



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021005396-8 A2



(22) Data do Depósito: 22/03/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 27/09/2022

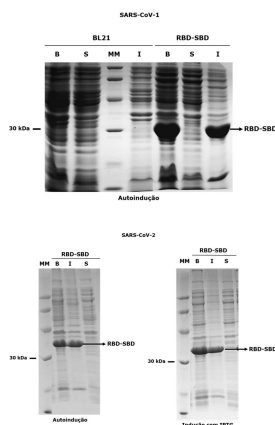
(54) **Título:** PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONJUGADAS COM ANTÍGENOS DO VÍRUS SARS-COV-2 E DE OUTRO AGENTES INFECCIOSOS PARA ENSAIOS IMUNOLÓGICOS E IMUNIZAÇÃO CONTRA COVID-19 E OUTRAS DOENÇAS

(51) **Int. Cl.:** A61K 39/215; A61K 47/34; A61K 9/51; A61P 31/14.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) **Inventor(es):** MARCELO MÜLLER DOS SANTOS; EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA; MARITZA ARAUJO TODO BOM; MARIA LUISA TERRIBILE BUDEL; LUIS PAULO SILVEIRA ALVES; BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO; FERNANDA ZETTEL BASTOS; MIKAELA DOS ANJOS ADUR; EDUARDO BUENO CARNEIRO; LANA BAZAN PETERS QUERNE.

(57) **Resumo:** PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONJUGADAS COM ANTÍGENOS DO VÍRUS SARS-COV-2 E DE OUTRO AGENTES INFECCIOSOS PARA ENSAIOS IMUNOLÓGICOS E IMUNIZAÇÃO CONTRA COVID-19 E OUTRAS DOENÇAS. A invenção descrita consiste no processo de obtenção de partículas poliméricas em micro e nanoescala e de antígenos recombinantes que juntos formam um veículo imunizante. A invenção descreve os seguintes detalhes técnicos: (i) obtenção das nanopartículas do polímero polihidroxibutirato, (ii) expressão, purificação e imobilização do antígeno na superfície das partículas e (iii) imunização de camundongos e análise dos títulos vacinais contra o antígeno. Embora a invenção tenha sido desenhada e demonstrada como imunizante contra SARS-CoV-2, a invenção tem amplo potencial de aplicação na área médica pois é adaptável para imobilizar antígenos de outros agentes infecciosos.



**PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONJUGADAS COM  
ANTÍGENOS DO VÍRUS SARS-COV-2 E DE OUTRO AGENTES INFECCIOSOS  
PARA ENSAIOS IMUNOLÓGICOS E IMUNIZAÇÃO CONTRA COVID-19 E  
OUTRAS DOENÇAS**

Campo da Invenção

[001]. A invenção descreve métodos para a obtenção de micro e nanopartículas poliméricas conjugadas com proteínas recombinantes e se aplica ao ramo da indústria farmacêutica e/ou biotecnológica para a produção de vacinas e de kits diagnósticos por sorologia.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. No final de dezembro de 2019, várias autoridades chinesas de saúde relataram o surgimento de pacientes com pneumonia de causa desconhecida, mas que epidemiologicamente estavam ligados a um mercado de frutos do mar em Wuhan (Província de Hubei – China) (Wu et al., 2020). Poucos dias depois, comprovou-se que a pneumonia tinha origem viral causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 (Lake, 2020). A doença causada foi denominada de COVID-19. A disseminação do SARS-CoV-2 teve uma escalada rápida, levando a OMS a declarar a COVID-19 uma pandemia em 11 de março de 2020. A pandemia de COVID-19 revelou a necessidade eminente de métodos diagnósticos e de vacinação para combater a doença e eventuais futuros surtos de infecção causados por outros coronavírus (Li et al., 2020).

[003]. Atualmente, a maioria das vacinas comerciais emprega patógenos atenuados para a imunização de humanos. Embora o emprego de organismos atenuados seja eficaz para a

imunização, em certas condições, especialmente nas de imunocomprometimento, há o risco de que o organismo inoculado ainda cause doença. Além disso, a atenuação requer um restrito controle de qualidade para comprovar que dentro dos lotes de vírus atenuados não há carga viral excessiva, que pudesse infectar de maneira patogênica os indivíduos vacinados. Microrganismos inativados também são amplamente utilizados como imunógenos vacinais. Esta tecnologia de produção de vacinas tem como grande desvantagem o risco de inativação insuficiente do patógeno (Brown, 1993). Ademais, vacinas não-replicantes geralmente necessitam da adição de compostos adjuvantes para que se elicite uma resposta imune protetora (Pollard e Bijker, 2020). Ademais, tecnologias vacinais clássicas – aquelas usadas e/ou testadas amplamente na literatura – não se mostraram capazes de induzir proteção imune contra inúmeros patógenos, como o HIV, dengue, malária e mesmo contra doenças respiratórias leves como o resfriado, induzido por um conjunto de vírus que inclui  $\beta$ -coronavírus humanos (Olszewska et al., 2002; Tannock et al., 2019). Por outro lado, a produção de vacinas com subcomponentes do patógeno (proteínas ou peptídeos), aliada a uma técnica adequada de administração, tem se mostrado uma alternativa segura e eficaz para imunização contra doenças infecciosas (Pati et al., 2018).

[004]. Nos últimos anos, o uso de nanopartículas como veículos para vacinas recebeu grande atenção para a entrega de antígenos e imunização. Entretanto, nanopartículas para vacinas devem atender os seguintes critérios: (i) proteger os antígenos de degradação proteolítica, (ii) facilitar a captação e o processamento de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos e (iii) devem ser seguras para o uso humano. Vacinas para uso humano têm se beneficiado pouco do uso de nanotecnologia por não atenderem

apropriadamente aos critérios supracitados, havendo indícios de riscos à saúde provocados por algumas nanopartículas, ou por não promoverem uma boa imunização (de Vrieze, 2020; Pollard e Bijker, 2020).

[005]. Nesse contexto, o polímero bacteriano denominado de polihidroxibutirato (PHB) surge como um substrato atrativo para a fabricação de nanopartículas funcionalizadas, visando a imunização humana. PHB é um poliéster hidrofóbico, insolúvel em água e com alta estabilidade na circulação sanguínea e nos tecidos (Vieyra et al., 2018). Além disso, PHB possui propriedades biodegradáveis e biocompatíveis, já sendo adotado para a fabricação de implantes médicos e como carreador de medicamentos, inclusive com liberação pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, para essas finalidades.

[006]. Do ponto de vista econômico, o PHB é mais vantajoso do que outros materiais poliméricos utilizados para a fabricação de nanopartículas, pois pode ser produzido industrialmente por fermentação microbiana utilizando insumos agroindustriais de baixo custo e abundantes. Micropartículas de PHB expondo antígenos superficialmente já foram utilizadas com sucesso para imunizar camundongos contra hepatite C (Martínez-Donato et al., 2016; Parlane et al., 2011) e tuberculose (Parlane et al., 2012, 2014), demonstrando respostas imunológicas do tipo Th1 que é particularmente relevante para a defesa persistente frente a patógenos. Contudo, esses trabalhos utilizaram sistemas de expressão recombinante em bactérias produzindo simultaneamente PHB e os antígenos de interesse; esse modelo dificulta a troca de antígenos nas partículas, o que é importante caso seja necessário adaptar a vacina a variantes de microrganismos ou a agentes infecciosos diferentes. Ademais, a aplicação do PHB como carreador de antígenos para imunização de mucosas não foi ainda

explorada na literatura. A produção de defesas diretamente nas mucosas do hospedeiro é crucial para impedir a infecção de doenças específicas desses sítios, como é o caso de infecções respiratórias (Holmgren e Czerkinsky, 2005). Outro fator importante é que a montagem com nanopartículas e proteínas recombinantes a parte, como proposta nessa invenção, aumenta a carga de imunizante pelo número de partículas e não há o carreamento de proteínas contaminantes do organismo de produção, o que pode provocar reações alérgicas e pirogênicas.

#### Descrição da abordagem do problema técnico

[007]. O fator econômico frequentemente é um ponto limitante para a produção de vacinas em larga escala. Nessa invenção, o alto custo de produção é contornado por uma abordagem simples de obtenção do antígeno e apresentação ao sistema imune na superfície de nanopartículas de polímeros biocompatíveis. O antígeno é preferencialmente produzido na bactéria *Escherichia coli*, um sistema de expressão de proteína recombinante significativamente mais econômico do que o sistema de expressão de proteínas em células de mamíferos, utilizadas para a produção de outras formas vacinais como em vacinas de vírus inativado, em vacinas de vetor recombinante, em outros exemplos de vacinas de subunidades. As nanopartículas além de funcionarem como veículo e apresentadoras dos antígenos, nesse processo sequestram seletivamente os antígenos por meio de um peptídeo de alta interação com o polímero. Esse fato facilita enormemente a produção do imunizante pois reduz etapas de purificação e garante uma forma estável de administração e distribuição do imunizante.

[008]. As nanopartículas produzidas pela presente invenção são capazes de ativar a produção de imunoglobulinas gama (IgG) contra o domínio RBD da proteína Spike do vírus SARS-CoV-2 com duas doses representando um total de 60 µg. Os títulos de IgG após as duas doses atinge níveis entre  $10^4$  a  $10^5$  superiores aos títulos obtidos por outras vacinas em fase pré-clínica. As nanopartículas descritas nesta invenção são capazes de ativar alta produção de IgG contra RBD da proteína Spike sem a necessidade de adição de adjuvantes ao imunizante. As nanopartículas descritas podem ativar a produção de IgG e delgA por via subcutânea e intra-nasal.

#### Descrição detalhada da Invenção

[009]. A presente invenção trata da produção de partículas micrométricas ou nanométricas de PHB que ancoram um antígeno de interesse para a produção de vacinas ou de reagentes para imunodiagnósticos.

[010]. A invenção compreende também a construção de DNA recombinante necessário para que o antígeno de interesse se ancore às partículas de PHB.

[011]. A invenção também define os parâmetros para a produção de um antígeno do SARS-CoV-2 para ancoragem às partículas de PHB.

[012]. As nanopartículas de PHB têm cerca de 100-200 nm de diâmetro. As micropartículas de PHB têm cerca de 10 a 20 µm de diâmetro. As partículas têm geralmente formato circular plano. As partículas têm coloração esbranquiçada. As suspensões contendo as nanopartículas tornam-se de aspecto leitoso devido à coloração das partículas. Enquanto as nanopartículas permanecem em suspensão em soluções aquosas na concentração de uso por longos períodos (dias a

semanas), as micropartículas rapidamente precipitam-se em soluções aquosas (dentro de segundos).

[013]. Para ancorar o antígeno às nanopartículas de PHB utiliza-se o domínio de ligação ao substrato (SBD) da PHA depolimerase de *Alcaligenes faecalis* (Seq. No. 02). O domínio SBD é produzido em fusão com o antígeno de interesse a partir de uma sequência de DNA recombinante.

[014]. O domínio SBD empregado nessa invenção tem apenas 55 aminoácidos, enquanto a PHA sintase de *Ralstonia eutropha* utilizada em trabalhos prévios tem 589 aminoácidos. Uma proteína de fusão do tamanho da PHA sintase pode potencialmente interferir no dobramento correto do antígeno a ser apresentado na superfície das partículas, principalmente se o antígeno é menor do que a proteína de fusão. No caso dessa invenção, o domínio RBD da proteína Spike tem 222 aminoácidos, portanto o uso da cauda SBD reduz significativamente o impacto de dobramento incorreto. Ressalta-se que a proteína RBD não é expressa solúvel em *E. coli* e que nessa invenção é apresentado um protocolo para desnaturação e renaturação. Uma proteína grande como a PHA sintase poderia interferir na capacidade da RBD renaturar ou aumentar significativamente o número de produtos com enovelamento incorreto, nas condições estabelecidas nessa invenção. Além disso, quando a proteína de fusão Antígeno - PHA sintase é expressa dentro da própria bactéria que produz o PHB, pelo fato dessa proteína estar envolvida com a sua síntese não é totalmente descartado que parte da proteína antígeno-PHA sintase possa estar englobada nas partículas, dificultando o acesso pelas células do sistema imune.

[015]. A invenção difere do estado da técnica pela construção da partícula de PHB carregada com antígeno fora de uma

bactéria recombinante, permitindo o controle da quantidade de antígeno imobilizada por lote de partículas e a aplicação da técnica para produção de imunizantes mistos.

[016]. Formulações vacinais com PHB nunca haviam sido testadas para imunizações via mucosas, e por isso o potencial de proteção imune contra doenças veiculadas por essas vias nunca foram exploradas anteriormente.

[017]. No caso da vacina formulada contra COVID-19, o antígeno preferencial é constituído pelo domínio RBD (*Receptor binding domain*) da proteína Spike de SARS-CoV-2 (aminoácidos de 319 a 541, Seq. No. 01). Como uma configuração preferencial da forma experimental da vacina e/ou do antígeno para uso em imunodiagnóstico, o gene recombinante carrega um cauda de 6 histidinas na porção N-terminal e a expressão é controlada pelo promotor T7 no plasmídeo pET29b(+). Como configuração preferencial da forma da vacina para uso clínico/comercial, a cauda de 6 histidinas é suprimida. Preferencialmente as sequências da região SBD e do antígeno RBD têm seus códons otimizados para expressão em *Escherichia coli*. O gene utilizado é, portanto, inteiramente sintetizado para essa finalidade.

[018]. Como maneira preferencial para produção da invenção em pequena escala, a bactéria *Escherichia coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) carregando o plasmídeo pET6HisRBD-SBD é cultivada em 80 mL de LB em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade a 37°C até a densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) da cultura bacteriana atingir valor de 0,4. A medida de  $DO_{600}$  é realizada em microplacas de 96 poços com 200  $\mu$ L de cultura. Atingida a  $DO_{600}$  de 0,4, a cultura é induzida com IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo, origem Sigma-Aldrich #16758) a 0,5 mM por mais 4 horas. Além da indução com IPTG, um

protocolo alternativo de autoindução a 30°C por 24 horas pode ser empregado. A cultura é dividida em 8 tubos de 10 mL cada e centrifugada a 5.000 x g, 4°C por 10 min. O sobrenadante é descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de Tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM), transferido para tubos demicrocentrífuga de 1,5 mL e sonicado 5 vezes em um sonicador de potência nominal de 500W na potência de 30% (10 s de sonicação, 10 s de repouso) em um banho de gelo. Após centrifugação (12.000 xg, 4°C, 10 min), a fração solúvel é descartada e os corpos de inclusão (IBs) lavados 3 vezes com 1 mL de Tampão B (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 0,5% Triton X-100, ureia 1 M). Os IBs lavados são dissolvidos com 1 mL de ureia 8 M à temperatura ambiente pipetando para cima e para baixo 10 vezes. Um mL de RBD-SBD desnaturada é transferido para um tubo de diálise de celulose de 5 cm com poro de exclusão de 12 kDa e dialisado contra 2 L de Tampão C (Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 150 mM) por 24 h a 25°C. A solução dialisada é centrifugada (12.000 xg, 4°C, 10 min) e o sobrenadante injetado na taxa de fluxo de 1 mL/min em uma coluna HiTrap™ Chelating (GE Healthcare Life Sciences) de 1 mL carregado com NiCl<sub>2</sub> a 100 mM e equilibrado com Tampão D (50 mM de Tris-HCl a pH 9,0, 150 mM de NaCl, 5% (m/v) de glicerol, 20 mM de imidazol). Após injeção da RBD-SBD desnaturada, a coluna é lavada com 12 volumes de tampão D. A RBD-SBD é eluída em Tampão E (50 mM de Tris-HCl a pH 9,0, 150 mM de NaCl, 200 mM de imidazol). O imidazol remanescente é removido dialisando a proteína contra 2 L de Tampão C por 24 h em temperatura ambiente.

[019]. As nanopartículas de polihidroxibutirato são produzidas pelo método de nanoprecipitação. Dez mg de PHB (preferencialmente de origem Sigma Aldrich, código #363502) são dissolvidos em 10 mL de TFE (2,2,2-trifluoroetanol) (origem Sigma Aldrich,

código #T63002) sob agitação. A solução é dialisada através de uma membrana de celulose de 12 kDa de exclusão (origem Sigma Aldrich, código # D9777) contra 2L de água destilada por 24 h. Ao final da diálise, se as partículas serão liofilizadas, pode-se adicionar Tween 80 (origem Sigma Aldrich, código #P1754) para concentração final de 1% (m/v) para prevenir a agregação. As nanopartículas podem ser usadas diretamente após diálise ou concentradas por centrifugação. Nesse caso, faz-se um gradiente com 500 µL de glicerol a 90% (m/V) pipetados no fundo do tubo de microcentrífuga e sobre essa camada pipeta-se 500 µL de glicerol a 50% (m/V). Duzentos e cinquenta µL de nanopartículas dialisadas são aplicadas na parte superior do gradiente e o tubo centrifugado a 10.000 x g, 15min, temperatura ambiente. As nanopartículas que se depositam na interfase entre glicerol a 90% (m/v) e a 50% (m/v) são removidas por pipetagem e dialisadas novamente como descrito acima para a remoção de glicerol residual. Ao adotar o protocolo descrito, obtém-se nanopartículas com diâmetro médio de 100nm.

[020]. A técnica preferencial para montagem das nanopartículas carreando o imunizante é como se segue. Cinquenta µL de nanopartículas de PHB são misturadas com 50 µL de RBD-SBD a 0,3 mg/mL. A mistura é incubada a 30°C por 5 minutos e centrifugada a 10.000 x g, 5 min, temperatura ambiente. O sobrenadante é descartado e o precipitado com as nanopartículas lavado com 500 µL de tampão Tris-HCl 50 mM a pH 8,0. O processo de lavagem das nanopartículas carreando o imunizante é repetido 3 vezes.

[021]. A presença do imunizante na superfície das nanopartículas é verificada por ensaio de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática). Após a imobilização da proteína RBD-SBD nas nanopartículas de PHB, a mistura é centrifugada (10.000 x g, 2 min,

temperatura ambiente) e o sobrenadante é removido. Acrescenta-se 300 µL de solução de bloqueio utilizando BSA 2% (m/v) albumina de soro bovino (origem Sigma Aldrich, código # A6003) 2% em PBS tampão fosfato salino 1x) e as amostras são incubadas a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, a mistura é centrifugada (10.000 x g, 2 min, temperatura ambiente) novamente e o sobrenadante é removido. As nanopartículas são lavadas com PBS 1x mais 3 vezes. Depois, adiciona-se 200 µL de anticorpo primário anti-Spike-RBD-SARS-CoV-2 de coelho (origem Sino Biological Inc, código # 40592-T62) diluído 1:1000 em solução de bloqueio (BSA 2%, m/v). Incuba-se a mistura por 1 hora a temperatura ambiente. Depois, a amostra é centrifugada (10.000 x g, 2 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante é removido. As nanopartículas são lavadas 3 vezes com tampão PBS 1x e adiciona-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (origem Bio-Rad, código # 1706515) diluído 1:3000 em solução de bloqueio (BSA 2%, m/v). A mistura é novamente incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse intervalo, a mistura é centrifugada (10.000 x g, 2 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante é removido. A amostra é lavada mais 3 vezes com tampão PBS 1x e, então, adiciona-se 100 µL de TMB (3,3',5',5'-Tetrametilbenzidina) (origem Sigma Aldrich, código # T4444). Após 5 minutos, a mistura é novamente centrifugada (10.000 x g, 2 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante é transferido para uma microplaca de microtitulação de 96 poços de fundo chato. Posteriormente, adiciona-se 100 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1N) para bloquear a reação. Em seguida, a absorbância das amostras é lida a 450 nm em leitor de microplaca.

Exemplo 1: Imunização de camundongos com micropartículas ou nanopartículas de PHB carreando RBD-SBD elicit alta produção de anticorpos

[022]. A administração do imunizante em camundongos é capaz de induzir a produção de títulos de anticorpos contra o antígeno acima de  $1:10^5$ , ou seja, substancialmente maiores do que de imunizantes descritos no estado da técnica.

Descrição das Figuras

[023]. Figura 1. Expressão da proteína RBD-SBD em *E. coli*.

[024]. Géis de eletroforese SDS-PAGE das frações da expressão com e sem indução de IPTG da proteína RBD-SBD de SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 em *Escherichia coli*. Marcadores de massa molecular (MM), fração bruta (B), fração insolúvel (I) e fração solúvel.

[025]. Figura 2. Purificação da proteína RBD-SBD a partir dos corpos de inclusão.

Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações da purificação da proteína RBD-SBD de SARS-CoV-1 por cromatografia de afinidade em coluna HiTrap™-Chelating. Marcadores de massa molecular (MM), fração não ligada (NL), fração de lavagem (L) e frações eluídas com tampão em gradiente de imidazol (T).

[026]. Figura 3. Imobilização da RBD-SBD na superfície de nanopartículas de PHB.

Gel de eletroforese SDS-PAGE das frações da imobilização da proteína RBD-SBD de SARS-CoV-1 em nanopartículas de PHB. Marcadores de massa molecular (MM), fração não ligada (NL), fração de lavagem (L1), fração imobilizada nas nanopartículas de PHB (NPs + RBD) e amostra da proteína RBD-SBD.

[027]. Figura 4. Reconhecimento da RBD-SBD imobilizada na superfície das nanopartículas por anticorpo anti-RBD.

Esquema do ensaio de ELISA da proteína RBD-SBD de SARS-CoV-1 e 2 imobilizadas em nanopartículas de PHB. (A) foto do ensaio de ELISA realizado em tubos de microcentrifuga, com respectivos controles e diluições do anticorpo secundário. (B) foto da microplaca de microtitulação. (C) tabela com os resultados da leitura da absorbância das amostras em 450 nm.

[028]. Figura 5. Produção de anticorpos usando a presente invenção, na presença ou ausência de adjuvantes vacinais

Resultados de produção de anticorpos usando a presente invenção, na presença ou ausência de adjuvantes vacinais. Observar que o imunógeno desta invenção requer duas doses (na versão de inóculo parenteral) para a produção satisfatória de anticorpos. Observar que a adição de adjuvante “padrão-ouro” (adjuvante completo de Freund) não resulta em melhora na resposta vacinal.

[029]. Figura 6. Produção de anticorpos em camundongos após o protocolo de imunização.

Resultados de produção de anticorpos em camundongos após o protocolo de imunização. (a) Resultado do estado da técnica (Graham et al., 2020). (b) Resultado obtido com a presente invenção. Observar a maior quantidade de anticorpos obtida na presente invenção do que no estado da técnica. Observar que o imunógeno objeto desta invenção é igualmente eficaz quando a partícula de PHB está nos formatos de nanopartícula ou micropartícula.

Referências

[030]. BROWN, F. Review of accidents caused by incomplete inactivation of viruses. *Developments in biological standardization*, v. 81, p. 103-107, 1993.

[031]. DE VRIEZE, J. Suspicions grow that nanoparticles in Pfizer's COVID-19 vaccine trigger rare allergic reactions. *Science*, Dez. 2020. doi:10.1126/science.abg2359.

[032]. GRAHAM, Simon P. et al. Evaluation of the immunogenicity of prime-boost vaccination with the replication-deficient viral vectored COVID-19 vaccine candidate ChAdOx1 nCoV-19. *NPJ vaccines*, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2020.

[033]. HOLMGREN, Jan; CZERKINSKY, Cecil. Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*, v. 11, n. 4, p. S45-S53, 2005.

[034]. LAKE, Mary A. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. *Clinical Medicine Journal*, v. 20, n. 2, p. 124-127, 2020.

[035]. LI, Haiou, ZHOU, Yunjiao, ZHANG, Meng, WANG, Haizhou, ZHAO, Qiu, LIU, Jing Updated approaches against SARS-CoV-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 64, n. 6, e00483-20, 2020.

[036]. MARTÍNEZ-DONATO, G., PINIELLA, B., AGUILAR, D., OLIVERA, S., PÉREZ, A., CASTAÑEDO, Y., ALVAREZ-LAJONCHERE, L., DUEÑAS-CARRERA, S., LEE, J.W., BURR, N., GONZALEZ-MIRO, M., REHM, B.H.A. Protective T cell and antibody immune responses against hepatitis C virus achieved using a biopolyester-bead-based vaccine delivery system. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 23, n. 4, p. 370 – 378, 2016.

[037]. OLSZEWSKA, Wieslawa; ZAMBON, Maria; OPENSHAW, Peter JM. Development of vaccines against common colds. *British Medical Bulletin*, v. 62, n. 1, p. 99-111, 2002.

[038].PARLANE, N.A., GRAGE, K., LEE, J. W., BUDDLE, B. M., DENIS, M., REHM, B.H.A. Production of a particulate hepatitis C vaccine candidate by an engineered *Lactococcus lactis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 24, p. 8516–8522, 2011.

[039].PARLANE, N. A., GRAGE, K., MIFUNE, J., BASARABA, R. J., WEDLOCK, D. N., REHM, B. H. A., BUDDLE, B. M. Vaccines displaying mycobacterial proteins on biopolyester beads stimulate cellular immunity and induce protection against tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 19, n. 1, p. 37-44, 2012.

[040].PARLANE, N. A., REHM, B. H. A., WEDLOCK, D. N., BUDDLE, B. M. Novel particulate vaccines utilizing polyester nanoparticles (bio-beads) for protection against *Mycobacterium bovis* infection-A review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 158, n 1–2, 2014.

[041].PATI, R., SHEVTSOV, M., SONAWANE, A. Nanoparticle vaccines against infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 9, article 2224, 2018.

[042]. POLLARD, Andrew J.; BIJKER, Else M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, v. 21, p. 83–100, 2021.

[043]. TANNOCK, Gregory A.; KIM, Hyunsuh; XUE, Lumin. Why are vaccines against many human viral diseases still unavailable; an historic perspective? *Journal of medical virology*, v. 92, n. 2, p. 129-138, 2020.

[044].VIEYRA, H., JUÁREZ, E., LÓPEZ, U. F., MORALES, A. G., TORRES, M. Cytotoxicity and biocompatibility of biomaterials based in polyhydroxybutyrate reinforced with cellulose nanowhiskers determined in human peripheral leukocytes. *Biomedical Materials*. v. 13, n. 4, 045011, 2018.

[045].WU, Di, WU, Tiantian, LIU, Qun, YANG, Zhicong. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. International Journal of Infectious Diseases, v. 94, p. 44-48, 2020.

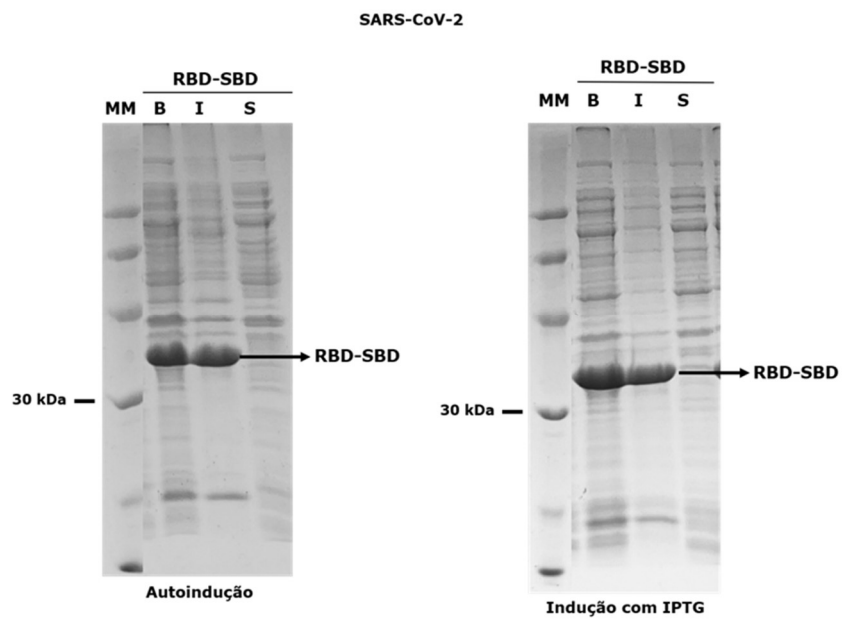
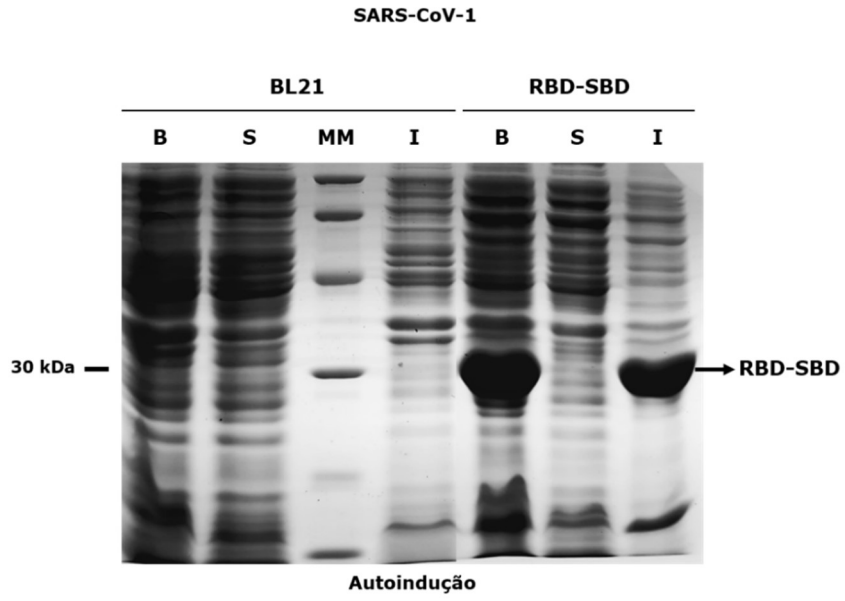
## REIVINDICAÇÕES

1. Método para ativar resposta imune em um indivíduo, ou para imunizá-lo contra um patógeno, **caracterizado pelo** fato de que o método compreende a administração de nanopartículas do polímero polihidroxitirato compreendendo um peptídeo de fusão, no qual o antígeno estará ancorado.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o indivíduo estará infectado com o patógeno ou será imunizado contra o patógeno.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** ligação de um antígeno exógeno capaz de desencadear a resposta imune.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** ligação de um antígeno exógeno recombinante capaz de desencadear a resposta imune.
5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a nanopartícula de polihidroxitirato compreende: i) dois ou mais antígenos diferentes; ou ii) dois ou mais domínios de ligação diferentes capazes de se ligar a um antígeno; ou iii) pelo menos um antígeno capaz de induzir uma resposta imune e pelo menos um domínio de ligação capaz de se ligar a um antígeno capaz de induzir uma resposta imune mediada por células.
6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a nanopartícula de polihidroxitirato compreende opolipeptídeo de fusão SBD e i) pelo menos um antígeno de SARS-CoV-2 ou ii) pelo menos um fragmento proteico derivado de um antígeno de SARS-CoV-2.

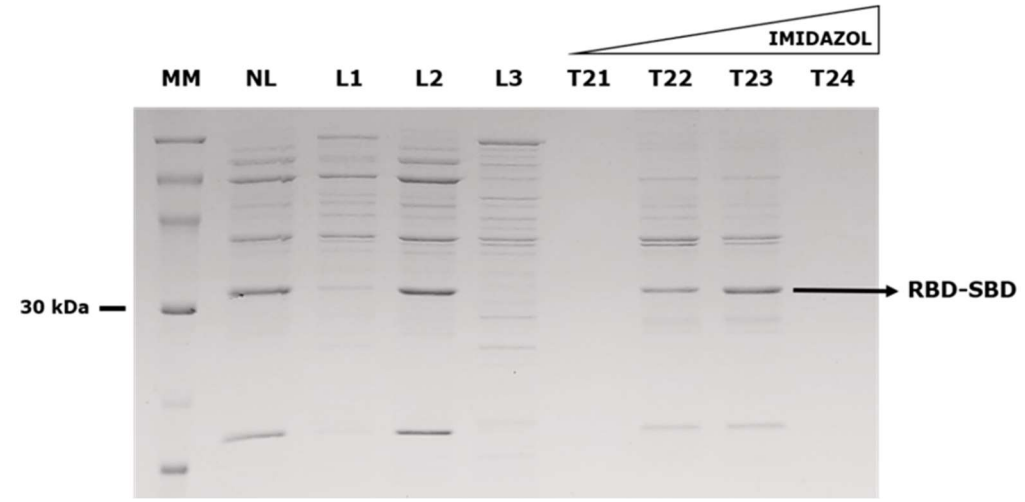
7. Método, acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a nanopartícula de polihidroxibutirato contém o peptídeo de fusão SBD ligado ao antígeno domínio RBD da proteína Spike de SARS-CoV-2 (RBD-SBD), proteína N ou Nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 (N-SBD), proteína E ou Envelope de SARS-CoV-2 (E-SBD), ou em combinações dos antígenos RBD-SBD com N-SBD e RBD-SBD com E-SBD.

8. Método de imunização de um indivíduo contra a COVID-19, **caracterizado pelo** fato de que compreende a administração de pelo menos uma nanopartícula de polihidroxibutirato compreendendo um ou mais antígenos de SARS-CoV-2 fusionados ao peptídeo SBD.

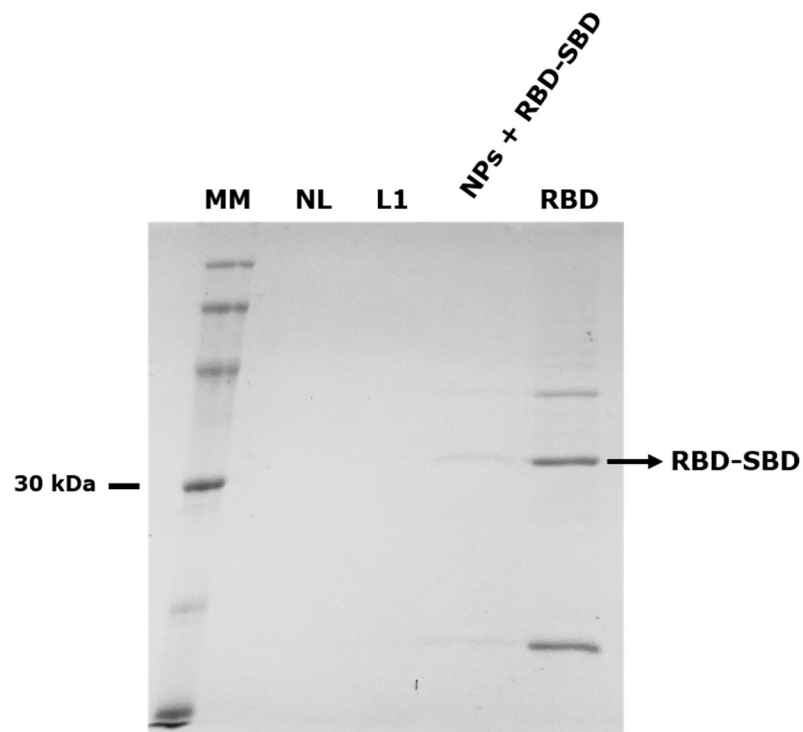
**Figura 1**



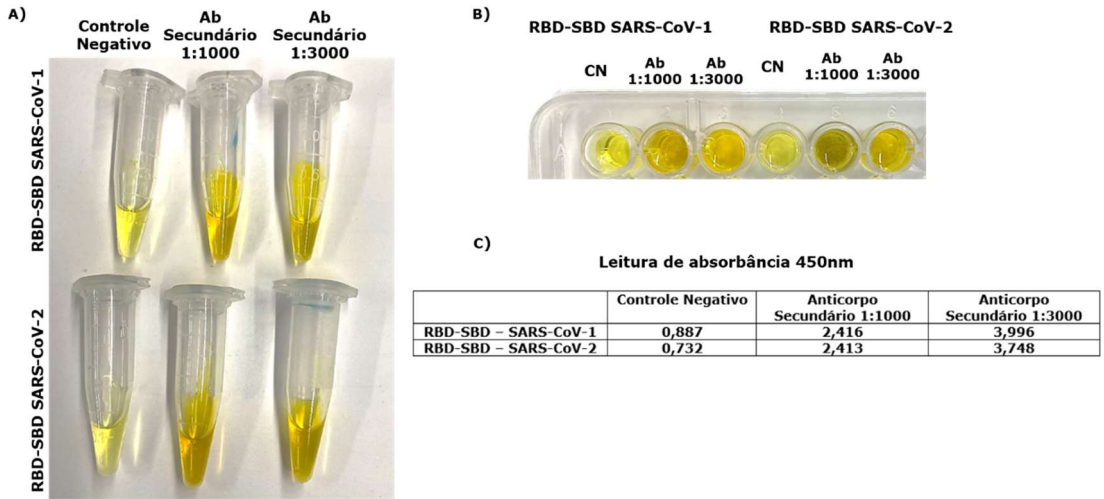
**Figura 2**



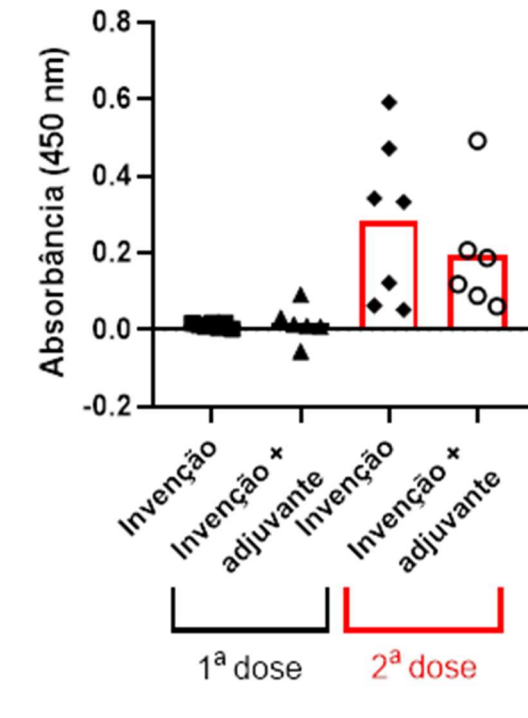
**Figura 3**

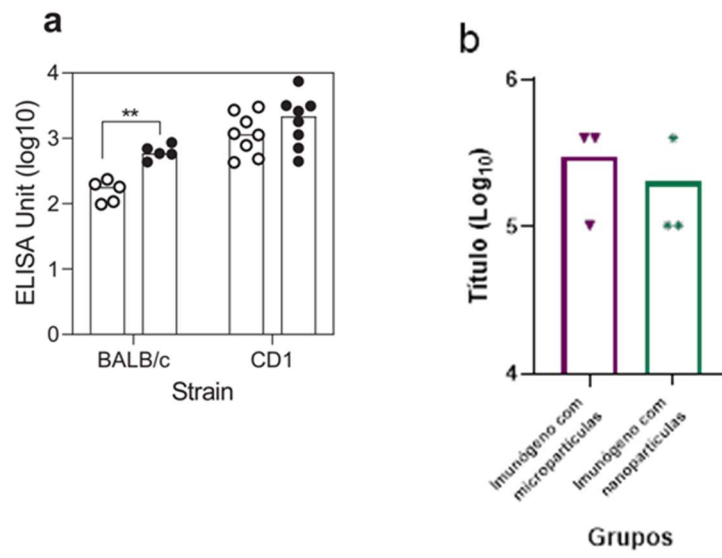


**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**

**RESUMO****PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONJUGADAS COM ANTÍGENOS DO VÍRUS SARS-COV-2 E DE OUTROS AGENTES INFECCIOSOS PARA ENSAIOS IMUNOLÓGICOS E IMUNIZAÇÃO CONTRA COVID-19 E OUTRAS DOENÇAS**

A invenção descrita consiste no processo de obtenção de partículas poliméricas em micro e nanoescala e de antígenos recombinantes que juntos formam um veículo imunizante. A invenção descreve os seguintes detalhes técnicos: (i) obtenção das nanopartículas do polímero polihidroxibutirato, (ii) expressão, purificação e imobilização do antígeno na superfície das partículas e (iii) imunização de camundongos e análise dos títulos vacinais contra o antígeno. Embora a invenção tenha sido desenhada e demonstrada como imunizante contra SARS-CoV-2, a invenção tem amplo potencial de aplicação na área médica pois é adaptável para imobilizar antígenos de outros agentes infecciosos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: SEQ02\_ST25.txt
- Data de Geração do Código: 18/04/2022
- Hora de Geração do Código: 15:22:06
- Código de Controle:
  - Campo 1: AD3219A83DECB7F4
  - Campo 2: 6AE77C059B6CCD5D