

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

(22) Data de pedido: **2000.02.22**

(30) Prioridade(s): **1999.02.22 GB 9904028**  
**1999.09.23 GB 9922561**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.11.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.02.20**  
**106/2008**

(73) Titular(es):

**HEALTH PROTECTION AGENCY**  
**PORTON DOWN, SALISBURY WILTSHIRE SP4**  
**0JG GB**  
**IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED GB**

(72) Inventor(es):

**ANDREW ROBINSON GB**  
**ANDREW RICHARD GORRINGE GB**  
**MICHAEL JOHN HUDSON GB**  
**PHILIPPA BRACEGIRDLE GB**  
**JOHN SIMON KROLL GB**

(74) Mandatário:

**LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO**  
**PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598**  
**CHARNECA DA CAPARICA PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE VACINAÇÃO CONTRA NEISSERIA**

(57) Resumo:

## DESCRIÇÃO

### COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE VACINAÇÃO CONTRA NEISSERIA

A presente invenção refere-se a vacinas e métodos para a preparação de vacinas que estimulam uma resposta imunitária. Em particular, a presente invenção refere-se a vacinas que proporcionam um espectro de protecção imunitária alargado à infecção microbiana.

A infecção por organismos patogénicos é uma das maiores causas de doenças crónicas e agudas. Em particular, a infecção resultante de fontes microbianas - tais como bactérias, vírus, protozoários - continua a ser responsável pela perda de milhões de vidas em todo o Mundo. À medida que as espécies microbianas se tornam cada vez mais resistentes aos antibióticos convencionais, seria desejável proporcionar meios alternativos e preferentemente profiláticos para a protecção e a luta contra a infecção microbiana.

A meningite meningocócica é de particular importância como problema de saúde global e em muitos países a incidência da infecção está a aumentar. *Neisseria meningitidis* (o meningococo) é o organismo que causa a doença e é também responsável pela septicemia meningocócica, a qual está associada com aparecimento rápido dos primeiros sintomas e elevada mortalidade, sendo fatais cerca de 22% dos casos.

Actualmente, as vacinas com o objectivo de proporcionar imunidade protectora contra a doença meningocócica proporcionam apenas uma protecção limitada devido às muito diferentes estirpes de *N. meningitidis*. As vacinas com base em antigénios de serogrupos, os polissacáridos capsulares,

apenas oferecem apenas protecção de curto tempo de vida contra infecção e não protegem contra muitas estirpes frequentemente encontradas na América do Norte e na Europa. Ainda outra desvantagem destas vacinas é o facto de proporcionarem baixos níveis de protecção para crianças com menos de 2 anos de idade, um dos grupos mais vulneráveis que são geralmente susceptíveis à infecção. Estão agora em uso no Reino Unido vacinas conjugadas mais recentes que abordam alguns destes problemas mas que serão apenas eficazes contra o serogrupo C do meningococo.

Gold *et al.* (Journal of Infectious Diseases, volume 137, no. 2, Fevereiro de 1978, páginas 112-121) relataram que ser-se portador de *N. lactamica* pode ajudar no desenvolvimento de imunidade natural a *N. meningitidis* por indução de anticorpos com reacção cruzada. Esta conclusão foi baseada na observação de anticorpos com reacção cruzada com actividade bactericida dependente de complemento produzidos em resposta a infecção com *N. lactamica*. No entanto, Cann e Rogers (J. Med. Microbiol., volume 30, 1989, páginas 23-30) detectaram anticorpos contra antigénios comuns de espécies patogénicas e comensais de *Neisseria*, mas observaram também que o anticorpo contra os mesmos antigénios estava presente tanto em soro bactericida como em soro não bactericida. Assim, não foi possível identificar quaisquer anticorpos bactericidas com reacção cruzada.

Foram sugeridas vacinas vivas atenuadas para a doença meningocócica por Tang *et al.* (Vaccine, 17, 1999, páginas 114-117) nas quais uma estirpe viva, atenuada de *N. meningitidis* poderia ser administrada através de mucosas. Tang também comentou sobre a utilização de bactérias comensais para proteger contra a infecção por bactérias

patogénicas, concluindo que os epitopos com reacção cruzada que induzem a protecção contra infecção meningocócica não foram definidos pelo que a utilização de estirpes geneticamente modificadas de *N. meningitidis* seria preferida.

É desejável proporcionar ainda outra vacina que confere imunidade protectora contra a infecção por *N. meningitidis*. É ainda desejável proporcionar uma vacina que confere imunidade protectora tanto na população infantil como adulta e cuja protecção seja de longo prazo. Pode também ser vantajoso proporcionar uma vacina que proteja contra infecção sub-clínica, ou seja, em que os sintomas de infecção meningocócica não são imediatamente aparentes e que o indivíduo infectado possa actuar como veículo do patogénio. Seria ainda vantajoso proteger contra todas ou uma gama alargada de infecções por estirpes de *N. meningitidis*, especialmente, gonorreia.

WO-A-96/29412 descreve o isolamento de um antigénio de superfície de 22 kDa de *N. meningitidis* que está imunologicamente acessível. Mostra-se que o antigénio de 22 kDa está conservado noutras espécies de *Neisseria* incluindo a *N. lactamica* comensal.

Aoun *et al* (Annals de l'Institut Pasteur Microbiol. Vol. 139, pp 203-212 (1988)) refere-se à identificação de anticorpos num paciente humano contra um antigénio de superfície de meningococo de 70 kDa e o seu valor como componente de vacina. Mostrou-se que o soro convalescente de veículos humanos também se ligava à proteína de 70 kDa de *N. gonorrhoeae*. No entanto, apesar das espécies de *Neisseria* possuírem o antigénio de 70 kDa provocavam menos frequentemente uma resposta por anticorpos em crianças.

Gomez et al (Vaccine, Vol. 14, pp 1340-1346 (1996)) descreve a purificação de uma proteína reprimível por ferro de 37 kDa (Fbp) de *N. meningitidis*. Verificou-se que os anticorpos de ratinho contra a Fbp de *Neisseria* patogénicas ligam-se às Fbps das *N. lactamica* e *N. sicca* comensais.

É ainda desejável proporcionar uma vacina contra outras infecções por *Neisseria*, especialmente gonorreia.

É um objecto da presente invenção proporcionar composições contendo componentes imunoestimuladores, e vacinas neles baseados, que permitem ultrapassar ou pelo menos melhorar as desvantagens na técnica.

A presente invenção baseia-se na utilização de *Neisseria* comensal numa vacina contra a doença. Deste modo, uma espécie comensal de *Neisseria* tal como *N. lactamica* pode ser utilizada como vacina viva ou uma vacina de célula inteira morta, ou numa vacina contendo fracções de *N. lactamica*. Foi surpreendentemente demonstrado que ratinhos imunizados de acordo com a presente invenção com células inteiras mortas de *N. lactamica* e preparações de membranas externas são protegidos no teste letal com meningococo intraperitoneal, e que vacinas compostas por um extracto de detergente de células de *N. lactamica* ou suas fracções, separadas por electroforese preparativa, também protegem os ratinhos de teste letal como meningococo. Estes resultados foram obtidos utilizando ratinhos e o modelo murino utilizado é tido como sendo preditivo dos correspondentes efeitos imunogénicos e de vacinação em humanos.

Deste modo, um primeiro aspecto da presente invenção proporciona uma composição de vacina compreendendo *Neisseria* comensal ou uma sua preparação de membrana

externa. As *Neisseria* comensais são seleccionadas do grupo consistindo em *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. polysaccharea*, *N. sicca* e *N. subflava*. São também apresentadas uma composição imunogénica compreendendo uma *Neisseria* comensal ou um componente, extracto ou seu derivado imunogénico e um veículo farmacêuticamente aceitável.

A composição da invenção é particularmente adequada para a vacinação contra infecção de um animal. O termo "infecção" tal como aqui utilizado pretende incluir a proliferação de um organismo patogénico no interior e/ou nos tecidos de um organismo hospedeiro. Tais organismos patogénicos incluem tipicamente bactérias, vírus, fungos e protozoários, apesar de se considerar que o crescimento de qualquer micróbio no interior e/ou nos tecidos de um organismo está incluído no termo "infecção".

Os microrganismos comensais são aqueles que podem colonizar um organismo hospedeiro sem sinais de doença. São adequadas para utilização na invenção diferentes *Neisseria* comensais, e estas *Neisseria* comensais são seleccionadas do grupo que consiste em *N. lactamica*, *N. cinerea*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. polysaccharea*, *N. sicca* e *N. subflava*. Sabe-se que diferentes espécies destes organismos comensais colonizam as áreas bucal ou nasal, ou outras superfícies mucosas e assim cada espécie pode ser administrada de acordo com a área conhecida do corpo que normalmente coloniza. Igualmente, a utilização de uma composição da invenção pode resultar no estímulo da produção de anticorpos protectores de novo ou se o indivíduo já foi colonizado num certo grau, pode resultar no aumento de anticorpos naturalmente existentes.

O “extracto” ou “componente” é um extracto ou componente que é imunogénico tal como anticorpos contra o extracto ou componente de uma *Neisseria* comensal apresenta reacção cruzada uma *Neisseria* patogénica, em particular *N. meningitidis*.

O termo “derivado” é utilizado para descrever tipos e estirpes de *Neisseria* comensais que são de algum modo modificados ou atenuados de modo a diferir das espécies selvagens; por exemplo, uma composição de vacina compreendendo uma *Neisseria* comensal que apresenta resistência a certos tipos de compostos antibióticos, que podem ser utilizados com vantagem em combinação com tais antibióticos no tratamento de infecção.

É uma vantagem da invenção o facto da vacinação contra doenças causadas por *Neisseria* poder assim ser conseguida utilizando uma estirpe não patogénica de *Neisseria*, tornando a vacinação um procedimento seguro. Além disso, a protecção conferida surpreendentemente não está restringida a um serotipo, subtipo ou serogrupo específico do meningococo, mas tem uma eficácia protectora geral.

Uma outra vantagem da invenção é que as *Neisseria* comensais que são objecto da invenção não podem reverter para tipos virulentos. Conhece-se no campo da vacinação que a utilização de patogénios vivos, atenuados e que esta utilização envolve o risco do organismo atenuado poder reverter para a virulência. Este risco é evitado através da presente invenção. Além disso, *N. meningitidis* possui muitos factores de virulência cujos papéis definidos na patogénese são desconhecidos e podem então possuir factores de virulência não reconhecidos. Assim, uma vantagem

adicional da invenção é que a composição pode ser utilizada com confiança relativamente ao seu nível de segurança.

O método da invenção aplica-se à vacinação contra várias infecções, preferentemente mas não apenas infecções por *Neisseria*. Numa realização específica da invenção, foi demonstrada a protecção contra a doença meningocócica. A invenção aplica-se também à vacinação geralmente contra infecção por *Neisseria*, incluindo gonorreia, e ainda contra a infecção por outros microrganismos patogénicos. A invenção proporciona ainda a vacinação que se deseja ou estimulando ou dessensibilizando o sistema imunitário.

A composição pode compreender especificamente *Neisseria* comensais mortas as quais, por exemplo, podem ser obtidas aquecendo ou suspendendo *Neisseria* comensais numa mistura de agentes bactericidas tais como tiomersal e formaldeído.

A composição pode também compreender *Neisseria* comensais vivas. Como mencionado, é opcional mas não geralmente necessária a utilização de *Neisseria* comensais atenuadas dado que estes organismos são virulentos.

Numa realização da invenção, um componente imunogénico ou extracto de uma *Neisseria* comensal é seleccionado de uma preparação vesicular da membrana externa, uma preparação da membrana externa, lipo-oligossacárido e uma fracção de proteína.

A preparação da membrana externa e a fracção proteica de *N. lactamica*, por exemplo, pode ser obtida de *N. lactamica* cultivada na presença ou na ausência de ferro. A fracção proteica de *N. lactamica* aqui apresentada é convenientemente obtida através da suspensão de células ou



membranas de *N. lactamica* na presença de detergente e incubando a suspensão de modo a extrair proteínas de *N. lactamica*.

Alternativamente, diversas outras técnicas são conhecidas para a extracção dos componentes da membrana externa - tais como fracções proteicas, lipo-oligossacáridos e lipo-polissacáridos - de preparações de células e são adequadas para obter os componentes ou extractos imunogénicos de *Neisseria* comensais. Exemplos de técnicas convencionais para este fim incluem a utilização de uma variação na concentração de sal, agentes caotrópicos, variação de pH (elevado ou baixo), digestão enzimática e ruptura mecânica.

Diversas fracções diferentes aqui apresentadas são adequadas para utilização na vacinação contra a doença meningocócica. São particularmente úteis fracções com um peso molecular inferior a 50 kDa, de peso molecular superior a 40 kDa e inferior a 70 kDa, e de peso molecular superior a 60 kDa.

Tal como aqui apresentado proporciona-se uma composição para desencadear uma resposta imunitária e adequada para utilização na vacina de um indivíduo contra infecção por *Neisseria*, mais especificamente a doença meningocócica, compreendendo um componente antigénico ou vários componentes antigénicos com as propriedades:

- (a) um peso molecular de 50 kDa ou menos;
- (b) passível de obtenção de *N. lactamica*; e
- (c) os anticorpos contra o(s) componente(s) obtidos de *N. lactamica* apresentam reacção cruzada com *N. meningitidis*.

Na utilização de uma composição contendo tal componente, extraído utilizando detergente, todos os ratinhos tratados com este componente sobreviveram a um teste com uma dose  $2 \times 10^7$  UFC de *N. meningitidis* e três dos cinco ratinhos sobreviveram a uma dose mais elevada de  $6 \times 10^8$  UFC.

Também é apresentada uma composição para desencadear uma resposta imunitária e adequada para utilização na vacinação de um indivíduo contra infecção por *Neisseria*, mais especificamente doença meningocócica, compreendendo um componente antigénico ou componentes antigénicos com as propriedades:

- (a) um peso molecular de pelo menos 40 kDa e até 70 kDa;
- (b) passível de obtenção de *N. lactamica*; e
- (c) os anticorpos contra o(s) componente(s) obtidos de *N. lactamica* apresentam reacção cruzada com *N. meningitidis*.

Na utilização de tal componente obtido utilizando um extracto de detergente de *N. lactamica*, quatro de cinco ratinhos tratados com o componente sobreviveram a um teste com uma dose  $2 \times 10^7$  UFC de *N. meningitidis* e três os ratinhos que receberam uma dose mais elevada de  $6 \times 10^8$  UFC sobrevieram durante mais tempo do que aqueles do grupo de controlo.

Também se apresenta uma composição para desencadear uma resposta imunitária e adequada para utilização na vacinação de um indivíduo contra infecção por *Neisseria*, mais especificamente doença meningocócica, compreendendo um componente antigénico ou componentes antigénicos com as propriedades:

- (a) um peso molecular de pelo menos 60 kDa;
- (b) passível de obtenção de *N. lactamica*; e
- (c) os anticorpos contra o(s) componente(s) obtidos de *N. lactamica* apresentam reacção cruzada com *N. meningitidis*.

Na utilização de tal componente obtido utilizando um extracto de detergente de *N. lactamica*, um de cinco ratinhos sobreviveram a um teste com uma dose  $2 \times 10^7$  UFC de *N. meningitidis* e, apesar de todos os ratinhos sucumbirem a uma dose elevada de  $6 \times 10^8$  UFC, os seus tempos de sobrevivência foram superiores do que aqueles do grupo de controlo que não receberam o componente.

Num exemplo das composições apresentadas em utilização, descrito em maior detalhe abaixo, as proteínas nas gamas de dimensão de 25-35 kDa e 35-43 kDa, extraídas de *Neisseria comensais*, conferiram um nível de protecção imunitária significativo quando administradas a ratinhos como composição de vacina.

Como exemplo de um método de extracção de um componente antigénico aqui apresentado, um método de extracção compreende:

- (i) a suspensão de células de *N. lactamica* numa solução aquosa de detergente;
- (ii) a incubação da suspensão de modo a extrair o componente antigénico de *N. lactamica*;
- (iii) a centrifugação da suspensão para separar a suspensão num sobrenadante e um sedimento; e

(iv) o fraccionamento do componente antigénico do sobrenadante.

O método específico pode ser modificado de acordo com o protocolo de extracção seleccionado pelo utilizador, por exemplo, através da utilização de uma elevada concentração salina no passo inicial (i). Noutras realizações da invenção, o componente antigénico é obtido utilizando tecnologia recombinante através da expressão de uma sequência de *N. lactamica* num hospedeiro adequado tal como *E. coli*.

Num segundo aspecto, a invenção refere-se a uma composição para vacinação contra infecção por *Neisseria* compreendendo *Neisseria* comensal ou um seu componente, extracto ou derivado imunogénico e um veículo farmacêuticamente aceitável, em que a *Neisseria* comensal compreende e expressa um gene de uma *Neisseria* patogénica.

Este aspecto da invenção oferece o benefício da utilização de um organismo comensal para administrar e/ou apresentar ao receptor um antigénio de uma *Neisseria* patogénica. O gene codifica opcionalmente para um antigénio de superfície ou uma proteína que é secretada, e pode codificar para um antigénio de, por exemplo, *N. meningitidis* ou *N. gonorrhoeae*. As *Neisseria* comensais podem ser vivas ou mortas.

Numa realização do segundo aspecto da invenção proporciona-se uma composição para vacinação contra a doença meningocócica compreendendo uma *Neisseria* comensal e um veículo farmacêuticamente aceitável, em que a *Neisseria* comensal compreende e expressa um gene de *N. meningitidis*.

O gene de *N. meningitidis* pode codificar por exemplo para uma proteína de ligação à transferrina, uma superóxido dismutase (SOD) por exemplo uma Cu, Zn SOD, proteína A de superfície de *Neisseria* ("NspA"), uma porina ou outra proteína de membrana externa. As sequências genéticas para a maioria destes antigénios são conhecidas na literatura. Kroll et al. em *Microbiology* 141 (Parte 9), 2271-2279 (1995) descreve a sequência de Cu, Zn-SOD. Martin et al. em *J Exp Med*, 1997, 7 de Abril, 185 (7), pp. 173-183 descreve a sequência de NspA de *N. meningitidis*.

A invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma composição de acordo com o primeiro ou segundo aspecto da invenção mais um veículo farmaceuticamente aceitável.

Num terceiro aspecto, a invenção proporciona a utilização de uma composição de acordo com a o primeiro e o segundo aspectos da invenção para o fabrico de um medicamento para a vacinação contra infecção por *Neisseria*.

Na utilização de uma realização da invenção descrita num exemplo abaixo, o medicamento é para vacinação contra a doença meningocócica, e compreende uma composição de acordo com o primeiro e o segundo aspecto da invenção.

A invenção refere-se também a uma estirpe de uma *Neisseria* comensal, tal como *N. lactamica*, geneticamente modificada de modo a expressar um gene de uma *Neisseria* patogénica. O gene de *N. meningitidis* pode por exemplo codificar para uma proteína seleccionada de uma proteína de ligação à transferrina, uma SOD, por exemplo, uma Cu, Zn-SOD, NspA, uma porina ou outra proteína de membrana.

Também se apresenta um método de extracção de uma proteína para incorporação numa composição adequada para vacinação contra a doença meningocócica, compreendendo:

(i) a suspensão de *Neisseria* comensal, por exemplo, células de *N. lactamica* na presença de detergente; e

(ii) a incubação da suspensão de modo a extrair a fracção proteica das células.

A fracção proteica pode ser adequadamente de peso molecular de 50 kDa ou menos, pelo menos 40 kDa e até 90 kDa ou pelo menos 80 kDa.

A composição pode ser combinada com um veículo farmacêuticamente aceitável - por exemplo os adjuvantes sais de alumínio apesar de ser adequado qualquer veículo adequado para administração oral, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica ou qualquer outra via de administração - para produzir uma composição farmacêutica para o tratamento da doença meningocócica. *Neisseria* comensais que são colonizadoras da boca podem ser administradas num elixir para a boca e as colonizadoras nasais num *spray* nasal.

Sabe-se que as proteínas de ligação à transferrina se situam nas membranas externas de diversas bactérias Gram negativas, tais como *N. meningitidis*. As formulações da composição da presente invenção com veículos convencionais ou adjuvantes e opcionalmente ainda suplementadas por um ou mais antigénios da espécie *Neisseria*, opcionalmente produzidas de forma recombinante, por exemplo, Cu-Zn SOD, a NspA de 22 kDa, porinas; antigénios de gonorreia ou proteínas de ligação à transferrina proporcionam uma

composição para o tratamento da infecção por estas bactérias.

Na presente invenção, o termo “proteína de ligação à transferrina” ou “Tbp” refere-se a uma proteína que ou isoladamente se liga à transferrina ou pode ser parte de um complexo de proteínas que se liga à transferrina.

A vacina viva de acordo com a presente invenção pode ser administrada parenteralmente ou à mucosa, por exemplo através de inoculação intra-nasal ou oral. Uma bactéria morta ou vacina de subunidade pode também ser dada por esta via, ou formulada para administração oral. Uma vacina de subunidade é convenientemente administrada através da via parentérica.

Ainda outro aspecto da invenção refere-se a uma composição compreendendo uma *Neisseria* comensal, ou um seu componente, extracto ou derivado imunogénico, em que a referida *Neisseria* compreende um produto de gene heterólogo.

OS produtos do gene heterólogo da invenção incluem tipicamente péptidos, proteínas e sequências anti-senso que são codificadas por uma sequência genética que não é nativa da *Neisseria* comensal. Produtos genéticos heterólogos típicos da invenção incluem, por exemplo, proteínas bacterianas, proteínas virais ou péptidos de superfície, antígenos e anticorpos e fragmentos destes. O produto genético heterólogo da invenção pode também ser qualquer antígeno encontrado num organismo patogénico.

Numa realização da invenção, a composição compreende uma *Neisseria* comensal na qual foi transformado um vector de expressão contendo uma sequência genética que codifica para

um produto genético heterólogo. Proteínas específicas adequadas para utilização na invenção incluem tipicamente:

Proteínas virais - tais como o antigénio de superfície do vírus da hepatite B; a glicoproteína G do vírus da raiva; a glicoproteína D do vírus herpes simplex; a glicoproteína do vírus Epstein-Barr; a glicoproteína do vírus da gripe; a nucleoproteína do vírus da estomatite vesicular; a glicoproteína G do vírus respiratório sincitial humano; o envelope do vírus da imunodeficiência humana (VIH); subunidades do rotavírus; subunidades do vírus do sarampo; e subunidades do vírus vacínia.

Proteínas bacterianas - tais como subunidades fimbriais de *Bordetella pertussis*; proteínas de superfície de *Bordetella pertussis*; subunidades de *Bacillus anthracis*; subunidades de *Escherichia coli*; e subunidades de *Yersinia pestis*.

Proteínas de protozoários - tais como proteínas de *Plasmodium falciparum*; proteínas de tripanossoma; e proteínas de *Cryptosporidium*.

Ainda noutro exemplo da invenção em uso, descrita em mais detalhe abaixo, o vector de expressão pJSK422 é utilizado para expressar a proteína fluorescente verde, sob o controlo do promotor groES/EL, na *N. cinerea* comensal.

A invenção proporciona ainda uma *Neisseria* comensal que é transformada com um vector de expressão que compreende uma sequência sinal que dirige o produto genético heterólogo para a superfície externa da célula de *Neisseria*. Outras sequências sinal são igualmente adequadas para utilização na invenção, tal como sinais de secreção ou sinais de



localização em subcompartimentos celulares, por exemplo sinais de localização periplásmica.

Outros aspectos da invenção proporcionam métodos para a preparação de composições. Tais métodos são adequados para a preparação de composições de vacina que despoletam a imunidade protectora à infecção microbiana quando administrada a um animal.

Um exemplo da invenção em utilização, descrita em mais detalhe abaixo, proporciona um método para a preparação de uma composição compreendendo os passos de:

- a) inserção de um gene que codifica para um produto genético heterólogo num vector de expressão;

- b) transformação do referido vector de expressão numa *Neisseria* comensal de modo que o referido produto genético heterólogo seja expresso na referida *Neisseria*; e

- c) combinação da *Neisseria* de (b) com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Também se apresenta um método para a preparação de uma composição compreendendo os passos de:

- a) inserção de um gene que codifica para um produto genético heterólogo num vector de expressão;

- b) transformação do referido vector de expressão numa *Neisseria* comensal de modo que o referido produto genético heterólogo seja expresso na referida *Neisseria*;

c) obtenção de um componente ou extracto imunogénico de *Neisseria* de (b); e

d) combinação do componente ou extracto imunogénico de *Neisseria* de (c) com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Também se apresenta um método de preparação de uma composição compreendendo os passos de:

a) obtenção de um componente ou extracto imunogénico de *Neisseria* comensal; e

b) combinação do componente ou extracto imunogénico de *Neisseria* de (a) com um produto genético heterólogo e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Também se apresentam (a) métodos e composições nas quais se retira um extracto de uma *Neisseria* comensal que expressa um produto genético heterólogo, e (b) métodos e composições em que se obtém um extracto de uma *Neisseria* comensal e o produto genético heterólogo expresso de outro modo (noutro organismo) é combinado com este último extracto.

A invenção também se refere à utilização de uma *Neisseria* comensal no fabrico de um medicamento para o tratamento de infecção por *Neisseria*, ou um componente, extracto ou seu derivado imunogénico, em que a referida *Neisseria* compreende um produto genético heterólogo, no fabrico de um medicamento para o tratamento de infecção por *Neisseria*, e para a utilização de uma *Neisseria* comensal, ou um seu componente, extracto ou derivado imunogénico, em que a referida *Neisseria* compreende um produto genético heterólogo, no fabrico de um medicamento para o tratamento de infecção para a imunoestimulação num animal.

São discutidas em maior detalhe realizações específicas por meio de Exemplos descritos abaixo. Os resultados referidos nos Exemplos são ilustrados pelos desenhos que os acompanham, nos quais:

Fig. 1 ilustra a protecção de ratinhos contra infecção intraperitoneal (IP) com a estirpe *N. meningitidis* K454 através da utilização de células inteiras de *N. lactamica* e fracções da membrana externa.

Fig. 2A ilustra a protecção de ratinhos contra infecção IP com a estirpe *N. meningitidis* K454 através da utilização de extractos com detergente e de elevado, médio e baixo peso molecular de células de *N. lactamica* - painel superior = teste com  $2 \times 10^7$  UFC, painel inferior = teste com  $6 \times 10^8$  UFC;

Fig. 2B ilustra os componentes das fracções de elevado, médio e baixo peso molecular da fig. 2A;

Fig. 3 apresenta um "immunoblot" que ilustra uma reacção cruzada de anticorpos no soro de pacientes com doença meningocócica com proteínas da estirpe *N. lactamica* Y92-1009;

Fig. 4 apresenta uma fotografia de um gel no qual se correram sub-fracções de um extracto da proteína de membrana externa de baixo peso molecular; e

Fig. 5 apresenta a protecção de ratinhos contra infecção IP com a estirpe *N. meningitidis* K454 quando imunizados com sub-fracções de baixo peso molecular -

painel superior = teste com  $5 \times 10^6$  UFC, painel inferior = teste com  $1 \times 10^8$  UFC.

Fig. 6 apresenta um histograma compreendendo a fluorescência de *N. cinerea* NRL 32165 contendo pJSK41 1 (GFP sem promotor) a pJSK422 (pJSK41 com promotor groEL/ES).

### **Exemplo 1**

#### **Preparação de vacina contendo células inteiras mortas**

A estirpe *Neisseria lactamica* Y92-1009 foi crescida em meio Mueller-Hinton (MHB) contendo  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de etilenodiamina-di(ácido o-hidroxifenilacético) (ED-DHA), incubada a  $37^\circ\text{C}$  com agitação (140 rpm) durante aproximadamente 6 h.

As bactérias foram então recolhidas por centrifugação e ressuspensas em solução salina com tampão fosfato (PBS) contendo 1 % (v/v) de formaldeído e 0,1 % (p/v) de tiomersal, e deixou-se repousar durante a noite a  $2-8^\circ\text{C}$ . As células mortas foram então ressuspensas em PBS a uma  $\text{DO}_{650}$  de 1,0 (equivalente a  $2 \times 10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) e adicionou-se "Alhydrogel" a 25% (v/v), resultando num produto adequado para administração subcutânea.

Este método é também adequado para *N. cinerea*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. polysaccharea*, *N. sicca* e *N. subflava*.

### **Exemplo 2**

#### **Preparação de vacina contendo preparações de membrana externa (ME) de *N. lactamica***

A estirpe *N. lactamica* Y92-1009 foi crescida em MHB com e sem a adição de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de EDDHA durante a noite a 37°C com agitação. Trataram-se então separadamente células com limitação de ferro (com EDDHA) e células com ferro. Recolheram-se bactérias por centrifugação de 1,5 litros e foram ressuspensas em 20 mL de acetato de lítio a 200 mM, 5 mM de EDTA, pH 6,0 e incubadas durante 3 h a 37°C com agitação. As bactérias foram então passadas 7 vezes através de uma agulha de calibre 21 e sedimentadas a 8000 g durante 10 min.

O sobrenadante foi recuperado e as membranas foram sedimentadas por centrifugação a 100000 g durante 1 h a 4°C. As membranas foram então ressuspensas em 10 mM de HEPES, pH 7,4, contendo 0,1 % (v/v) de PMSF a 10 mM, resultando em preparações de vacinação contendo ME. O teor proteico das preparações para vacinação de ME foi determinado utilizando o teste do ácido bicinconínico (Sigma, RU). As MEs foram diluídas em água desionizada estéril até uma concentração de proteína de 100 ng  $\text{mL}^{-1}$ . Esta foi então misturada com um volume igual de adjuvante de Freund, de modo a resultar numa concentração proteica final de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e emulsionada completamente. O adjuvante de Freund completo foi utilizado para a dose primária e o adjuvante de Freund incompleto foi usado para reforços subsequentes.

### **Exemplo 3**

#### **Preparação de vacina contendo lipo-oligossacárido (LOS)**

A purificação do LOS foi lavada a cabo a partir da estirpe *N. lactamica* Y92-1009 utilizando o método de Gu, X-X e Tsai, C.M. (1991) Anal Biochem. 196; 311-318. A vacina foi

preparada utilizando o adjuvante de Freund tal como acima com LOS à concentração final de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **Exemplo 4**

##### **Calendarização da vacinação e dos testes**

Grupos de 5 ratinhos foram vacinados com cada preparação do seguinte modo:

Primária:	Dia 0
Primeiro reforço:	Dia 21
Segundo reforço:	Dia 28

Os ratinhos vacinados com células mortas do Exemplo 1 receberam 0,5 mL subcutaneamente, equivalente a  $1 \times 10^9$  UFC. Os ratinhos vacinados com ME do Exemplo 2 e LOS do Exemplo 3 receberam 0,2 mL subcutaneamente; equivalente a  $10 \mu\text{g}$  de proteína e  $2 \mu\text{g}$  de LOS.

No dia 35, os ratinhos foram testados por injeção intraperitoneal com aproximadamente  $10^8$  UFC de *N. meningitidis* K454 preparada em MHB contendo transferrina a uma concentração final de 20 mg/mL. Os ratinhos foram então examinados e o número de sobreviventes anotado e os resultados são apresentados na fig. 1. Após 4 dias todos os 5 ratinhos sobreviveram nos grupos vacinados com células inteiras e PMEs (sem ferro) e 3 sobreviveram no grupo vacinado com PMEs (com ferro). Após 5 dias todos os membros do grupo de controlo e do grupo vacinado com LOS (denominados LPS na figura) tinham morrido.

#### **Exemplo 5**

### **Preparação de vacina compreendendo fracções de *N. lactamica***

Placas de agar de infusão de cérebro e coração foram inoculados com 50 µL de estirpe *N. lactamica* Y92-1009 e incubados durante a noite a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>. Estas foram usadas para inocular uma cultura primária MHB de 100 mL que foi incubada com agitação a 37°C durante 6 h. A cultura primária (15 mL) foi adicionada a cada um dos volumes 6x500 mL de MHB. Estas foram então incubadas com agitação durante a noite a 37°C e as condições foram tornadas limitantes em ferro através da adição de 5 µg mL<sup>-1</sup> de EDDHA. As células foram recolhidas por centrifugação e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com 100 mL de PBS e então sedimentadas por centrifugação. Os sedimentos foram ressuspensos em PBS + 0,3% (v/v) Elugent (Calbiochem, 2 mL por g de peso húmido) e incubados com agitação a 37°C durante 20 min. As células foram então removidas por centrifugação e o sedimento descartado. Adicionaram-se então EDTA e N-lauroil sarcosina ao sobrenadante a 10 mM e 0,5% (p/v) respectivamente.

Utilizou-se então o dispositivo BioRad (Marca Registada) Prep Cell, modelo 491 para separar as proteínas contidas no extracto de detergente. Um gel de resolução com 7% de acrilamida e 4 cm foi moldado com um gel de concentração de 2 cm. Submeteu-se a electroforese 12 mg de proteína no tampão de amostras nativas utilizando tampão de resolução contendo 0,1% (p/v) de SDS, 0,025 M de Tris e 0,192 M de glicina a 40 mA e 400 V até a frente de corante atingir o fundo do gel. Foram então recolhidas fracções de 3 mL das proteínas eluídas. Uma vez recolhidas as fracções, foram separadas em grupos consistindo em proteínas com um peso molecular aproximadamente inferior a 40 kDa, entre 40 e 67 kDa e mais que 67 kDa. As proteínas separadas foram

concentradas por precipitação com sulfato de amónio e submetidas a diálise contra PBS. Estas foram diluídas com PBS até uma concentração de proteína de 100 µg/mL e adicionou-se adjuvante completo de Freund a uma razão de 1:1 (v/v) ou adjuvante incompleto de Freund para as doses de reforço.

## **Exemplo 6**

### **Calendarização da vacinação e dos testes**

Grupos de 5 ratinhos foram vacinados com cada preparação do seguinte modo:

Primária:	Dia 0
Primeiro reforço:	Dia 21
Segundo reforço:	Dia 28

Os ratinhos foram vacinados sem vacina (ou seja, grupo de controlo), extracto Elugent ("Marca Registada") ou fracção de peso molecular elevado, médio ou elevado. Os ratinhos que recebem os grupos de fracção de proteína receberam 0,2 mL por administração subcutânea; equivalente a 10 µg de proteína.

No dia 35 os ratinhos foram testados por injeção intraperitoneal com  $2 \times 10^7$  ou  $6 \times 10^8$  UFC de *N. meningitidis* K454 preparadas em MHB contendo transferrina a uma concentração final de 20 mg/mL. Os ratinhos foram então examinados ao longo de quatro dias e o número de sobreviventes foi anotado, e os resultados são apresentados na fig. 2A - painel superior teste de  $2 \times 10^7$  e painel inferior teste de  $6 \times 10^8$ . Os componentes das fracções de peso molecular elevado, médio ou baixo são apresentadas na fig. 2B após se correr um gel de SDS-PAGE.



### **Exemplo 7**

Foram investigadas amostras de soro humano após a doença meningocócica e estas mostraram que foram produzidos anticorpos que reagem com uma gama de proteínas de *N. lactamica*. Os resultados do “immunoblot” são apresentados na fig. 3.

### **Exemplo 8**

Devido ao nível de protecção oferecido pela fracção de baixo peso molecular no Exemplo 6 (ver Fig. 2A), realizou-se uma separação suplementar destas proteínas, de acordo com o método do Exemplo 5, de modo a realizar uma caracterização suplementar dos componentes responsáveis pela protecção. As proteínas foram separadas em três grupos consistindo em <25 kDa (g1), 25-35 kDa (g2) e 35-43 kDa (g3) (apresentados na Fig. 4). A determinação dos teores de lipo-polissacárido (LPS) revelou elevados teores de LPS na fracção g1 [26 580 unidades de endotoxina por mL (UE mL<sup>-1</sup>)], e níveis consideravelmente mais baixos nas fracções restantes (9149 UE mL<sup>-1</sup> no g2 e 9348 UE mL<sup>-1</sup> no g3).

Tal como em exemplos anteriores, foram imunizados grupos de cinco ratinhos, utilizando uma calendarização de três doses com um dos três grupos de proteínas descritos acima, proteínas > 43 kDa e um extracto de detergente de células de *N. lactamica* mortas e células inteiras mortas de *N. lactamica*. Os animais foram testados com *N. meningitidis* do serogrupo B, estirpe K454, a uma dose de  $5 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^8$  UFC, em conjunto com controlos imunizados. O número de sobreviventes em cada dia após o teste é apresentado na Fig. 5.

Todos os ratinhos, excepto aqueles do grupo de controlo e um ratinho no grupo g3, sobreviveram ao teste de menor dose; no entanto, no teste de dose mais elevada os grupos com proteína g2 e g3 (respectivamente 25-35 kDa e 35-43 kDa) ofereceram a melhor protecção.

### **Exemplo 9**

#### ***Neisseria* comensal como veículo para expressão de proteína recombinante**

O gene que codifica para a proteína da nucleocápside do vírus do sarampo foi clonado no vector vaivém (Webb et al., 1998, painel na 11th International Pathogenic *Neisseria* Conference, Nice) e transformado em *E. coli* DH5 alfa. A expressão da proteína da nucleocápside do vírus do sarampo foi confirmada por “western blotting” sondado com anti-soro específico. Esta construção foi então utilizada para transformar *N. lactamica* por conjugação. A expressão da proteína da nucleocápside do vírus do sarampo foi colocada sob o controlo do promotor *frpC* de *Neisseria* e a expressão em níveis elevados foi observada quando as bactérias foram crescidas sob condições de crescimento com limitação em ferro.

### **Exemplo 10**

#### **Expressão da GFP na *N. cinerea* comensal**

O gene da proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* foi inserido no plasmídeo pJSK422 utilizando técnicas de clonagem convencionais. A GFP esteve sob controlo do promotor *groES/EL*. Como controlo negativo o

gene de GFP foi também inserido no plasmídeo pJSK41 1 que não tem o promotor groES/EL do plasmídeo pJSK422.

Transformou-se *N. cinerea* através de conjugação (ver Exemplo 9) ou com pJSK422 ou pJSK411 (controle negativo), plasmídeos contendo GFP. As células transformadas foram cultivadas sob condições apropriadas. A fluorescência das culturas de *N. cinerea* transformadas com pJSK422 foi comparada com aquela das culturas de *N. cinerea* transformadas com pJSK411. Os resultados para a comparação são apresentados na Fig. 6. O histograma apresenta a intensidade da fluorescência de GFP no eixo X e o número de células fluorescentes no eixo Y. É claro que o nível de fluorescência é superior em células de *N. cinerea* transformadas com pJSK422 do que naquelas transformadas com pJSK411, indicado pelo desvio do pico para a direita. Tal demonstra a expressão heteróloga do gene GFP na *N. cinerea* comensal.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição de vacina compreendendo uma *Neisseria* comensal ou uma sua preparação de membrana externa em que a referida *Neisseria* comensal é seleccionada entre o grupo que consiste em *N. lactamica*; *N. cinerea*; *N. elongata*; *N. flavescens*; *N. polysaccharea*; *N. sicca*; e *N. subflava*.
2. Uma composição de vacina de acordo com a Reivindicação 1 compreendendo *Neisseria* morta.
3. Uma composição de vacina de acordo com a Reivindicação 2 em que se obtêm *N. lactamica* morta suspendendo *N. lactamica* numa mistura de agentes bactericidas.
4. Uma composição de vacina de acordo com a Reivindicação 1 compreendendo *Neisseria* viva.
5. Uma composição de vacina de acordo com a Reivindicação 1 em que a *Neisseria* é *N. lactamica*.
6. Uma composição de vacina de acordo com a Reivindicação 1 em que a referida preparação de membrana externa compreende vesículas de membrana externa.
7. Um método para a preparação de uma composição de vacina compreendendo:
  - a) a obtenção de uma *Neisseria* comensal ou uma preparação da sua membrana externa; e
  - b) a combinação da referida *Neisseria* comensal ou preparação da membrana externa com um veículo farmacêuticamente aceitável, em que a referida *Neisseria* comensal é seleccionada do grupo que consiste em *N.*

*lactamica*; *N. cinerea*; *N. elongata*; *N. flavescens*; *N. polysaccharea*; *N. sicca*; e *N. subflava*.

8. Um método de acordo com a Reivindicação 7, em que a referida preparação de membrana externa compreende vesículas de membrana externa.

9. Método de acordo com a Reivindicação 7 em que a *Neisseria* é *N. lactamica*.

10. Uma composição de vacina de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 ou 6 ou um método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 7 a 9, em que a referida *Neisseria* ou preparação da sua membrana externa compreende um produto genético heterólogo.

11. Uma composição de vacina ou método de acordo com a reivindicação 10, em que a *Neisseria* comensal expressa um gene de uma *Neisseria* patogénica.

12. Uma composição de vacina ou método de acordo com a Reivindicação 11, em que a referida *Neisseria* patogénica é *N. meningitidis*.

13. Uma composição de vacina ou método de acordo com a Reivindicação 12, em que a *Neisseria* comensal expressa um gene que codifica para uma proteína de *N. meningitidis* seleccionada do grupo de proteína de ligação à transferrina; uma Cu; Zn-SOD; NspA; uma porina; uma proteína de membrana externa.

14. Uma composição de vacina de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 6 ou 10 a 13 ou um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, em que a

referida *Neisseria* comensal é modificada ou atenuada de modo a diferir da espécie nativa.

15. Composição de vacina compreendendo uma composição de acordo qualquer uma das Reivindicações 1 a 6 ou 10 a 14 mais um veículo farmacêuticamente aceitável.

16. Uma composição de vacina de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 6 ou 10 a 15 compreendendo ainda um produto genético heterólogo à referida *Neisseria*.

17. Uma composição de vacina de acordo com a Reivindicação 16, em que o produto genético heterólogo é fisicamente combinado com a referida *Neisseria* comensal.

18. Um método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 7 a 9 compreendendo:

a) a inserção de um gene que codifica para o produto genético heterólogo num vector de expressão,

b) a transformação do referido vector de expressão numa *Neisseria* comensal de modo que o produto genético heterólogo seja expresso na referida *Neisseria*;

c) a combinação da referida *Neisseria* de (b) ou uma preparação da membrana externa desta com um veículo farmacêuticamente aceitável.

19. Utilização de uma composição de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 6 ou 10 a 17 para o fabrico de um medicamento para vacinação contra infecção por *Neisseria*.

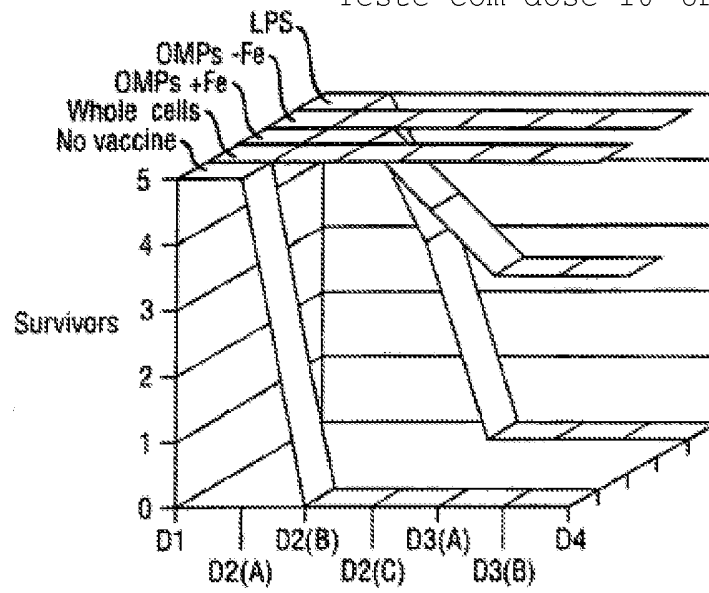
20. Utilização de acordo com a Reivindicação 19, em que a referida infecção por *Neisseria* é infecção meningocócica.

21. Utilização de acordo com a Reivindicação 19 ou 20, em que a referida composição compreende uma *Neisseria* que compreende um produto genético heterólogo.

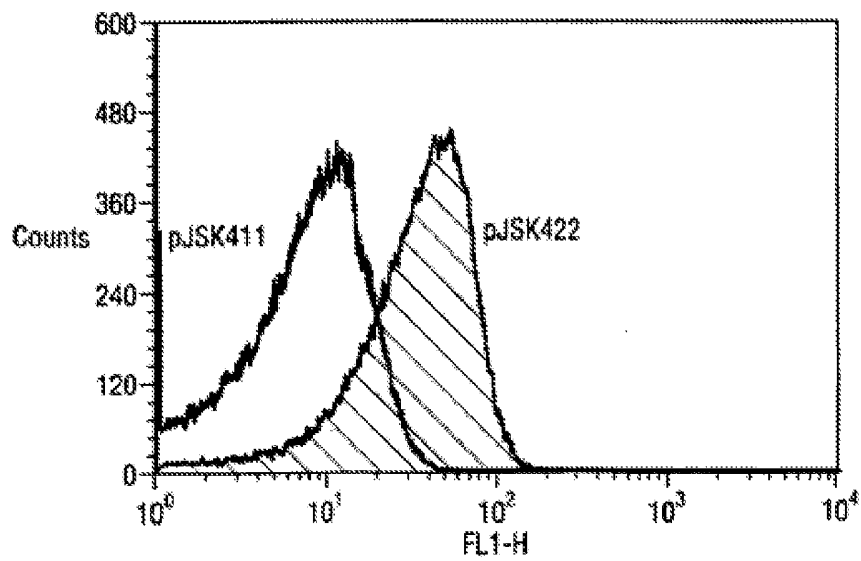
22. Utilização de acordo com qualquer uma das Reivindicações 19 a 21, em que o medicamento é para administração oral, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular ou intradérmica.

**FIG. 1**

Teste com dose  $10^8$  UFC



**FIG. 6**





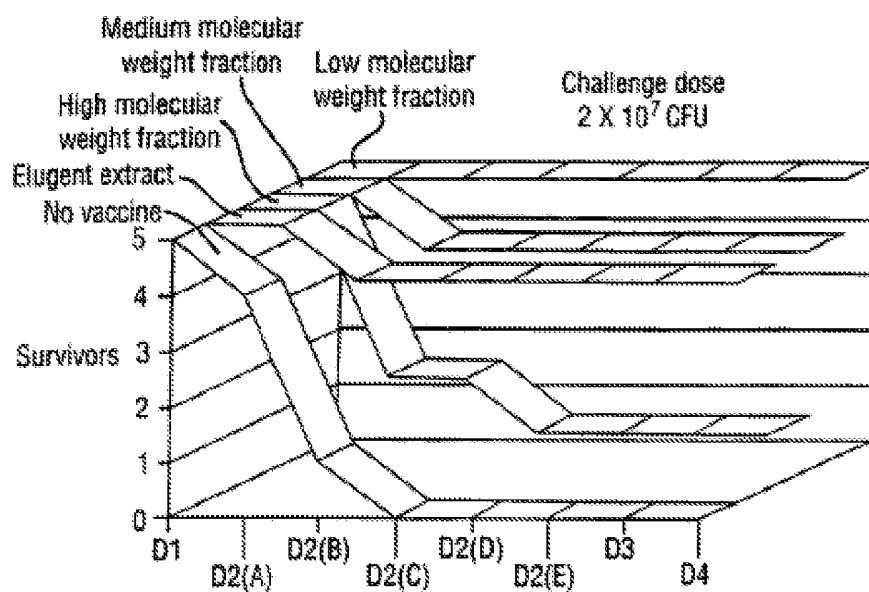
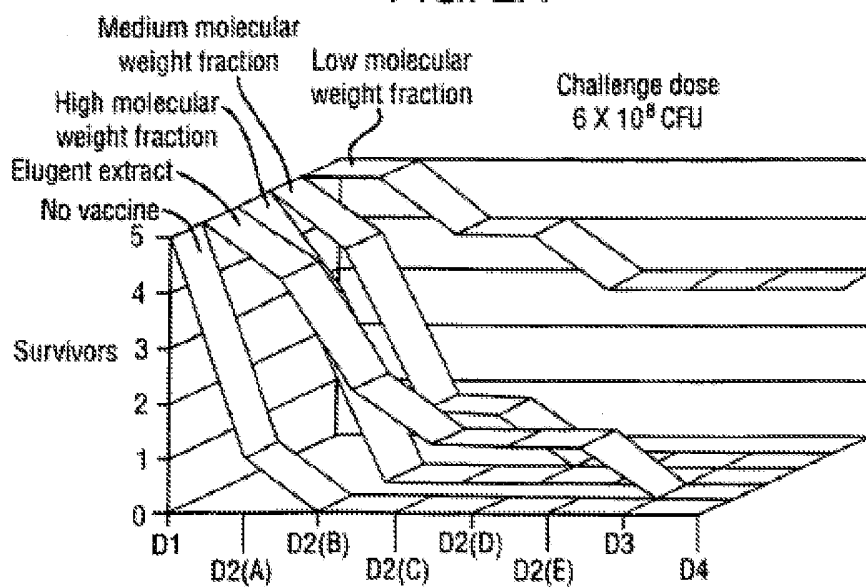
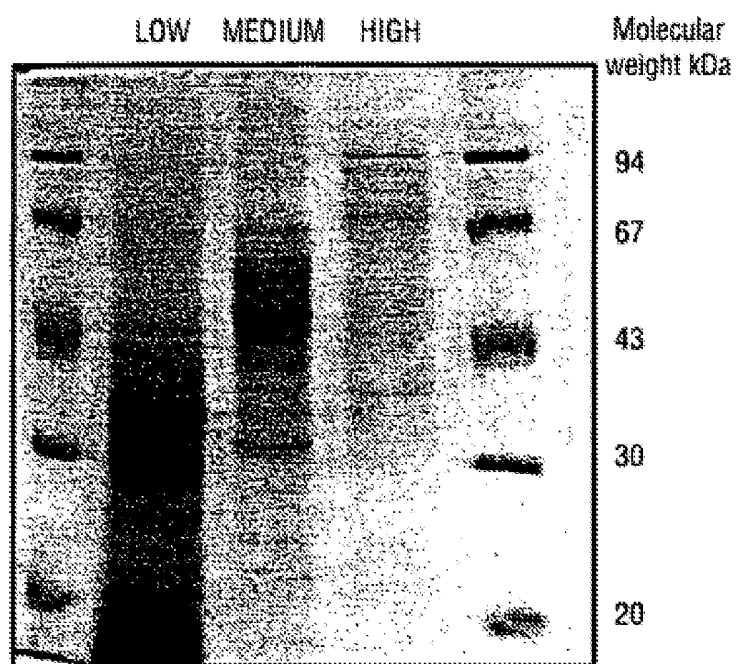


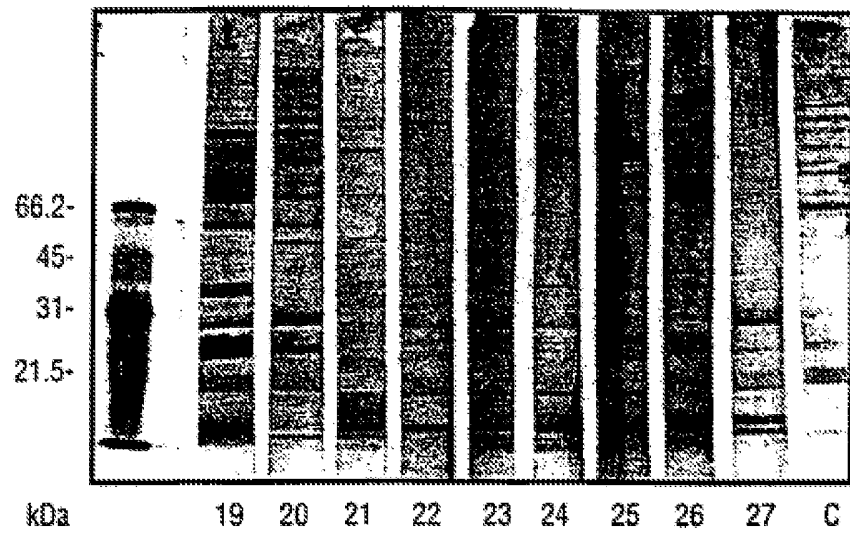
FIG. 2A



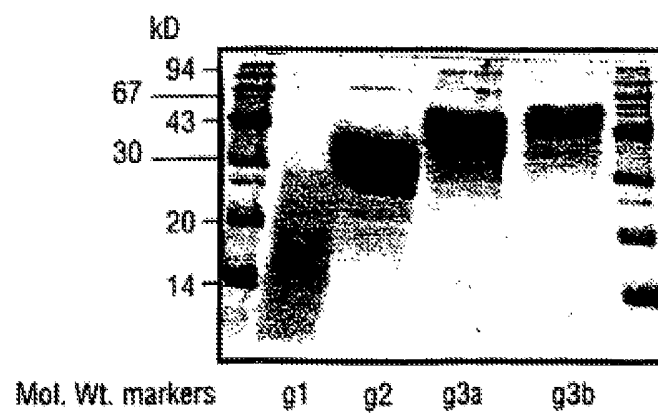
*FIG. 2B*



*FIG. 3*



*FIG. 4*



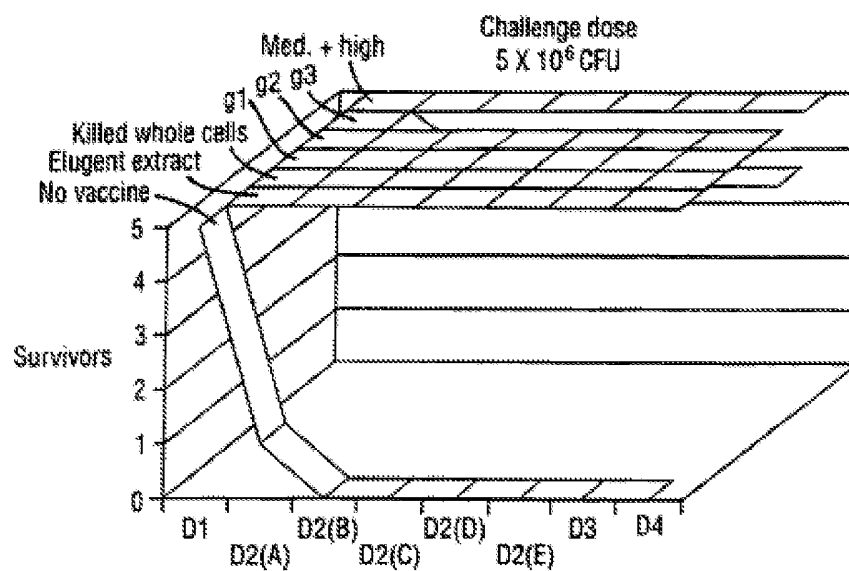


FIG. 5

