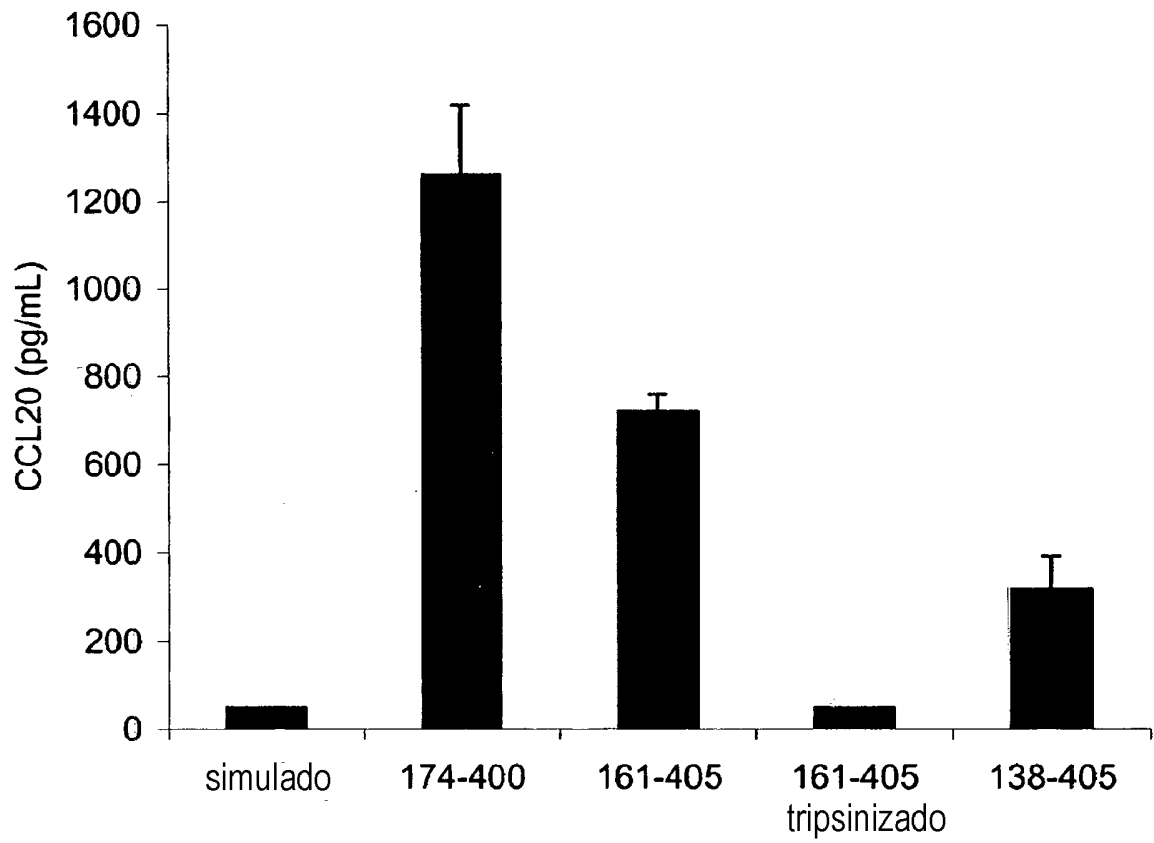


Figura 10

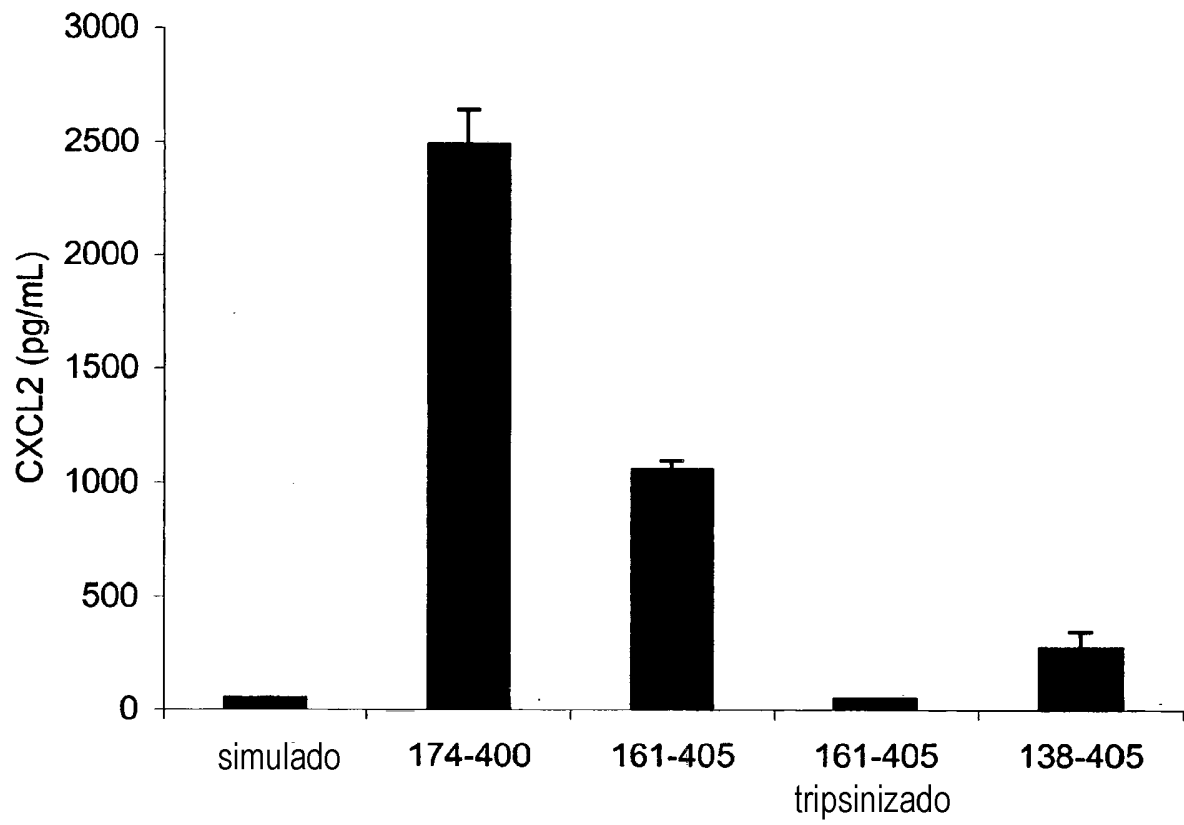
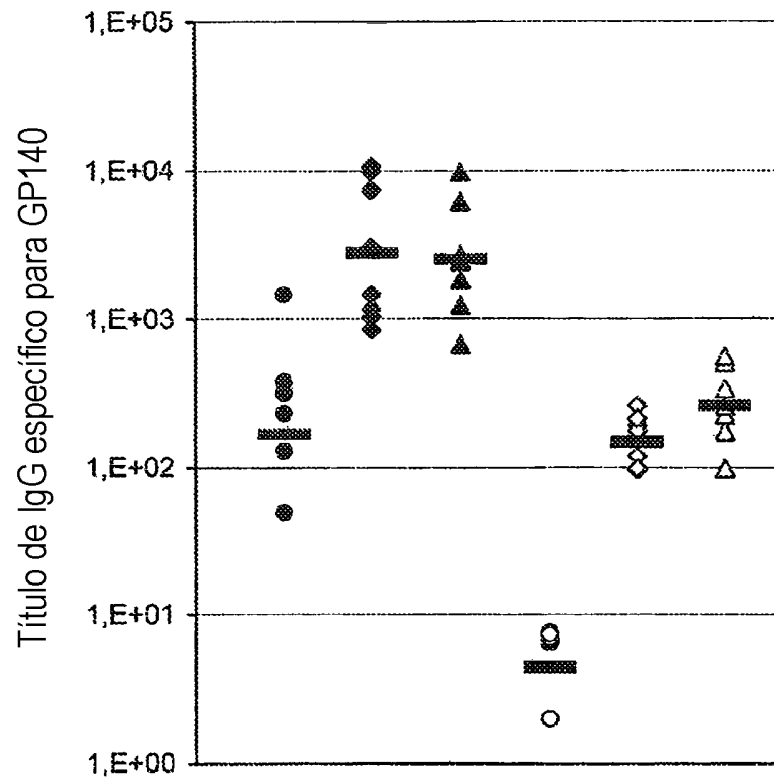


Figura 11



GP140	+	+	+	+	+	+
FliCΔ174-400	-	+	-	-	+	-
FliC	-	-	+	-	-	+

Figura 12

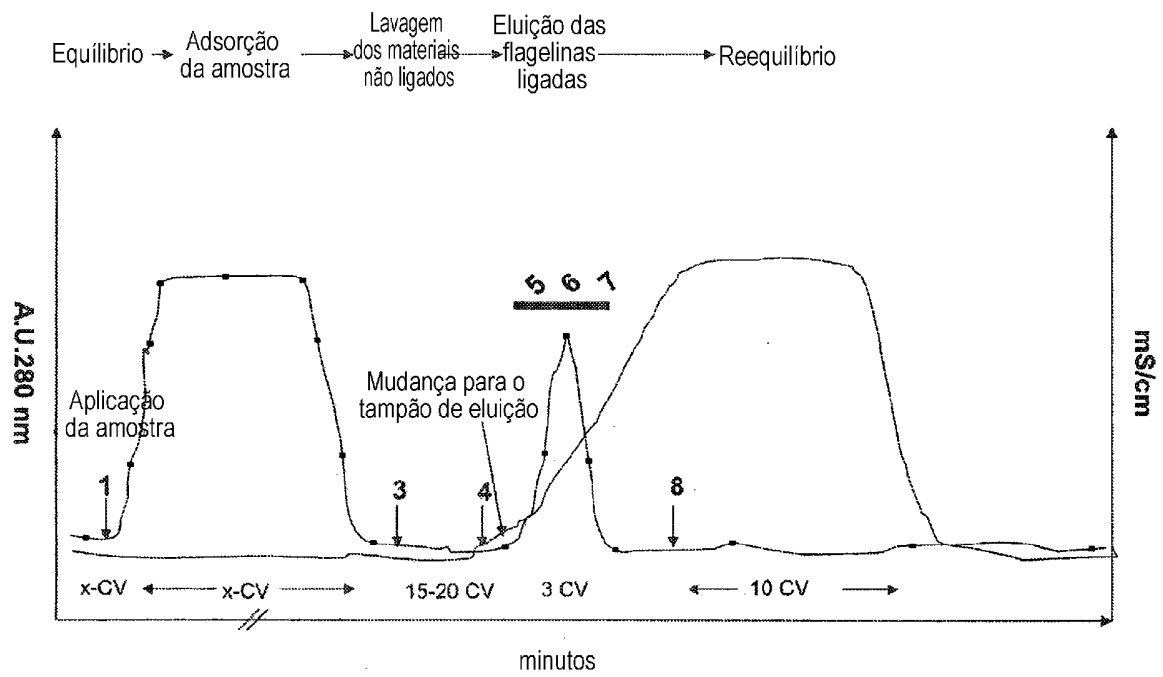


Figura 13

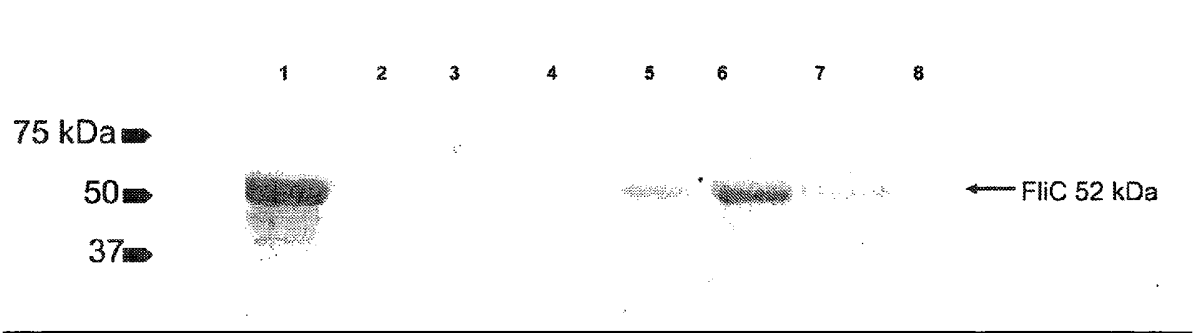


Figura 14