

(11) Número de Publicação: **PT 1218511 E**

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/31 (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)
A61K 31/14 (2006.01) **A61K 31/4353**
(2006.01)
A61K 31/436 (2006.01) **A61K 35/66** (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) **A61K 39/02** (2006.01)
A61K 39/07 (2006.01) **A61K 39/104** (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01) **A61K 39/112** (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01) **A61K 45/00** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) **A61P 31/00** (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) **A61P 43/00** (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) **C07K 14/21** (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01) **C12N 1/15** (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) **C12N 1/21** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) **C12Q 1/18** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **G01N 33/566** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)

(22) Data de pedido: **2000.10.09**

(30) Prioridade(s): **1999.10.09 GB 9923858**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.07.03**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.24**
078/2009

(73) Titular(es):

NEUTEC PHARMA PLC
ST. JAMES'S COURT, BROWN STREET
MANCHESTER M2 2JF **GB**

(72) Inventor(es):

JAMES PETER BURNIE **GB**
RUTH CHRISTINE MATTHEWS **GB**

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES ANTIMICROBIANAS**

(57) Resumo:

RESUMO**"COMPOSIÇÕES ANTIMICROBIANAS"**

A presente invenção diz respeito a composições antimicrobianas, em particular composições que ataquem os microrganismos *Burkholderia cepacia*, conjuntamente com testes de diagnóstico para os mesmos e suas utilizações.

DESCRIÇÃO**"COMPOSIÇÕES ANTIMICROBIANAS"**

A presente invenção diz respeito a composições antimicrobianas, em particular a composições que atacam *Burkholderia cepacia*, conjuntamente com os correspondentes testes de diagnóstico e suas utilizações.

O microrganismo *Burkholderia cepacia* é a causa principal da podridão mole das cebolas. Embora raramente seja patogénico em indivíduos saudáveis, nos últimos 15 anos passou a ser um importante agente patogénico oportunista que se encontra vulgarmente associado a infecções pulmonares entre indivíduos que padecem de fibrose cística (FC) e granulomatose crónica (Jarvis, W. R. *et al.*, 1987, Eur. J. Epidemiol., 3: 233-36). Os doentes que padeçam de FC são colonizados por esta bactéria proveniente do meio ambiente e há dados recentes que comprovam a transmissão entre pessoas (Sajjan, U. S. *et al.*, 1992, J. Clin. Invest., 89: 648-56; Govan, J. R. W. *et al.*, 1993, Lancet, 342: 15-19). Daqui têm resultado medidas rigorosas para isolar os indivíduos colonizados, mantendo-os separados dos indivíduos não colonizados, tanto em hospitais como em locais públicos.

A colonização do tracto respiratório com *B. cepacia* está associada a prognósticos clínicos insuficientes: até 20% dos indivíduos colonizados padecem do 'síndrome de *B. cepacia*', pneumonia associada a febre de que resulta uma deterioração clínica rápida e fatal (Isles, A. *et al.*, 1984, J. Pediatr., 104: 206-210; LiPuma, J. J. *et al.*, 1990, Lancet, 336: 527-532).

Comprovou-se que o microrganismo *B. cepacia* persiste no meio ambiente e que é resistente aos desinfetantes, tais como a cloro-hexidina (Sobel, J. D. et al., 1982, American J. Med., 73: 183-186). O tratamento de doentes colonizados com este organismo é problemático, devido à sua resistência intrínseca à maioria dos antibióticos clinicamente disponíveis (Pitt, T. L. et al., 1996, J. Med. Microbiol., 44 (3): 203-210). Os mecanismos de resistência de *B. cepacia* são quádruplos. Em primeiro lugar, tem lugar a permeabilidade selectiva da parede celular exterior, o que pode ser devido a modificações no lipopolissacarídeo e nos poros que formam as proteínas da membrana exterior (Nelson, J. W. et al., 1994, FEMS Immunol. Med. Micro., 8: 89-98). Demonstrou-se já que este tipo de mecanismo em *B. cepacia* confere resistência ao cloram-fenicol (Burns, J. L. et al., 1989, Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 33: 136-141). Em segundo lugar, os alvos intracelulares dos fármacos podem ser alterados de modo a deixarem de ser sensíveis ao fármaco, por exemplo, por alteração das proteínas destinatárias e diminuição da susceptibilidade ribossómica. Em terceiro lugar, a inactivação dos antibióticos, por exemplo, a produção de β -lactamases, incluindo as carbapenases que são capazes de hidrolisar os antibióticos mais poderosos e de espectro largo (Simpson, I. N. et al., 1995, J. Antimicrob. Chemother., 32: 339-341). Presume-se que um dos mecanismos principais da resistência de *B. cepacia* seja o efluxo activo através de uma bomba de exclusão do fármaco (Burns, J. L. et al., 1996, Antimicrob. Agents Chemother., 40(2): 307-313). No entanto, isto ainda não foi comprovado e ainda não foi identificada nenhuma bomba de efluxo de fármacos. A existência de um

transportador ABC, designado por *hdrAB*, foi já anteriormente sugerida (Journal of Antimicrobial Chemotherapy Volume 44, Supplement A, July 1999), mas ainda não foi apresentada nenhuma sequência ou indicação da sua identidade.

Foi agora identificada uma nova bomba de efluxo multifármacos em *B. cepacia*, um membro da superfamília facilitadora maior (Dinh, T. *et al.*, 1994, J. Bacteriol., 176: 3825-3831; Marger, M. D. e Saier, M. H., 1993, Trends Biochem. Sci., 18: 13-20), isto é, não é nem uma proteína do transportador ABC (Higgins, C. F., 1992, Annu. Rev. Cell Biol., 8: 67-113) nem é um membro da família da resistência aos metais pesados/divisão celular (Saier, M. H. Jr. *et al.*, 1994, Mol. Microbiol., 11: 1841-1847). Funciona de modo a bombear para fora os antibióticos e outras moléculas e por tal motivo consegue conferir ao organismo resistência aos fármacos. A inibição da bomba impede o efluxo, *v.g.*, dos antibióticos, e permite-lhes que ataquem (*v.g.* que aniquilem) o microrganismo. Deste modo, a bomba e a sua inibição constituem uma nova maneira de combater *B. cepacia*. Em particular, isto permite criar uma nova classe de composições antimicrobianas e também desinfectantes.

Burnie *et al.* (1995, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 10: 157-164) descrevem uma proteína de 28 kD existente em *B. cepacia*. Isto é distinto da bomba de efluxo multifármacos da presente invenção, que é um tipo diferente de proteína e que possui um peso molecular previsto de 49 kD.

De acordo com a presente invenção, esta proporciona uma bomba de efluxo multifármacos que possui a sequência designada por SEQ ID NO: 2 (aqui designada também por *bcrA*) ou uma bomba de efluxo multifármacos que tenha, com tal sequência, uma homologia pelo menos igual a 90%.

Para se determinar a identidade percentual ou a homologia entre as duas sequências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos, faz-se o alinhamento das sequências para se conseguir uma comparação óptima. Assim, por exemplo, podem ser introduzidos espaços vazios em uma ou nas duas sequências, podendo ser ignoradas as sequências não homólogas (dissemelhantes) para efeitos de comparação. De acordo com uma variante preferencial, o comprimento de uma primeira sequência alinhada para efeitos de comparação possui pelo menos 30%, de preferência pelo menos 40%, mais preferencialmente pelo menos 50%, ainda mais preferencialmente 60% e ainda muito mais preferencialmente pelo menos 70%, 80% ou 90% do comprimento da segunda sequência na região alinhada. Os resíduos aminoácidos ou nucleótidos em correspondentes posições dos aminoácidos ou posições dos nucleótidos são então comparados. Se uma posição da primeira sequência estiver ocupada pelo mesmo resíduo aminoácido ou resíduo nucleotídico na correspondente posição na segunda sequência, então as moléculas são idênticas nessa posição. O valor percentual da identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas partilhadas pelas sequências (tomando em consideração o facto de ser apropriado o número e a extensão dos espaços vazios introduzidos para a optimização do alinhamento). No caso das sequências polipeptídicas, pode ser feita a substituição de um aminoácido por um outro com características iguais, sem que seja afectada a estrutura ou a função do polipeptido. Provavelmente, tais substituições conservativas são fenotipicamente inócuas. De uma forma típica, considera-se como substituições conservativas as trocas, um por um, entre os aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile, a permuta dos resíduos hidroxilados Ser e Thr, a

permutação dos resíduos ácidos Asp e Glu, a substituição entre os resíduos aminoácidos Asn e Gln, a permuta dos resíduos básicos Lis e Arg e as trocas entre os resíduos aromáticos Phe, Tir. As substituições conservativas de aminoácidos, que são provavelmente inócuas sob o ponto de vista fenotípico, foram descritas por Bowie *et al.*, 1990, *Science* 247: 1306-1310. Ao fazer-se o alinhamento de sequências de aminoácidos, podem ser tomadas em consideração as substituições conservativas de aminoácidos para se fazer um registo de avaliação da homologia (também designada por "similaridade") entre as sequências.

De acordo com uma variante preferencial, a comparação de sequências e a determinação da identidade percentual e/ou da homologia percentual pode ser determinada recorrendo a um algoritmo matemático (ver, por exemplo: Lesk, A. M. (ed.), 1988, *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, Nova Iorque; Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (eds), 1994, *Computer Analysis of Sequence DATA*, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G., 1987, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, Nova Iorque; e Gribskov, M. & Devereaux, J. (eds), 1991, *Sequence Analysis Primer*, M. Stockton Press, Nova Iorque). Há algoritmos convenientes para o alinhamento de sequências que foram incorporados na aplicação informática GCG (disponível em <http://www.gcg.com>). Além disso, as sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídicas da presente invenção podem ser utilizadas como uma sequência de interrogação para se efectuar uma pesquisa em bases de dados, por exemplo, para identificar outros membros da família ou sequências congêneres. Por exemplo, tais pesquisas podem ser feitas utilizando os programas

informáticos BLASTN (sequências de ácidos nucleicos) ou BLASTP (sequências de aminoácidos) (versão 2.0 - Altschul, S. F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; versão 2.1 - Altschul, S. F. *et al.*, 1997, Nucleic Acids Research 25: 3389-3402). De acordo com uma variante preferencial, as sequências são alinhadas e são obtidos os registos de avaliação de identidade e de homologia utilizando o programa de pesquisa Basic BLAST (versão 2.1) com os espaços vazios, com parâmetros de pesquisa por defeito e de registo de avaliação, disponível no endereço do ciberespaço NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Pesquisas efectuadas em bases de dados de sequências revelaram que os genes conhecidos com maior semelhança são o gene *emrB* de *E. coli* e o gene *qacA* de *Staphylococcus aureus*, os quais fazem parte de um operão que codifica as bombas de extrusão resistentes a multifármacos pertencentes à família dos genes MFS (Lomovskaya, O. and Lewis, K., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89: 8938-8942; Rouch, D. A. *et al.*, 1990, Mol. Microbiol., 4 (12): 2051-2062). Estes dois genes têm uma homologia que é respectivamente de 48,8% e 20,1%. Foi identificado um outro gene, sem nome atribuído, em *Burkholderia pseudomallei*, que possui uma homologia de 84,8% com o gene da presente invenção. Esta proteína (AF 110185) foi descrita por deShazer, D. *et al.* (1999, J. Bacteriology, 181 (15) 4661-4664) como sendo uma proteína do "circuito segregador geral" para o circuito de secreção de tipo II, necessário para a secreção de protease, lipase e fosfolipase C.

Os homólogos da proteína que possui a SEQ ID NO: 2 podem ser os que existem noutros organismos ou os que são gerados por modificação dos genes existentes, tais como

bcrA. Por exemplo, os homólogos podem ter substituições conservadas ou podem apresentar adições ou supressões de aminoácidos. Em particular, os homólogos podem ter pelo menos 95% ou então, por exemplo, pelo menos 99% de homologia com a sequência designada por SEQ ID NO: 2. O domínio científico da construção artificial de proteínas é perfeitamente conhecido pelos especialistas na matéria e um especialista destes poderia facilmente ser capaz de modificar a proteína da presente invenção e simultaneamente conservar a sua funcionalidade, enquanto bomba de efluxo de multifármacos. Os homólogos podem ser produzidos por modificações que originem diferenças sequenciais, ou que não afectem as sequências, ou de ambas as maneiras. As modificações podem compreender a transformação química de polipeptidos, *v.g.*, por acetilação ou carboxilação. Entre outras modificações refere-se a glicosilação, por exemplo, durante a síntese, processamento ou reprocessamento de polipeptidos, *v.g.*, por meio de enzimas (tais como as enzimas de glicosilação dos mamíferos) que afectam a glicosilação. Entre outras modificações refere-se a fosforilação de aminoácidos, *v.g.*, fosfotirosina, fosfocerina e fosfotreonina. Há outras modificações entre as quais se refere a utilização de D-aminoácidos em vez dos L-aminoácidos que ocorrem naturalmente e os aminoácidos sintéticos, ou que ocorrem de forma não natural, tais como os β - ou γ -aminoácidos.

Também são aqui descritas as sequências de fragmentos polipeptídicos, existentes na bomba de efluxo de multifármacos, que possuem a sequência designada por SEQ ID NO: 2. Tais fragmentos podem compreender sequências de aminoácidos essenciais para as funções da bomba de efluxo

de multifármacos. As variantes das sequências de fragmentos que possuem a mesma função podem ter 10%, 20%, 50% ou 100% de homologia de aminoácidos com as correspondentes sequências de fragmentos existentes na bomba de efluxo de multifármacos de SEQ ID NO: 2.

A bomba de efluxo de multifármacos pode ser expressa por um organismo pertencente aos géneros *Burkholderia* ou *Pseudomonas*. As experiências indicadas adiante mostram que a proteína é expressa em *Burkholderia cepacia* e permitem concluir que é previsível que a proteína e as suas bombas homólogas de efluxo de multifármacos sejam expressas num conjunto de organismos estreitamente afins. Em particular, o microrganismo *Burkholderia cepacia* era classificado, outrora, como *Pseudomonas cepacia* e devido à similaridade dos organismos dos géneros *Burkholderia* e *Pseudomonas* prevê-se que a proteína e as suas bombas homólogas de efluxo de multifármacos sejam expressas em organismos do género *Pseudomonas*. Há outros géneros de organismos em que tem lugar a expressão da proteína e das suas bombas homólogas de efluxo de multifármacos, entre os quais se refere *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Salmonella* e *Shigella*.

A invenção também proporciona uma sequência nucleotídica que codifica uma bomba de efluxo de multifármacos de acordo com a presente invenção. A sequência nucleotídica pode ser a sequência designada por SEQ ID NO: 1. A presente invenção também compreende as sequências nucleotídicas que codificam a mesma proteína, mas utilizando codões diferentes.

Também é aqui descrita uma molécula de ácido nucleico que híbrida, em condições variáveis entre moderadas e

fortemente rigorosas, com um complemento das sequências nucleotídicas supramencionadas. As condições de hibridação estão descritas minuciosamente nas páginas 1.101-1.110 e 11.45-11.61 da obra de Sambrook *et al.* (1989, *Molecular Cloning*, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Um exemplo de condições de hibridação que é possível utilizar implica o recurso a uma solução de pré-lavagem constituída por 5XSSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0) e deixar decorrer o ensaio de hibridação de um dia para o outro a 55°C utilizando 5XSSC. A hibridação de sequências de ácidos nucleicos compreende sondas, iniciadores e fragmentos de ADN.

A presente invenção também proporciona uma bomba de efluxo de multifármacos de acordo com a presente invenção, para a prática de um método de tratamento ou de diagnóstico do corpo de um animal ou de um ser humano. Esta prática médica, formulada pela primeira vez, nunca antes foi sugerida ou proposta para as proteínas da presente invenção

Também está prevista a utilização de uma bomba de efluxo de multifármacos de acordo com a presente invenção, ou de um seu fragmento imunogénico que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID NO: 11-20, para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma infecção provocada por um organismo em que tenha lugar a sua expressão.

Uma vez que a bomba de efluxo de fármacos da presente invenção está parcialmente exposta no exterior do organismo em que tem lugar a sua expressão, irá haver epítomos imunogénicos. Estes epítomos podem ser determinados facilmente, recorrendo à cartografia de epítomos (Geysen, H. M *et al.*, 1987, *Journal of Immunological Methods*, 102: 259-274; Geysen, H. M. *et al.*, 1988, *J. Mol. Recognit.*, 1(1):

32-41; Jung, G. and Beck-Sickinger, A. G., 1992, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 31: 367-486). Uma vez identificados, os epítomos (isto é os fragmentos imunogénicos) podem ser utilizados então para a formulação de um medicamento. Para além da utilização de fragmentos da bomba que apresenta os epítomos, também aqui se afirma que é possível utilizar mimotopos que apresentem o mesmo epítomo, mas que tenham uma sequência diferente. Estes podem ser gerados facilmente, conforme descrito por Geysen (*supra*), utilizando, *v.g.*, um anticorpo específico contra um epítomo. Em alternativa, é possível recorrer à PCR para a síntese de fragmentos imunogénicos (Gupta, S. *et al.*, 1999, *Biotechniques*, 27(2): 328-332) para permitir a cartografia dos epítomos.

Conforme se pode concluir a partir do Quadro 2, foram identificadas 14 hélices transmembranares. Uma vez que não estão expostas no exterior da membrana, não podem apresentar epítomos. De igual modo foram feitas experiências (ver adiante) que mostram que os primeiros 46 aminoácidos da proteína não apresentam nenhuns epítomos. Assim sendo, os fragmentos imunogénicos podem compreender sequências de outras partes da proteína.

Os inventores da presente invenção tiveram êxito na identificação de diversos epítomos que são apresentados pela proteína BcrA, constituindo estes um outro aspecto da presente invenção. Estes epítomos são apresentados pelos polipeptidos que possuem as sequências seleccionadas entre SEQ ID NOs: 11-20. Assim, de acordo com a presente invenção, esta proporciona um polipeptido que possui uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20 e que apresenta um epítomo. Qualquer referência aqui feita a "fragmentos

imunogénicos" da proteína BcrA é considerada como sendo uma referência aos polipeptidos de SEQ ID NOs: 11-20.

Por exemplo, é possível utilizar a proteína ou o fragmento imunogénico da presente invenção para a preparação de uma vacina. Em particular, a proteína ou o fragmento imunogénico podem ser úteis para a preparação de uma vacina para o tratamento de infecções provocadas por organismos que os exprimam em doentes que padeçam de fibrose cística. Também se descreve aqui um método para tratar infecções a um doente, em particular num doente que padeça de fibrose cística, causadas por organismos que exprimam a bomba de efluxo de multifármacos da presente invenção, consistindo tal método em administrar a bomba de efluxo de multifármacos, ou um seu fragmento imunogénico, ao doente. Tais vacinas, para administração a doentes, podem ser fornecidas numa forma que contenha também um veículo, um diluente ou um excipiente farmacologicamente aceitáveis ou então, por exemplo, um adjuvante adequado. Tais compostos são facilmente identificáveis por um especialista na matéria.

Os medicamentos de acordo com a presente invenção também podem compreender um veículo, um diluente ou um excipiente adequados (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopeia, 1984, Mack Publishing Company, Easton, PA, E.U.A.). As doses exactas de medicamento que irão ser administradas a um doente são facilmente avaliadas por um especialista na matéria e podem ser convenientemente determinadas recorrendo a uma simples experiência de tipo dose-resposta.

Também está prevista a utilização de um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a

presente invenção, para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma infecção provocada por um organismo em que tenha lugar a sua expressão. O inibidor é constituído por um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID Nos: 11-20. Também pode ser utilizado, pelo menos, conjuntamente com um antibiótico, por exemplo, uma tetraciclina e/ou uma quinolona. O antibiótico quinolona pode ser o ácido nalidíxico. A administração, a um doente, do medicamento que compreende um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, e pelo menos um antibiótico pode ser simultânea ou sequencial. Também está prevista uma preparação combinada de um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, e pelo menos um antibiótico, por exemplo, uma tetraciclina e/ou uma quinolona, para utilização simultânea, separada ou sequencial no tratamento da infecção provocada por um organismo em que tenha lugar a expressão da referida bomba de efluxo de multifármacos. O inibidor é constituído por um anticorpo ou por um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que tenha uma sequência seleccionada entre SEQ ID Nos: 11-20.

Também está prevista a utilização de um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, para a preparação de um desinfectante para um organismo em que tenha lugar a sua expressão. O inibidor é constituído por um anticorpo ou por um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que tenha a sequência seleccionada entre SEQ ID Nos: 11-20. Também pode ser utilizado, pelo menos, conjuntamente com um

desinfetante de amónio quaternário, por exemplo, cloro-hexidina. Conforme se disse anteriormente, o microrganismo *B. cepacia*, e outros organismos em que tem lugar a expressão das bombas de efluxo multifármacos, de acordo com a presente invenção, podem ser persistentes no meio ambiente. Experiências anteriormente assinaladas comprovam que os microrganismos, *v.g.*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, conseguem sobreviver em soluções desinfetantes, sendo resistentes, *v.g.*, aos compostos de amónio quaternário. Assim, a presente invenção não fica limitada ao tratamento da infecção provocada por tais organismos, mas abrange também os desinfetantes eficazes contra estes. Em particular, um desinfetante deste tipo, eficaz contra um organismo em que tenha lugar a expressão de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, pode compreender o inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, conjuntamente com um composto desinfetante, à base de amónio quaternário.

Uma vantagem particular proporcionada pela presente invenção reside no facto de, ao inibir a bomba de efluxo de multifármacos, habilitar os anticorpos e desinfetantes existentes, que de outro modo seriam ineficazes ou teriam um efeito limitado contra os organismos em que tem lugar a expressão da bomba de efluxo, a tornarem-se eficazes ou a terem uma maior eficiência contra tais organismos. Posto isto, uma modificação relativamente simples, a introduzir nas composições antimicrobianas e desinfetantes existentes, pode fazer com que passem a ser eficazes ou que aumentem a sua eficiência contra os organismos em que tem lugar a expressão da bomba de efluxo.

Assim, ainda de acordo com a presente invenção, esta proporciona uma composição antimicrobiana que compreende o inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, e pelo menos um antibiótico. O inibidor é constituído por um anticorpo ou por um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que possui uma sequência seleccionada entre SEQ ID Nos: 11-20. Também é aqui descrito um método para tratar uma infecção de um doente, provocada por um organismo em que tenha lugar a expressão de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, o qual consiste em administrar a esse doente a referida composição antimicrobiana. A classe de antibióticos é bastante ampla, mas em combinação com um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, da presente invenção, manifesta realmente uma tendência geral para inibir (isto é, para impedir o desenvolvimento ou a reprodução ou mesmo aniquilar) microrganismos em que tenha lugar a expressão da referida bomba de efluxo de multifármacos. Em particular, os membros das classes das tetraciclinas (por exemplo, a tetraciclina) e das quinolonas (por exemplo, o ácido nalidíxico) são particularmente eficazes. Também se descreve aqui um estojo que compreende um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, e pelo menos um antibiótico. O estojo pode ser utilizado para o tratamento de uma infecção de um doente provocada por um organismo em que tenha lugar a expressão de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção.

Também está prevista uma composição antimicrobiana que compreende um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, e pelo

menos um desinfectante, por exemplo, um desinfectante à de amónio quaternário. O inibidor é constituído por um anticorpo ou por um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20. Também está previsto um método de desinfectação que consiste em aplicar a um artigo (por exemplo, uma superfície) que se pretenda desinfectar a referida composição antimicrobiana.

Conforme anteriormente descrito, os inibidores são constituídos por anticorpos e seus fragmentos de ligação aos antigénios, específicos contra um polipeptido que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20. A preparação, a síntese e a utilização de anticorpos e dos seus fragmentos de ligação aos antigénios é de fácil compreensão para os especialistas na matéria (Harlow, E. e Lane, D., "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, 1998).

A presente invenção também prevê um método para detectar numa bactéria a resistência a multifármacos, o qual compreende os passos seguintes:

(i) fazer contactar a bactéria com um reagente específico para a bomba de efluxo de multifármacos da presente invenção, sendo o reagente seleccionado entre o conjunto constituído por:

(a) um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20; e

(b) uma sequência nucleotídica complementar de uma sequência nucleotídica que codifique um polipeptido que possua a sequência identificada por SEQ ID NO: 2;

(ii) detectar qualquer reacção de ligação anticorpo-antigénio ou qualquer reacção de hibridação da sequência nucleotídica; e

(iii) correlacionar os resultados do passo de detecção (ii) com a presença ou com a ausência de resistência a multifármacos na bactéria.

A invenção também proporciona um método para detectar a presença de uma bactéria que tenha resistência a multifármacos, conferida pela presença de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, o qual compreende os passos seguintes:

(i) retirar uma amostra de um doente;

(ii) fazer contactar a referida amostra com um reagente específico para a referida bomba de efluxo de multifármacos, sendo o referido reagente seleccionado entre o conjunto constituído por:

(a) um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que tenha uma sequência seleccionada entre SEQ ID Nos: 11-20; e

(b) uma sequência nucleotídica complementar de uma sequência nucleotídica que codifique um polipeptido que tenha a sequência identificada por SEQ ID NO: 2;

(iii) detectar qualquer reacção de ligação anticorpo-antigénio ou qualquer reacção de hibridação da sequência nucleotídica; e

(iv) correlacionar os resultados do passo de detecção (iii) com a presença ou com a ausência de uma bactéria que tenha resistência a multifármacos.

As amostras retiradas de doentes, utilizadas em tais métodos, podem compreender, por exemplo, sangue, soro, fluidos bronquiais ou saliva.

Também se descreve aqui um método para tratar uma infecção num doente, provocada por um organismo em que tenha lugar a expressão de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, o qual consiste em administrar ao doente uma composição antimicrobiana de acordo com a presente invenção, isto é, que contenha um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, e pelo menos um antibiótico.

Tais métodos de tratamento são particularmente úteis para os doentes que padeçam de fibrose cística, os quais são particularmente propensos a infecções provocadas por organismos resistentes a multifármacos, e por isso o doente pode ser um que padeça de fibrose cística.

A presente invenção também proporciona um polipeptido que possui uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20 e que apresenta um epítipo. Também se descreve aqui as sequências imunogénicas homólogas das sequências seleccionadas entre SEQ ID Nos: 11-20 que apresentem um epítipo (isto é, variantes reconhecidas pelo mesmo anticorpo) e sequências heterólogas que compreendam as sequências imunogénicas (qualquer sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20 que apresente um epítipo e as sequências imunogénicas homólogas daquelas) fundidas com uma outra sequência.

Também se descreve aqui um método para conferir a um organismo resistência aos antibióticos, o qual consiste em introduzir uma bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção, no referido organismo. Deste modo, de acordo com um dos seus aspectos, a presente invenção prevê a manipulação de um organismo não humano, diferente de *Burkholderia cepacia* em que tenha sido introduzida uma

bomba de efluxo de multifármacos, de acordo com a presente invenção.

Também se descreve aqui um suporte de informação, compreendendo a sequência de uma molécula correspondente às seleccionadas entre SEQ ID NOs 1-4,7-22. O suporte de informação pode ser um suporte de dados legíveis por uma máquina, por exemplo, um disco de computador ou CD.

Também se descreve aqui um método para analisar uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs 1-4,7-22, compreendendo o referido método um ou vários dos passos seguintes: determinar o grau de identidade de homologia sequencial da referida sequência com uma outra sequência, determinar a estrutura secundária da sequência, determinar o peso molecular da estrutura e determinar as características imunológicas e químicas da sequência. Entre os métodos para analisar as sequências de ácidos nucleicos e de proteínas da presente invenção refere-se os que são conhecidos na especialidade, por exemplo, conforme descrito em: Lesk, A. M. (ed.), 1988 (*supra*); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (eds), 1994 (*supra*); von Heinje, G., 1987 (*supra*); e Gribskov, M. & Devereaux, J. (eds), 1991 (*supra*).

Também é aqui referenciada uma base de dados que incorpora as sequências seleccionadas entre SEQ ID NOs 1-4,7-22 e um sistema informático para analisar qualquer uma das sequências seleccionadas entre SEQ ID NOs 1-4,7-22.

A invenção será melhor compreendida a partir da descrição subsequente que ilustra, a título de exemplo, apenas uma forma de bomba de efluxo de multifármacos.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAIS E MÉTODOSEstirpes bacterianas provenientes de plasmídeos

A estirpe *B. cepacia* J2315 Edinburgh foi obtida num doente com fibrose cística. Os soros foram obtidos a partir de doentes infectados com fibrose cística, com cultura de saliva repetida positiva para *B. cepacia*. Para se confirmar a identidade, efectuou-se a identificação da cultura microbiana e a identificação bioquímica.

Isolamento do ADN e preparação da biblioteca lambda ZAPII

Isolou-se ADN e restringiu-se de acordo com Goldbang, N. *et al.* (1996, J. Clin. Pathol., 49: 861-863) para se obter uma digestão parcial com a enzima Sau3a. Preparou-se uma biblioteca lambda ZAPII com uma inserção de 3-5 kb, de acordo com os protocolos de Clontech Laboratories Inc., Cambridge. Inglaterra.

Pesquisa de anticorpos

Foram retirados soros de um doente com infecção peitoral provocada por *B. cepacia* e foram utilizados para a pesquisa de anticorpos. Foram utilizadas células XL1-Blue de *Escherichia coli* que foram infectadas com o fago lambda ZAPII sobre ágar de caldo L (triptona (bacto) 10 g/L, extracto de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, maltose 2 g/L, ágar (bacto) 15 g/L) à razão de 3000 ufp/placa de 85 mm. Manteve-se tudo isto a incubar a 42°C durante 3 horas. Efectuou-se a transferência das placas para filtros de nitrocelulose (dimensão dos poros igual a 0,45 µm;

Sartorius AG, Goettingen, Alemanha), impregnados com isopropil- β -D-tiogalactopiranosido 10 mM (IPTG) a 37°C durante 2 horas. Estes filtros foram bloqueados de um dia para o outro a 4°C com albumina do soro de bovino (BSA; Sigma) a 3% em soluto salino tamponado (NaCl 150 mM, Tris 10 mM). Diluiu-se o soro 100 vezes em BSA a 3% e acrescentou-se aos filtros e manteve-se tudo a incubar à temperatura ambiente durante 2 horas, tendo os filtros sido lavados durante 30 minutos em solução de lavagem (NaCl 150 mM, Tween 20 entre 0 e 0,5%), antes de se ter acrescentado o segundo anticorpo, anti-IgG humana conjugada com fosfatase alcalina (Sigma) diluída 1000 vezes em BSA a 3%. Decorrida 1 hora à temperatura ambiente, efectuou-se nova lavagem dos filtros e contrastou-se com volumes iguais de fosfato de naftol ASMX (0,4 mg/mL em água destilada; Sigma) e com o sal 'Fast Red TR' (6 mg/L em Tris 0,2 M a pH 8,2; Sigma) (o corante 'Fast Red'). Efectuou-se a transferência das placas positivas para tubos de 1,5 mL contendo 200 μ L de SM (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgSO₄, gelatina a 0,001%) e duas a três gotas de clorofórmio. Realizou-se a purificação da placa repetindo o procedimento anterior. Isto levou à identificação de uma placa positiva que foi subsequentemente sequenciada, tendo isto produzido um bloco de leitura ininterrupta que começa no aminoácido 46 e continua até à extremidade carboxi da proteína.

A pesquisa da base de dados revelou que isto não era uma sequência completa, pelo que foi necessário fazer nova clonagem para se identificar todos os aminoácidos da extremidade da molécula. Para o efeito, preparou-se uma sonda marcada com digoxigenina, recorrendo à reacção em cadeia com polimerase, para que a biblioteca pudesse,

assim, voltar a ser pesquisada. Os iniciadores para isto foram EMRC (SEQ ID NO: 4) para a extremidade amino e EMRN (SEQ ID NO: 3) para a extremidade carboxi.

Síntese da sonda marcada com digoxigenina, por meio da reacção em cadeia com polimerase (PCR)

Para a PCR utilizou-se aliquotas de 2 μ L de ADN plasmídico de pMKC purificado, num volume de reacção final igual a 100 μ L em 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ (Perkin Elmer) contendo 100 pmol/ μ L de cada um dos iniciadores EMRC e EMRN (ver o quadro 1), 200 μ M de cada um dos dNTP marcados com digoxigenina-1-uridina-5'-fosfato (Boehringer Mannheim) e 5U de polimerase do ADN de *Taq* (Perkin Elmer). Submeteu-se a mistura de reacção a uma desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos e efectuou-se a PCR num amplificador de ADN de modelo 'GeneAmp 9600' (Roche Diagnostic Systems), do modo seguinte: 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto. Depois de completados 30 ciclos, manteve-se a reacção a 72°C durante 7 minutos e a seguir arrefeceu-se para 4°C. Foram também incluídos tubos de ensaio de contraprova que não continham nenhuma matriz de ADN.

Efectuou-se a resolução dos produtos amplificados, recorrendo a electroforese em 100 mL de gel de agarose a 1,0% (p/v) em tampão 1 X Tris-acetato (TAE) contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 μ g/mL. Foram incluídos marcadores moleculares (o ADN digerido com EcoRI/HindIII, de Goldbang, N. *et al.*, 1996, *supra*), tendo a resolução dos produtos da PCR sido feita por electroforese a 80 V durante 1 hora.

Meios e reagentes*Caldo NZY (por litro):*

Acrescentou-se 5 g de NaCl, 2 g de MgSO₄.7H₂O, 5 g de extracto de levedura e 10 g de amina NZ (hidrolisado de caseína) a água desionizada, até se obter o volume final de 1 litro. Ajustou-se o valor do pH para 7,5 com NaOH e esterilizou-se em autoclave à pressão de 15 libras/polegada quadrada, durante 15 minutos.

Ágar NZY (por litro):

Acrescentou-se 5 g de NaCl, 2 g de MgSO₄.7H₂O, 5 g de extracto de levedura, 10 g de amina NZ (hidrolisado de caseína) e 15 g de ágar a água desionizada, até se obter o volume final de 1 litro. Ajustou-se o valor do pH para 7,5 com NaOH e esterilizou-se em autoclave à pressão de 15 libras/polegada quadrada, durante 15 minutos. Deixou-se o ágar arrefecer e depois verteu-se em pratos de Petri.

Ágar superior NYZ (por litro):

A 1 litro de caldo NZY a 0,7% (p/v) acrescentou-se agarose e esterilizou-se em autoclave à pressão de 15 libras/polegada quadrada, durante 15 minutos. Antes de se utilizar, fundiu-se o ágar superior e deixou-se arrefecer para 48°C.

Ágar de LB-canamicina (por litro):

Acrescentou-se 10 g de NaCl, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levedura e 20 g de ágar a água desionizada até se obter um volume final igual a 1 litro. Ajustou-se o valor do pH para 7,5 com NaOH e esterilizou-se em autoclave à pressão de 15 libras/polegada quadrada, durante 15

minutos. Deixou-se o ágar arrefecer para 55°C antes da adição de 50 mg de canamicina esterilizada por filtração e depois verteu-se em pratos de Petri.

20 X SSC (por litro):

Dissolveu-se 175,3 g de NaCl e 88,2 g de citrato de sódio em 800 mL de água desionizada. Ajustou-se o valor do pH para 7,0 utilizando NaOH e completou-se o volume até 1 litro com água desionizada e depois esterilizou-se em autoclave à pressão de 15 libras/polegada quadrada, durante 15 minutos.

Tampão 50 X Tris-acetato (por litro):

Acrescentou-se 242 g de base Tris a 57,1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e completou-se a parte restante do volume, até 1 litro, com água desionizada e depois esterilizou-se em autoclave à pressão de 15 libras/polegada quadrada, durante 15 minutos.

Acetato de sódio-pH 5,2:

Dissolveu-se 4,08 g de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 8 mL de água destilada e ajustou-se o valor do pH para 5,2 com ácido acético diluído, ajustou-se o volume para 10 mL e esterilizou-se a solução em autoclave à pressão de 15 libras/polegada quadrada, durante 15 minutos.

Pesquisa da biblioteca genómica de *B. cepacia*

Preparação das culturas para aplicação em placas

Utilizou-se caldo de amina NZ e de extracto de levedura (NZY), enriquecido com 0,2% (p/v) de maltose e MgSO_4 10 mM, que foi inoculado com uma única colónia de

XL1-Blue MRF de *E. coli* que ficou a crescer de um dia para o outro a 37°C. Colheu-se a cultura bacteriana por centrifugação a 4500 x G durante 15 minutos e recolocou-se o granulado em suspensão em MgSO₄ 10 mM, arrefecido com gelo, até se obter uma densidade óptica (DO) (a 600 nm) igual a 0,5. Acrescentou-se 200 µL da cultura bacteriana, recolocada em suspensão, a uma biblioteca de bacteriófagos diluídos à razão de 10⁻² e manteve-se tudo a incubar a 37°C durante 15 minutos. Acrescentou-se 3 mL de ágar superior NZY (48°C), verteu-se as células infectadas sobre uma placa de ágar NZY e manteve-se tudo a incubar de um dia para o outro a 37°C.

Sobreposição de membranas de Nylon

Cada placa de ágar, contendo culturas, foi sobreposta com uma membrana de nylon durante 2 minutos. Desnaturou-se a membrana em NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M durante 2 minutos e depois neutralizou-se em NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0) durante 5 minutos, antes de se enxaguar rapidamente em solução tampão de soluto salino de citrato de sódio (SSC) diluído duas vezes, contendo 0,2 M de Tris-HCl (pH 7,5). Colocou-se a membrana sobre papel 3MM da Whatman (RTM) para uma absorção rápida, tendo o ADN sido reticulado com a membrana, utilizando o aparelho de reticulação por UV 'Stratalinker' (RTM) regulado para uma energia de UV igual a 120000 µJ durante 30 segundos. As placas de ágar da transferência foram guardadas a 4°C.

Hibridação das membranas de nylon

As membranas de nylon foram pré-hibridadas a 68°C em tampão de hibridação (5 x SSC, reagente de bloqueio a 1%

(p/v) (acrescentado a partir da solução de bloqueio a 10% e esterilizada), N-lauroíl-sarcosina a 0,1% (p/v) e dodecil-sulfato de sódio a 0,02% (p/v) (SDS)). Decorridas 2 horas, substituiu-se o tampão de hibridação por tampão de hibridação recente, contendo a sonda marcada com digoxigenina com uma concentração final de 500 ng/mL, e manteve-se tudo a incubar de um dia para o outro a 68°C. Efectuou-se a lavagem dos filtros duas vezes (2x) durante 5 minutos em 2xSSC e SDS a 0,1% à temperatura ambiente e depois 2 x durante 15 minutos em 0,1 x SSC e SDS a 0,1% a 68°C.

Detecção imunológica

Os clones positivos foram identificados usando o estojo de detecção de ADN 'DIG' (Boehringer Mannheim). Lavou-se a membrana sumariamente com tampão de lavagem (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M (pH 7.5)) contendo 0,3% (p/v) de Tween 20, antes da incubação durante 30 minutos em 100 mL de solução de bloqueio (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M (pH 7,5) contendo reagente de bloqueio até uma concentração final de 1% (p/v)). Transferiu-se a membrana para um conjugado de anti-digoxigenina-AP na concentração de 150 mU/mL em 20 mL de solução de bloqueio e manteve-se tudo a incubar durante 30 minutos. Efectuou-se a remoção de todo o anticorpo-conjugado desligado por lavagem 2x durante 15 minutos em 100 mL de tampão de lavagem (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M (pH 7,5)). Fez-se o equilíbrio da membrana durante 2 minutos em tampão contendo 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ (pH 9,5), antes da incubação com 10 mL de uma solução de substrato corante (200 µL de solução de reserva de NBT/NCIP (Boehringer Mannheim) e

passando para 10 mL de uma solução de 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ (pH 9,5), ao abrigo da luz. Após a incubação de um dia para o outro, interrompeu-se a reacção lavando a membrana em 50 mL de tampão contendo 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0). Todos os passos, com excepção da reacção de cor, foram efectuados sob agitação. Os isolados positivos foram objecto de nova purificação por pesquisa secundária e terciária.

Excisão clonal singular do vector 'ZAP Express':

(i) Preparação do vector fagomídeo pBK-CMV excisado

Foram desenvolvidas a 37°C culturas independentes, de um dia para o outro, de XL1-Blue MRF de *E. coli*, enriquecidas com 0,2% (p/v) de maltose e de XL0LR de *E. coli* em caldo NZY. As culturas bacterianas foram colhidas por centrifugação a 4500 x g durante 15 minutos e foram recolocadas em suspensão em MgSO₄ 10 mM até se obter um valor de DO (600 nm) igual a 1,0. Introduziu-se num tubo de polipropileno 'Falcon 2059' os materiais seguintes: 200 µL de XL1-Blue MRF de *E. coli* com um valor de DO (600 nm) igual a 1,0, 250 µL da reserva de fagos (mais de 1 x 10⁵ partículas de fagos) e 1 µL de fago auxiliar 'ExAssist' (mais de 1 x 10⁶ ufp/mL) e manteve-se tudo a incubar a 37°C durante 15 minutos. Acrescentou-se 3 mL de caldo NZY e manteve-se a mistura de reacção a incubar a 37°C durante 3 horas, com agitação. Aqueceu-se a mistura de reacção a 65-70°C durante 20 minutos, seguindo-se a centrifugação a 4500 x g durante 15 minutos. Decantou-se o sobrenadante (que continha o vector fagomídeo pBK-CMV excisado, acondicionado sob a forma de partículas filamentosas de fagos) num tubo novo de polipropileno 'Falcon 2059' e guardou-se a 4°C.

(ii) Aplicação dos vectores fagomídeos excisados em placas

Acrescentou-se 200 µL de células XL0LR, recentemente desenvolvidas, com um valor DO (600 nm) igual a 1,0, a 10 µL e a 100 µL do sobrenadante dos fagos e manteve-se tudo a incubar a 37°C, durante 15 minutos. Acrescentou-se 300 µL de caldo NZY e manteve-se a mistura de reacção a incubar durante mais 45 minutos. Fez-se uma aplicação de 200 µL da mistura de células de cada reacção sobre placas de ágar com LB-canamicina (50 µg/mL) e manteve-se tudo a incubar de um dia para o outro a 37°C. Guardou-se as placas a 4°C e foram preparadas e guardadas a -80°C reservas em glicerol de uma única colónia purificada.

(iii) Purificação do ADN com 'Wizard (RTM) Plus SV Midiprep'

Purificou-se o ADN plasmídico, contendo a inserção de ADN, utilizando o estojo de purificação de ADN 'Wizard (RTM) Plus SV Midiprep'. Inoculou-se 50 mL de caldo NZY, enriquecido com ampicilina na concentração de 100 µg/mL, com uma única colónia de *E. coli* (contendo o plasmídeo pBK-CMV e a inserção) e deixou-se crescer de um dia para o outro a 37°C. Efectuou-se a colheita da cultura bacteriana por centrifugação a 4500 x g, durante 15 minutos, e com a massa obtida preparou-se nova suspensão em 3 mL de solução de refazer a suspensão celular 'Wizard (RTM) Plus SV Midiprep'. Realizou-se a citólise por adição de 3 mL de solução de citólise 'Wizard (RTM) Plus SV Midiprep'. Deixou-se o lisado sobre gelo durante 30 minutos, antes de se agitar vigorosamente, e depois centrifugou-se a 14000 x g durante 30 minutos a 4°C. Acrescentou-se o lisado límpido a 10 mL de

resina de refazer a suspensão 'Wizard (RTM) Plus SV Midiprep' a 30°C e transferiu-se para uma 'Midicolumn' carregada com 'Wizard (RTM) Plus SV Midiprep'. Aplicou-se uma pressão hipobárica para injectar a resina/ADN na 'Midicolumn' e lavou-se a coluna 2 x em 15 mL de solução de lavagem de coluna 'Wizard (RTM) Plus SV Midiprep' e secou-se durante 30 segundos. Transferiu-se a coluna média para um dispositivo de Eppendorf de 1,5 mL e centrifugou-se a 10000 x g numa microcentrifugadora, durante 2 minutos, para se remover todos os resíduos de solução de lavagem da coluna. Efectuou-se a eluição do ADN plasmídico com 300 µL de água isenta de nucleases, a 65-70°C, por centrifugação a 10000 x g, durante 20 segundos. Todas as partículas finas de resina foram removidas por centrifugação a 10000 x g, durante 5 minutos.

Calculou-se a concentração do ADN por meio de 'Gene Quant' (Pharmacia Biotech) e confirmou-se a pureza por electroforese feita sobre um gel de agarose a 1% (p/v) em 1 x TEA contrastado com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL.

Sequenciação do ADN em ABI

Acrescentou-se a inserção e ADN plasmídico, à razão de 50 ng/kb, num volume final de reacção de 10 µL, a 1,6 pmol de iniciador adequado (ver o Quadro 1) e também 4 µL da mistura de extinção do corante principal d-rodamina (Applied Biotechnologies). Submeteu-se a mistura de reacção a uma desnaturação inicial a 96°C durante 4 minutos e depois amplificou-se parcialmente com um amplificador de ADN de modelo 'GeneAmp 9600' (Roche Diagnostic Systems), do modo seguinte: 96°C durante 30 segundos, 50°C durante 15 segundos e 60°C durante 4 minutos. Depois de completados 25 ciclos, ajustou-se o volume da mistura de reacção para 100

μ L com água isenta de nucleases. Fez-se precipitar o ADN por adição de 2,5 volumes de etanol a 95% arrefecido com gelo e 3 μ L de acetato de sódio (pH 5,2) e manteve-se a incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Centrifugou-se a mistura de reacção a 18000 x g durante 15 minutos, removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se à massa de ADN etanol a 70% arrefecido com gelo e manteve-se a incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Centrifugou-se a mistura de reacção a 18000 x g durante 15 minutos, removeu-se o sobrenadante e secou-se a massa obtida por exposição ao ar. Efectuou-se a sequenciação do ADN num equipamento 'ABI 377 Prism'.

Cartografia epitópica da proteína BcrA

Efectuou-se a síntese de um conjunto de nonapeptidos sobreponíveis que cobriam a sequência derivada de aminoácidos da proteína BcrA (SEQ ID NO: 2) sobre pinos de polietileno com reagentes retirados de um estojo de pesquisa de epítomos (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, UK), conforme descrito por Geysen *et al.* (1987, *Journal of Immunological Methods*, 102: 259-274). Os péptidos foram utilizados então como base para um protocolo de ELISA (ensaio imunossorvente ligado a enzimas) para a detecção de anticorpos específicos nos soros retirados de doentes que padeciam de fibrose cística e infectados com *B. cepacia*. Os valores de absorvância resultantes do protocolo de ELISA serviram para determinar se os epítomos estavam localizados.

Geração de programas de pesquisa

Efectuou-se a introdução dos 518 resíduos aminoácidos da proteína BcrA de *B. cepacia* (SEQ ID NO: 2) no programa informático 'Chiron Developement' (Chiron Technologies). A partir destas sequências, foram gerados programas de síntese que permitiram representar a proteína BcrA sob a forma de um conjunto de péptidos sobreponíveis sequenciais, cada um deles com um comprimento de 9 aminoácidos. Cada péptido diferia do anterior apenas por um único aminoácido: isto é, o péptido um era constituído pelos aminoácidos 1 a 9; o péptido dois era constituído pelos aminoácidos 2 a 10, etc.. Isto continuou até ter sido abrangido todo o comprimento do gene BcrA.

Síntese de péptidos

Os péptidos foram sintetizados sobre pinos de polietileno dispostos segundo um formato convencional de microtitulação. A síntese dos péptidos foi realizada de acordo com a metodologia explicitada no manual de síntese de péptidos não cliváveis da 'Chiron Technologies'.

Aminoácidos

Os aminoácidos utilizados foram ésteres activados que tinham os seus grupos amino protegidos com o grupo 9-fluorenil-metoxi-carbonil (Fmoc) (Sigma, Calbiochem). Os péptidos foram sintetizados à razão de um aminoácido por pino, por dia.

Desprotecção Fmoc e lavagem

A remoção do grupo de protecção Fmoc foi realizada do modo a seguir descrito. Os blocos de pinos de polipropileno

foram mergulhados num banho que continha piperidina a 20% em dimetilformamida (DMF) (BDH Chemicals Ltd.) durante 20 minutos à temperatura ambiente. Efectuou-se a remoção dos blocos que foram depois lavados num banho de DMF durante 2 minutos. Efectuou-se a remoção do excesso de DMF e mergulhou-se os pinos num banho de metanol (BDH Chemicals Ltd.) durante 2 minutos. Repetiu-se este passo de lavagem três vezes, utilizando de cada vez um banho renovado de metanol. Deixou-se os blocos a secar ao ar numa câmara de ventilação de fumos, isenta de ácidos, durante 30 minutos.

Preparação dos aminoácidos para acoplamento

Efectuou-se a pesagem dos aminoácidos para se obter uma concentração final de 100 mM e dissolveu-se tudo num volume de 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT) (Sigma Chemicals Co.) em DMF, conforme especificado pelo programa.

Reacção de acoplamento

Efectuou-se uma aplicação de 100 μ L de ésteres de aminoácidos com protecção Fmoc em cavidades de placas de microtitulação de polipropileno, conforme especificado no programa. Os blocos de pinos desprotegidos foram colocados dentro das cavidades, fechados estanquemente num saco de plástico limpo e ficaram de um dia para o outro à temperatura ambiente.

Processamento dos blocos após o acoplamento

Os blocos dos pinos foram removidos das soluções de aminoácidos e foram colocados num banho de metanol durante 5 minutos à temperatura ambiente, com agitação. Depois de terem ficado a secar ao ar durante 2 minutos, os blocos

foram colocados num banho de DMF durante 5 minutos. Os passos de desprotecção, lavagem, acoplamento e lavagem prosseguiram até todos os aminoácidos estarem acoplados e todos os péptidos sintetizados sobre os pinos.

Desprotecção da cadeia lateral

Todos os grupos de protecção que serviam para proteger as funções das cadeias laterais foram removidos colocando os blocos de pinos numa mistura de ácido trifluoroacético, anisol e etanoditiol (Sigma Chemicals Co.) (19:1:1 v/v) durante 3 horas à temperatura ambiente. Os blocos foram então totalmente imersos em metanol durante 10 minutos e a seguir embebidos em ácido acético glacial a 0,5% (BDH Chemicals Ltd.) numa mistura de metanol/água (1:1 v/v) durante 1 hora. Os blocos foram mergulhados mais duas vezes em banhos de metanol durante 2 minutos e depois ficaram a secar ao ar de um dia para o outro numa câmara de ventilação de fumos, isenta de ácidos.

Colheita de soros de doentes com fibrose cística (FC)

Efectuou-se a colheita de um total de 17 soros, um de cada um dos 17 doentes com FC, tendo isso sido efectuado na unidade de fibrose cística do Hospital de Wythenshawe, Manchester, Reino Unido. Os soros do grupo 1 (n=5) foram colhidos a partir de doentes com FC infectados com *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, os soros do grupo 2 (n=4) foram colhidos a partir de doentes com FC infectados com *P. aeruginosa*, os soros do grupo 3 (n=2) foram colhidos a partir de doentes com FC, sem nenhuma indicação de infecção, quer com *P. aeruginosa* quer com *B. cepacia*, os soros do grupo 4A (n=4) foram colhidos a partir

de doentes com FC infectados com *B. cepacia*, mas que se encontravam bem de saúde, e os soros do grupo 4B (n=2) foram colhidos a partir de doentes com FC infectados com *B. cepacia*, mas que não estavam bem de saúde e se encontravam hospitalizados.

Protocolo de ELISA

Passo de bloqueamento: fez-se uma aplicação de 150 µL de albumina de soro de bovino a 3% (BSA), (Sigma Chemicals Co.), em soluto salino tamponado com fosfato (PBS), em cada cavidade de uma placa de microtitulação de modelo 'Falcon 3912'. Os blocos de pinos foram colocados dentro das cavidades e aí ficaram durante 1 hora à temperatura ambiente, sobre uma plataforma oscilante e rotativa a 100 r.p.m..

Adição do soro experimental: fez-se uma aplicação de 150 µL de soro experimental, diluído à razão de 1 para 500 em BSA a 3% em PBS, em placas de microtitulação. Os pinos foram colocados dentro das cavidades e ficaram a incubar de um dia para o outro a 4°C.

Passo de lavagem: a seguir à incubação, os pinos foram lavados 4 x durante 10 minutos num banho de PBS 0,01 M (pH 7,2). Entre lavagens, os pinos foram agitados e enxugados por absorção para remoção do excesso de solução de lavagem.

Adição de imunoglobulina G (IgG): após a lavagem, os pinos foram colocados em placas de microtitulação contendo 100 µL de mistura de peroxidase de rábano com anti-imunoglobulina G humana conjugada na cabra (IgG) (Sigma Chemical Co.), diluída à razão de 1 para 2000 em BSA a 3% em PBS. Manteve-se os pinos a incubar durante 1 hora à temperatura ambiente numa plataforma oscilante e rotativa a 100 r.p.m..

Passo de lavagem: antes da reacção do substrato, efectuou-se a lavagem dos pinos 4 x durante 10 minutos em banho PBS 0,01 M (pH 7,2). Entre lavagens, os pinos foram agitados e enxugados por absorção para remoção do excesso de solução de lavagem.

Reacção do substrato: dissolveu-se 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Sigma Chemical Co.) à razão de 0,5 mg/mL em 100 mL de tampão citrato (pH 4,0). A este tampão acrescentou-se peróxido de hidrogénio a 0,01% (v/v) (Sigma Chemical Co.). Efectuou-se uma aplicação de 150 µL em placas de microtitulação. Os pinos foram colocados dentro das cavidades e aí permaneceram à temperatura ambiente durante 30 minutos sobre uma plataforma oscilante e giratória a 100 r.p.m.. A remoção dos pinos para fora das cavidades interrompeu a reacção. Efectuou-se a leitura das placas de microtitulação utilizando um leitor de microplacas 'Titertek Multiskan® Plus', para um comprimento de onda de 405 nm.

Remoção do anticorpos para fora dos pinos

Removeu-se para fora dos pinos, por tratamento com ultra-sons, os anticorpos ligados, num banho de ultra-sons 'Decon' (Decon Laboratories) contendo uma solução de PBS 0,01 M / SDS a 1% (p/v) e 0,1% (p/v) de ureia (Sigma Chemical Co.), durante 20 minutos a 60°C. A seguir ao tratamento com ultra-sons efectuou-se a lavagem dos pinos 2 x durante 30 segundos em água aquecida a 60°C, seguindo-se uma outra lavagem em água (60°C) durante 1 hora. Os pinos foram colocados num banho contendo metanol em ebulição durante 30 segundos e depois ficaram a secar ao ar durante um período mínimo de 30

minutos. Depois disto, os pinos estavam prontos para o teste do soro seguinte.

Recolha dos dados de absorvância

Depois de todos os soros terem sido testados, foram reunidos todos os valores de absorvância a 405 nm para cada péptido e fez-se a determinação da sequência de aminoácidos dos epítomos. Os epítomos foram determinados por análise dos valores do grupo 3 e do grupo 4 e em comparação com os outros grupos. Os péptidos foram definidos sob a forma de uma sucessão peptídica (de 3 ou mais resíduos aminoácidos) com diferenças de valores de absorvância entre o grupo 4A e o grupo 3 superiores a 0,8.

Os resultados na cartografia de epítomos (Quadro 3) identificaram sete epítomos apresentados pela proteína, com as SEQ ID NOs: 11-17. Outros quatro epítomos putativos apresentados pela proteína tinham as SEQ ID NOs: 7-10.

Preparação da biblioteca que apresenta anticorpos de fagos e scFv

Produziu-se a biblioteca que apresenta anticorpos de fagos e scFv foram produzidas essencialmente conforme já descrito antes (Burnie *et al.*, 2000, *Infection & Immunity* 68: 3200-3209, obra que aqui se considera incorporada por referência). Dito de forma abreviada, preparou-se ARNm a partir de 20 mL de sangue periférico de um doente, por separação dos linfócitos sobre 'Ficoll', seguindo-se a extracção com tiocianato de guanidínio e a purificação de um oligo(dT) em coluna de celulose (Quick Prep mRNA; Pharmacia, St Albans, Reino Unido). A síntese do ADNc da primeira cadeia foi realizada com um iniciador de região

constante para a totalidade das quatro subclasses das cadeias pesadas da IgG humana (HulgG1 a 4), utilizando transcriptase inversa do vírus da mieloblastose das aves (HT Biotechnology, Cambridge, Reino Unido). Os genes do domínio variável da cadeia pesada foram amplificados por meio de operações de PCR primárias com iniciadores directos (HuJH1 1 a 6) e inversos (HuVH1 1a a 6a) de base familiar (todas as sequências de iniciadores de IgG supramencionadas estão explicitadas na obra de Marks, J. D. *et al.*, 1991. J. Mol. Biol. 222: 581-597, que aqui se considera incorporada por referência). Introduziu-se um local de restrição Sfil a montante do produto retrogerado VH3a, antes da montagem com um agregado diversificado de genes do domínio variável da cadeia leve. Estes também introduziram um fragmento ligador (Gli₄ Ser₃) e um local Not1 a jusante. Graças à utilização dos locais das enzimas de restrição, designados por Sfil e Not1, o produto foi clonado unidireccionalmente num vector fagomídeo. O vector ligado foi introduzido em *E. coli*TG1 por electroporação, tendo os fagos sido recuperados com o fago auxiliar M13K07 (Pharmacia).

Péptidos para exploração

Para enriquecer o scFv, específico do antigénio, pesquisou-se a biblioteca de fagos em presença de péptidos decapentaméricos (15-meros) que representam quatro dos epítomos delineados por cartografia de epítomos: Péptido 1: AIISFGFMAFFGSVV (SEQ ID NO: 18) que incorpora o epítomo 2 (SEQ ID NO: 12) e o epítomo 3 (SEQ ID NO: 13); Péptido 2: SVVIFPLWQTVMGYT (SEQ ID NO: 19), que incorpora o epítomo 4 (SEQ ID NO: 14); e Péptido 3: HRLDRMVASFAFHR (SEQ ID NO: 20) que incorpora o epítomo 5 (SEQ ID NO: 115). A pesquisa

foi efectuada em imunotubos recobertos com o péptido (10 ng/mL) ou com o transportador purificado (1 mg/mL).

Os fagos ligados foram objecto de eluição com *E. coli* TG1 em fase logarítmica. Após a recuperação com M13K07, os fagos foram novamente pesquisados em presença dos péptidos durante mais três vezes. Recorreu-se à característica exclusiva do ADN de BstN1 (New England Biolabs, Hitchin, Reino Unido) para confirmar o enriquecimento do scFv específico, após ensaios sucessivos de prospecção.

Clonagem do *bcrA* em pBAD-TOPO

Antes de terem sido realizados os testes de sensibilidade aos antibióticos, efectuou-se a clonagem do gene *bcrA*, utilizando pBAD-TOPO (Invitrogen) em TOP10 *E. coli*.

Amplificação inicial

Realizou-se a amplificação do gene *bcrA* num amplificador de ADN de modelo 'GeneAmp 9600' (Roche Diagnostic Systems) com misturas de PCR contendo 1 µL de ADN plasmídico de *BcrA* purificado (aproximadamente 1 µg de ADN) com um volume de reacção final igual a 25 µL em 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ e contendo 200 µM de cada desoxinucleósido-trifosfato, 25 pmol/µL tanto para o iniciador directo de *BcrA* (5' CGA CGT CGC GGT GCC GAC GAT - SEQ ID NO: 21) como para o iniciador inverso de *BcrA* (5' ATG CCC CAT CGC CGG CCC CGC - SEQ ID NO: 22) e 5 U de polimerase do ADN de Taq (Boehringer Mannheim). As condições de amplificação do ADN corresponderam a uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguindo-se 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a

72°C. Após a amplificação, as amostras ficaram a incubar a 72°C e depois ficaram em repouso a 4°C. A resolução dos produtos amplificados foi feita por electroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-acetato, contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL. A banda foi cortada e retirada do gel e fundida por aquecimento a 65°C durante 10 minutos.

Clonagem de bcrA em pBAD-TOPO e transformação em TOP10 E. coli

Acrescentou-se 3 µL de produto de PCR recente a 1 µL do vector BAD-TOPO num volume de reacção final igual a 5 µL e manteve-se tudo a incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos. Acrescentou-se 2 µL do produto da reacção de clonagem pBAD-TOPO a um frasco de 'One Shot Chemically Competent TOP10 *E. coli*' e manteve-se tudo a incubar durante 30 minutos. As células foram depois submetidas a um choque térmico a 42°C antes da incubação sobre gelo durante 2 minutos. Após a adição de 250 µL de meio SOC, as células ficaram a incubar horizontalmente a 37°C durante 1 hora. O material resultante da transformação foi espalhado sobre uma placa contendo ampicilina LB previamente aquecida (100 µg/mL) e ficou tudo a incubar de um dia para o outro a 37°C.

Análise dos clones positivos

Efectuou-se a análise dos clones positivos por PCR. A amplificação foi efectuada num amplificador de ADN de modelo 'GeneAmp 9600' (Roche Diagnostic Systems) com misturas de PCR contendo 1 µL de ADN plasmídico purificado, extraído dos clones positivos, utilizando o protocolo de

'Qiagen Mini Prep' (Qiagen) com um volume de reacção final igual a 25 μ L em 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, contendo 200 μ M de cada desoxinucleósido-trifosfato, 25 pmol/ μ L quer do iniciador directo interno quer do iniciador inverso vectorial e 5 U de polimerase do ADN de Taq (Boehringer Mannheim). As condições de amplificação do ADN corresponderam a uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguindo-se 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C. Após a amplificação, manteve-se as amostras a incubar a 72° e depois ficaram em repouso a 4°C. A resolução dos produtos amplificados foi feita por electroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-acetato, contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 μ g/mL. Foram feitas reservas de clones positivos em glicerol.

Expressão do produto de PCR

Para cada transformante inoculou-se em 2 mL de LB, contendo ampicilina na concentração de 100 μ g/mL, uma única colónia de *E. coli* e manteve-se tudo a incubar de um dia para o outro a 37°C, com agitação. Acrescentou-se 0,1 mL desta cultura, obtida de um dia para o outro, a 10 mL de LB contendo ampicilina na concentração de 100 μ g/mL. Induziu-se a expressão de proteína por adição de L-arabinose nas concentrações de 20, 2, 0,2 e 0,002% e manteve-se tudo a incubar a 37°C, com agitação durante 4 horas. Fez-se um agregado da cultura por centrifugação a 5000xg durante 10 minutos e refez-se a suspensão em 450 μ L de SDS a 10% e 50 μ L de DTT 10 mM (oxidado). A massa recolocada em suspensão foi guardada a -20°C até voltar a ser necessária para processamento.

Análise por SDS-PAGE

Foram fervidas amostras bacterianas a 100°C durante 15 minutos. Acrescentou-se 12 µL da amostra fervida a 3 µL de tampão de amostragem para SDS-PAGE (electroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS) e ferveu-se a 100°C durante 5 minutos. Fez-se uma aplicação de 10 µL sobre gel 'NOVEX' e realizou-se o ensaio durante 35 minutos a 200 V e depois transferiu-se por absorção para PVDF a 25 V durante 1 hora.

Absorção ocidental

A absorção foi inicialmente bloqueada com leite em pó a 2% em PBS contendo Tween-20 (MPBST) durante 1 hora a 37°C. Lavou-se a mancha de absorção duas vezes durante 10 minutos com tampão de lavagem (0,9% (p/v) NaCl, 0,01% Tween-20). Manteve-se a mancha de absorção a incubar, para uma diluição de 1:5000 de epítipo anti-V5 (Invitrogen) em MPBST durante 1 hora à temperatura ambiente e depois lavou-se 3 x durante 10 minutos em tampão de lavagem. Manteve-se a mancha de absorção a incubar, com uma diluição de 1:5000, de conjugado com anti-fosfatase alcalina do murganho (Sigma) em MPBST durante 1 hora à temperatura ambiente e lavou-se 3 x durante 10 minutos em tampão de lavagem. A reacção de cor foi induzida por adição de uma pastilha de BCIP/NBT (Sigma) a 10 mL de água durante < 10 minutos.

Determinação da CIM pelo método de diluição do caldo de microtitulação

Os microrganismos TOP10 *E. coli*, com ou sem (\pm) *bcrA* ficaram a crescer até atingirem uma concentração de 2×10^4 ufc/mL (o *bcrA*⁺ desenvolveu-se na presença de ampicilina na concentração de 100 µg/mL para selecção do vector pBAD-TOPO)

em meio RPMI (Sigma) na presença de L-arabinose a 0,002%, enquanto indutor do gene *bcrA*. Fez-se uma aplicação de 100 µL de TOP10 *E. coli* ± *bcrA* numa placa de microtitulação de 96 cavidades (Sigma) para se obter uma concentração final de 1×10^4 ufc/mL. Foram preparadas diluições sequenciais de antibiótico, para metade de cada vez, que foram acrescentadas a cada cavidade, com a concentração variando entre 500 e 0,24 µg/mL. Manteve-se as placas a incubar durante 24 horas a 37°C e fez-se um registo, quer da existência de crescimento quer da inexistência de crescimento.

Demonstração da actividade dos fagos em presença de ácido nalidíxico

Manteve-se TOP10 *E. coli* + *bcrA* a crescer até uma concentração de 2×10^4 ufc/mL em meio RPMI (Sigma) contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL (para selecção do vector pBAD-TOPO) na presença de L-arabinose a 0,002%, enquanto indutor do gene *bcrA*. Fez-se uma aplicação de 100 µL de TOP 10 *E. coli* + *bcrA* para uma concentração final de 1×10^4 ufc/mL, numa placa de microtitulação de 96 cavidades (Sigma) na presença do fago puro e do fago diluído a 1:10 (ver o quadro subsequente). Acrescentou-se a cada cavidade diluições sequenciais de ácido nalidíxico, para metade, com a concentração a variar entre 128 e 0,25 µg/mL. Também foi experimentada uma contraprova constituída apenas por meios. As placas ficaram a incubar durante 24 horas a 37°C. Foram experimentados seis clones de fagos.

RESULTADOS

Sequenciação do gene bcrA

Foi identificada e sequenciada uma sequência de ADN com 3500 pb. Na sequência clonada havia um único bloco de leitura ininterrupta que continha a sequência de codificação de *bcrA* (SEQ ID NO: 1).

Estrutura e localização da proteína BcrA

A sequência de *bcrA* continha um único bloco de leitura ininterrupta que codifica uma proteína, designada por BcrA (SEQ ID NO: 2), com 518 resíduos aminoácidos e com um peso molecular previsto de 49 kD.

Comparação da proteína BcrA com a sequência de bombas de efluxo congêneres

Fez-se o alinhamento da sequência de aminoácidos da *BcrA* com os produtos codificados do gene *emrB* de *E. coli* e com o gene *qacA* de *S. aureus*. Os resultados de uma correspondência de identidades, utilizando a aplicação informática de pesquisa 'align' (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/search-launcher>) revelou que a *BcrA* tinha uma homologia de 48,8% com a proteína EmrB e de 20,1% com a proteína QacA. Também se concluiu que a *BcrA* tem uma homologia de 84,8% com a proteína AF 110185 de *Burkholderia pseudomallei*. Os dados laboratoriais mostram que a *BcrA* é uma bomba de antibiótico. Não foram encontrados nenhuns locais conhecidos de ligação de ATP na sequência de aminoácidos da *BcrA*, o que confirma que o gene *bcrA* não pertence à família de transportadores da cassete (ABC) de ligação de ATP, pertencendo antes à família MFS das bombas de efluxo.

Cartografia epitópica da proteína BcrA

No quadro 3 estão representados péptidos nonaméricos que revelam uma nítida reactividade com os soros dos doentes do grupo 4A (doentes com FC infectados com *Burkholderia cepacia*, mas de boa saúde), comparativamente com os soros dos doentes do grupo 3 (doentes com FC, sem indicações de infecção, nem com *B. cepacia* nem com *Pseudomonas aeruginosa*). Foram identificados sete epítomos a partir da experiência de cartografia de epítomos, designadamente o epítomo 1: VISSYS (SEQ ID NO: 11), o epítomo 2: ISFGFMA (SEQ ID NO: 12), o epítomo 3: MAFFGS (SEQ ID NO: 13), o epítomo 4: QTVMGYT (SEQ ID NO: 14), o epítomo 5: LRMVASF (SEQ ID NO: 15), o epítomo 6: FFVPMTT (SEQ ID NO: 16) e o epítomo 7: LLHLSAI (SEQ ID NO: 17).

Biblioteca que apresenta anticorpos dos fagos e scFv

Cada um dos péptidos 1-3 (SEQ ID NOs 18-20) produziu dois fagos com características específicas dominantes diferentes. Estes eram os fagos 1-6 marcados (sendo os fagos 1 e 2 reactivos em presença do péptido 1, os fagos 3 e 4 reactivos em presença do péptido 2 e os fagos 5 e 6 reactivos em presença do péptido 3). Os fagos variaram em número na prospecção final de 2-4 cópias. Avaliou-se a actividade dos fagos em presença do gene *bcrA* por clonagem em TOP10 *E. coli*.

Expressão do gene bcrA em TOP10 E. coli

A análise pela absorção ocidental confirmou que o gene *bcrA* havia sido clonado em TOP10 *E. coli* e que tinha sido

expresso com um peso molecular aparente de cerca de 46 kD (resultados não apresentados).

Resistência aos antibióticos conferida pelo bcrA em TOP10 E. coli

No quadro 4 estão indicados os valores da concentração inibidora mínima (CIM) para os antibióticos tetraciclina, cloro-hexadina, ácido nalidíxico e ciprofloxacina em presença de TOP10 *E. coli* \pm *bcrA*. O gene *bcrA* não conferiu nenhuma resistência contra a cloro-hexadina nem contra a ciprofloxacina em TOP10 *E. coli*. Pelo contrário, observou-se uma diferença melhor para o dobro na CIM no caso da tetraciclina e uma diferença na CIM melhor para o triplo no caso do ácido nalidíxico em TOP10 *E. coli* \pm *bcrA* (Quadro 4).

Actividade dos fagos contra a resistência ao ácido nalidíxico

Foram testados seis clones de fagos TOP10 *E. coli* \pm *bcrA* (fagos 1 e 2 reactivos contra o péptido 1 [SEQ ID NO: 18]; fagos 3 e 4 reactivos contra o péptido 2 [SEQ ID NO: 19]; e fagos 5 e 6 reactivos contra o péptido 3 [SEQ ID NO: 20]), obtidos a partir da experiência de prospecção (*supra*), para se pesquisar a sua actividade contra o ácido nalidíxico (quadro 5). Comparativamente com o valor da CIM dos fagos de contraprova (16 μ g/mL), quatro dos seis fagos revelaram actividade. A actividade foi pronunciada ao máximo com o fago 1 (que revelou reactividade contra o péptido 1 (SEQ ID NO: 18)).

DISCUSSÃO

Com as bactérias, as bombas de resistência a multifármacos (rmf) foram assinaladas pela primeira vez a

propósito de *Staphylococcus aureus* (Lomovskaya, O. e Lewis, K.. 1992, *supra*). Também foram assinaladas e descritas bombas de rnf singulares, a propósito de *Escherichia coli* (*emrB*) e de *Bacillus subtilis* (*bmr*) (Neyfakh, A. A, 1992, *Antimicrobial Agents. Chemother.*, 36: 484-485). O gene *bcrA* de *Burkholderia cepacia* pertence a esta família de translocases membranares e pode proteger a célula contra os antibióticos ou contra outras moléculas pequenas.

A sequência de aminoácidos traduzida do gene *bcrA* revela elevada homologia com a proteína EmrN de *E. coli* e com a proteína QacA de *S. aureus*. Dados laboratoriais mostram que o gene *bcrA* codifica uma translocase membranares e que pertence à família MFS das bombas de efluxo de multifármacos.

A proteína BcrA apresenta uma estrutura típica de uma translocase membranares integral, com 10 hélices α envolvendo a membrana. A proteína BcrA revela homologia com outras membranas da mesma família. A proteína é uma substância útil sob o ponto de vista terapêutico e de diagnóstico e pode ser utilizada para a imunização activa, como uma vacina, como um medicamento para imunização passiva, contendo anticorpos específicos contra essa proteína, e para isolar compostos úteis, sob o ponto de vista terapêutico e de diagnóstico, que actuem contra ela.

Quadro 1: descrição dos iniciadores de PCR seleccionados

Nome do oligonucleótido	Sequência	Descrição
EMRN	SEQ ID NO: 3	Localizado na extremidade 5' do gene <i>bcrA</i>
EMRC	SEQ ID NO: 4	Localizado na extremidade 3' do gene <i>bcrA</i>
M13 directo (-20)	SEQ ID NO: 5	Iniciador vectorial
M13 inverso	SEQ ID NO: 6	Iniciador vectorial
BcrA directa	SEQ ID NO: 21	Localizado na extremidade 5' do gene <i>bcrA</i>
BcrA inversa	SEQ ID NO: 22	Localizado na extremidade 3' do gene <i>bcrA</i>

Todos os iniciadores oligonucleotídicos foram sintetizados por HPLC de fase reversa (Genosys Biotechnologies Ltd), recorrendo à química convencional da fosforamidite

Quadro 2: domínios transmembranares da proteína *BcrA*

Hélice	Início	Fim	Classificação	Certeza
1	16	36	1,877	Certo
2	41	61	1,089	Certo
3	64	84	1,478	Certo
4	92	112	1,918	Certo
5	120	140	0,925	Putativo
6	144	164	2,109	Certo
7	175	195	1,236	Certo
8	213	233	1,581	Certo
9	245	265	0,914	Putativo
10	284	304	2,352	Certo

(continuação)

Hélice	Início	Fim	Classificação	Certeza
11	313	333	1,640	Certo
12	379	399	1,973	Certo
13	411	431	0,764	Putativo
14	488	508	1,884	Certo

Segmentos elegíveis de envolvimento da membrana da proteína BcrA utilizando TopPred 2 (von Heijne, G., 1992, J. Mol. Biol., 225: 287-494). Apresenta-se a listagem de cada uma das dez hélices α , possuindo cada uma delas um comprimento de 20 aminoácidos. Atribui-se uma classificação a cada hélice α , com base na sua hidrofobicidade e probabilidade de residir dentro da membrana. A partir da classificação, apresenta-se a probabilidade de a sequência ser uma hélice α de envolvimento da membrana.

Quadro 3: resultados da cartografia peptídica da proteína BcrA pelo protocolo ELISA

Péptido	Epítopo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4A	Grupo 4B
62	1 (SEQ ID NO:11)	0,950±0,36	0,965±0,36	0,393±0,08	1,284±0,261	0,624±0,375
63	1 (SEQ ID NO:11)	0,906±0,38	1,074±0,56	0,377±0,04	1,297±0,337	0,672±0,412
64	1 (SEQ ID NO:11)	0,838±0,36	1,071±0,43	0,356±0,04	1,232±0,251	0,704±0,405
284	2 (SEQ ID NO:12)	0,981±0,39	1,075±0,36	0,423±0,05	1,220±0,304	0,675±0,419
285	2 (SEQ ID NO:12)	0,825±0,38	1,017±0,35	0,375±0,02	1,141±0,358	0,667±0,338
286	2 (SEQ ID NO:12)	0,786±0,37	0,915±0,32	0,341±0,02	1,149±0,404	0,718±0,460

(continuação)

Péptido	Epítopo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4A	Grupo 4B
288	3 (SEQ ID NO:13)	0,931±0,28	1,199±0,43	0,467±0,02	1,595±0,697	0,714±0,451
289	3 (SEQ ID NO:13)	0,915±0,32	1,022±0,32	0,432±0,02	1,313±0,408	0,669±0,434
290	3 (SEQ ID NO:13)	0,859±0,39	1,103±0,45	0,373±0,04	1,034±0,274	0,679±0,421
291	3 (SEQ ID NO:13)	0,898±0,36	1,178±0,39	0,373±0,03	1,108±0,302	0,636±0,285
302	4 (SEQ ID NO:14)	0,899±0,28	1,151±0,37	0,452±0,04	1,250±0,143	0,570±0,342
303	4 (SEQ ID NO:14)	0,956±0,32	1,135±0,38	0,451±0,01	1,247±0,141	0,654±0,381
304	4 (SEQ ID NO:14)	0,971±0,31	1,113±0,31	0,492±0,03	1,399±0,415	0,579±0,347
339	5 (SEQ ID NO:15)	1,002±0,35	1,168±0,37	0,430±0,06	1,222±0,203	0,644±0,337
340	5 (SEQ ID NO:15)	1,111±0,43	1,256±0,44	0,545±0,04	1,382±0,210	0,727±0,451
341	5 (SEQ ID NO:15)	0,946±0,32	1,112±0,35	0,481±0,01	1,352±0,328	0,651±0,330
384	6 (SEQ ID NO:16)	0,961±0,28	1,066±0,31	0,475±0,05	1,189±0,276	0,644±0,278
385	6 (SEQ ID NO:16)	0,997±0,26	1,202±0,36	0,498±0,08	1,545±0,390	0,713±0,437
386	6 (SEQ ID NO:16)	0,807±0,30	1,004±0,20	0,415±0,03	1,152±0,684	0,627±0,350
486	7 (SEQ ID NO:17)	1,035±0,25	1,144±0,25	0,520±0,04	1,243±0,369	0,690±0,379
487	7 (SEQ ID NO:17)	0,958±0,38	1,059±0,33	0,447±0,05	1,223±0,250	0,666±0,389
488	7 (SEQ ID NO:17)	0,897±0,40	0,924±0,31	0,338±0,03	1,296±0,542	0,648±0,362

GRUPO 1: doentes com FC infectados com *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* (n=5)

GRUPO 2: doentes com FC infectados com *Pseudomonas aeruginosa* (n=4)

GRUPO 3: doentes com FC sem infecção com *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* (n=2)

GRUPO 4A: doentes com FC infectados com *Burkholderia cepacia* (boa saúde) (n=4)

GRUPO 4B: doentes com FC infectados com *Burkholderia cepacia* e já doentes e no hospital (n=2)

Quadro 4: desenvolvimento de TOP10 *E. coli* ± *bcrA* expostos a diversos antibióticos (µg/mL)

TOP10 <i>E. coli</i> + <i>bcrA</i>											
<i>Antibiótico</i> (µg/mL)	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Tetraciclina	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Cloro-hexadina	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Ácido nalidíxico	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Ciprofloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TOP10 <i>E. coli</i> + <i>bcrA</i>											
<i>Antibiótico</i> (µg/mL)	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Cloro-hexadina	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Ácido nalidíxico	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Ciprofloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Quadro 5: actividade do clone de fagos contra a resistência de TOP10 *E. coli* ± *bcrA* ao ácido nalidíxico

Fagos	Ácido nalidíxico CIM (µg/mL)
Sem fagos (<i>bcrA</i> +) 16	16
Contraprova de fagos	16
1	2
2	16
3	8
4	16
5	8
6	4

Listagem das Sequências

<110> NeuTec Pharma plc

<120> Composições antimicrobianas

<130> M99/0582/PCT

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 1554

<212> ADN

<213> *Burkholderia cepacia*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1554)

<400> 1

atg tcc gcc acc acg gca tcc gcc gcg tcc cct gcc gcc gaa ccg gcg 48
 Met Ser Ala Thr Thr Ala Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ala Glu Pro Ala
 1 5 10 15

ccg ctg tcc ggc ggc gcc ctc gcg ctg ctc acc gtc ggg ctc gcg ctc 96
 Pro Leu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Leu Leu Thr Val Gly Leu Ala Leu
 20 25 30

ggc acg ttc atg gaa gtg ctc gac acg tcg atc ggc gac gtc gcg gtg 144
 Gly Thr Phe Met Glu Val Leu Asp Thr Ser Ile Gly Asp Val Ala Val
 35 40 45

ccg acg att ttg tgc agc ctc ggc gtc gcg acc agc gaa ggc acg tgg 192
 Pro Thr Ile Leu Cys Ser Leu Gly Val Ala Thr Ser Glu Gly Thr Trp
 50 55 60

gtg att tcs tcc/tat tcc gtc gcg tcc gcg atc gcg gtg ccc ctg acc 240
 Val Ile Xaa Ser Tyr Ser Val Ala Ser Ala Ile Ala Val Pro Leu Thr
 65 70 75 80

ggc tgg ctt gcc cgg cgc gtc ggc gaa gtg cgg ctg ttc acc ctg tcc 288
 Gly Trp Leu Ala Arg Arg Val Gly Glu Val Arg Leu Phe Thr Leu Ser
 85 90 95

gtg ctc gcg ttc acg atc gcg tcc gcg ctc tgt ggc ctc gca/ttg aac 336
 Val Leu Ala Phe Thr Ile Ala Ser Ala Leu Cys Gly Leu Ala Leu Asn
 100 105 110

ttc gag acg ctg atc gcg ttt cgg ctg ctg cag ggc ctc gtg tcc ggg 384
 Phe Glu Thr Leu Ile Ala Phe Arg Leu Leu Gln Gly Leu Val Ser Gly
 115 120 125

ccg atg gtg ccc ctg tcc cag acg atc ctg acg cgc agc tat ccc ccc 432
 Pro Met Val Pro Leu Ser Gln Thr Ile Leu Met Arg Ser Tyr Pro Pro
 130 135 140

gcg aag cgc ggg ctc gcg ctc gcc tta tgg gcg atg acg gtg atc gtc 480
 Ala Lys Arg Gly Leu Ala Leu Gly Leu Trp Ala Met Thr Val Ile Val
 145 150 155 160

gcg ccg atc ttc gcc ccc ctg ctc gcc gcc tgg atc agc gac aac tac 528
 Ala Pro Ile Phe Gly Pro Leu Leu Gly Gly Trp Ile Ser Asp Asn Tyr
 165 170 175

acg tgg ccc tgg atc ttc tac atc aat ctg ccc atc ggg att ctc tcc 576
 Thr Trp Pro Trp Ile Phe Tyr Ile Asn Leu Pro Ile Gly Ile Phe Ser
 180 185 190

gcg acc tgc gcg ttc ttc ctg ctg gcc cgc gag acg aag acg acg aac 624

Ala Thr Cys Ala Phe Phe Leu Leu Gly Arg Glu Thr Lys Thr Thr Lys	
195	200
205	
cag cgg atc gac gcg gtc ggg ctc acg ctg ctc gtg atc ggc gtg tcg	872
Gln Arg Ile Asp Ala Val Gly Leu Thr Leu Leu Val Ile Gly Val Ser	
210	215
220	
tgc ctg cag atg atg ctc gac ctc ggc aag gac cgc gac tgg ttc agc	720
Cys Leu Gln Met Met Leu Asp Leu Gly Lys Asp Arg Asp Trp Phe Ser	
225	230
235	240
tog teg ttc atc gtt cgc gct cgc ctg atc gcg gtc gtg teg ctc gcg	768
Ser Ser Phe Ile Val Arg Ala Arg Leu Ile Ala Val Val Ser Leu Ala	
245	250
255	
ttc atg ctc gtc tgg gaa gcg acc gag aag gag ccg gtg gtc gac cta	816
Phe Met Leu Val Trp Glu Ala Thr Glu Lys Glu Pro Val Val Asp Leu	
260	265
270	
ogc ctg ttc aag gat cgc aac ttt gct cgg cgc gct atc atc teg ttc	864
Arg Leu Phe Lys Asp Arg Asn Phe Ala Arg Arg Ala Ile Ile Ser Phe	
275	280
285	
ggc ttc atg gcg ttc ttc ggc tcg gtc gtg atc ttc ccg ctg tgg cag	912
Gly Phe Met Ala Phe Phe Gly Ser Val Val Ile Phe Pro Leu Trp Gln	
290	295
300	
acc gtg atg ggc tac acg gcc ggc aag gca ctt ccg gcg acc gcg ccg	960
Thr Val Met Gly Tyr Thr Ala Gly Lys Ala Leu Pro Ala Thr Ala Pro	
305	310
315	320
gtt ggg ctg ctc gcg ctc gtg ctg tcg ccg ctg atc ggc cgc aac atg	1008
Val Gly Leu Leu Ala Leu Val Leu Ser Pro Leu Ile Gly Arg Asn Met	
325	330
335	
cac cgg ctc gac ctg cgg atg gtc gcg agc ttc gcc ttt cat cgt gtt	1056
His Arg Leu Asp Leu Arg Met Val Ala Ser Phe Ala Phe His Arg Val	

340	345	350	
tcg cga tcy tat cgg tta tgg aac tcy acc ttt acc ctc gac gtg ttt			1104
Ser Arg Ser Tyr Arg Leu Trp Asn Ser Thr Phe Thr Leu Asp Val Phe			
355	360	365	
ttc aac cac gtg atc ctg ccg cgg ctc ggc cag ggg atc ggc gtc gcg			1152
Phe Asn His Val Ile Leu Pro Arg Leu Val Gln Gly Ile Gly Val Ala			
370	375	380	
tgc ttc ttc gtg ccg atg acc acc atc acc ctg tcy agc atc ccc gac			1200
Cys Phe Phe Val Pro Met Thr Thr Ile Thr Leu Ser Ser Ile Pro Asp			
385	390	395	400
gag cgg ctg gcg agc gcc tcy ggc ctg tcy aac ttc ctg cgt acc ctg			1248
Glu Arg Leu Ala Ser Ala Ser Gly Leu Ser Asn Phe Leu Arg Thr Leu			
405	410	415	
tcy ggc gcg atc ggc acc gcg gtc agc tcy acc ttc tgg gag aac gac			1296
Ser Gly Ala Ile Gly Thr Ala Val Ser Ser Thr Phe Trp Glu Asn Asp			
420	425	430	
gcg atc tac cac cac gcg cgg ctc gcc gaa tcy gtc agc gtc tat gcg			1344
Ala Ile Tyr His His Ala Arg Leu Ala Glu Ser Val Ser Val Tyr Ala			
435	440	445	
cag aac acc gcc aac gcc caa ctg aac cag atc gtc acc caa gca ggg			1392
Gln Asn Thr Thr Asp Tyr Gln Gly Ala Leu Ala Gln Leu Gly Val Val			
450	455	460	
ggc cag acc gcg aac gcg caa ctg aac cag atc gtc acc caa gca ggg			1440
Gly Gln Thr Ala Asn Ala Gln Leu Asn Gln Ile Val Thr Gln Ala Gly			
465	470	475	480
ctt cat gat gcc gac caa cga ctt ctt cac ctg tcy gcg atc gtc ttc			1488
Leu His Asp Gly Asp Gln Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Ile Val Phe			
485	490	495	

gtc ggc ctc gcc gcc ctc gtc tgg atc acg aag ccg aag aag ggc gcc 1536
 Val Ala Leu Ala Ala Leu Val Trp Ile Thr Lys Pro Lys Lys Gly Ala
 500 505 510

ggg ccg gcc atg ggg cat 1554
 Gly Pro Ala Met Gly His
 515

<210> 2

<211> 518

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 2

Met Ser Ala Thr Thr Ala Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ala Glu Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Leu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Leu Leu Thr Val Gly Leu Ala Leu
 20 25 30

Gly Thr Phe Met Glu Val Leu Asp Thr Ser Ile Gly Asp Val Ala Val
 35 40 45

Pro Thr Ile Leu Cys Ser Leu Gly Val Ala Thr Ser Glu Gly Thr Trp
 50 55 60

Val Ile Xaa Ser Tyr Ser Val Ala Ser Ala Ile Ala Val Pro Leu Thr
 65 70 75 80

Gly Trp Leu Ala Arg Arg Val Gly Glu Val Arg Leu Phe Thr Leu Ser
 85 90 95

Val Leu Ala Phe Thr Ile Ala Ser Ala Leu Cys Gly Leu Ala Leu Asn
 100 105 110

Phe Glu Thr Leu Ile Ala Phe Arg Leu Leu Gln Gly Leu Val Ser Gly

Val Gly Leu Leu Ala Leu Val Leu Ser Pro Leu Ile Gly Arg Asn Met
 325 330 335

His Arg Leu Asp Leu Arg Met Val Ala Ser Phe Ala Phe His Arg Val
 340 345 350

Ser Arg Ser Tyr Arg Leu Trp Asn Ser Thr Phe Thr Leu Asp Val Phe
 355 360 365

Phe Asn His Val Ile Leu Pro Arg Leu Val Gln Gly Ile Gly Val Ala
 370 375 380

Cys Phe Phe Val Pro Met Thr Thr Ile Thr Leu Ser Ser Ile Pro Asp
 385 390 395 400

Glu Arg Leu Ala Ser Ala Ser Gly Leu Ser Asn Phe Leu Arg Thr Leu
 405 410 415

Ser Gly Ala Ile Gly Thr Ala Val Ser Ser Thr Phe Trp Glu Asn Asp
 420 425 430

Ala Ile Tyr His His Ala Arg Leu Ala Glu Ser Val Ser Val Tyr Ala
 435 440 445

Gln Asn Thr Thr Asp Tyr Gln Gly Ala Leu Ala Gln Leu Gly Val Val
 450 455 460

Gly Gln Thr Ala Asn Ala Gln Leu Asn Gln Ile Val Thr Gln Ala Gly
 465 470 475 480

Leu His Asp Gly Asp Gln Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Ile Val Phe
 485 490 495

Val Ala Leu Ala Ala Leu Val Trp Ile Thr Lys Pro Lys Lys Gly Ala
 500 505 510

Gly Pro Ala Met Gly His

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador PCR

<400> 3

cccgatcggc agattgatgt 20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador PCR

<400> 4

gacgtcgcgg tgccgacgat 20

<210> 5

<211> 14

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador PCR

<400> 5

ttcacaggaa acag 14

<210> 6

<211> 14

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador PCR

<400> 6

ttcacaggaa acag 14

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 7

Pro Leu Leu Gly Gly

1

5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 8

Pro Leu Leu Arg Gly

1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 9

Leu Asp Leu

1

<210> 10

<211> 3

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 10

Asp Leu Arg

1

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 11

Val Ile Ser Ser Tyr Ser

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 12

Ile Ser Phe Gly Phe Met Ala

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 13

Met Ala Phe Phe Gly Ser

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 14

Gln Thr Val Met Gly Tyr Thr

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 15

Leu Arg Met Val Ala Ser Phe

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 16

Phe Phe Val Pro Met Thr Thr

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 17

Leu Leu His Leu Ser Ala Ile

1 5

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 18

Ala Ile Ile Ser Phe Gly Phe Met Ala Phe Phe Gly Ser Val Val

1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 19

Ser Val Val Ile Phe Pro Leu Trp Gln Thr Val Met Gly Tyr Thr

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> *Burkholderia cepacia*

<400> 20

His	Arg	Leu	Asp	Leu	Arg	Met	Val	Ala	Ser	Phe	Ala	Phe	His	Arg
1				5					10					15

<210> 21

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador PCR

<400> 21

cgacgtcgcg gtgccgacga t 21

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Iniciador PCR

<400> 22

atgccccatc gccggccccg c 21

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o EPO não assume nenhuma responsabilidade.

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- JARVIS, W.R. *et al.* *Eur. J. Epidemiol.*, 1987, vol.3, 233-36 [0002]
- SAJJAN, U.S. *et al.* *J. Clin. Invest.*, 1992, vol. 89, 648-56 [0002]
- GOVAN, J.R.W. *et al.* *Lancet*, 1993, vol. 342, 15-19 [0002]
- ISLES, A. *et al.* *J. Pediatr.*, 1984, vol. 104, 206-210 [0003]
- LIPUMA, J.J. *et al.* *Lancet*, 1990, vol. 336, 527-532 [0003]
- SOBEL, J.D. *et al.* *American J. Med.*, 1982, vol. 73, 183-186 [0004]
- PITT, T.L. *et al.* *J. Med. Microbiol.*, 1996, vol. 44(3), 203-210 [0004]
- NELSON, J.W. *et al.* *FEMS Immunol. Med. Micro.*, 1994, vol. 8, 89-98 [0004]
- BUMS, J.L. *et al.* *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, 1989, vol. 33, 136-141 [0004]
- SIMPSON, I.N. *et al.* *J. Antimicrob. Chemother.*, 1995, vol. 32, 339-341 [0004]

- **BUMS, J.L.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, vol. 40(2), 307-313 [0004]
- *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Julho de 1999, vol. 44 [0004]
- **DINH, T. et al.** *J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, 3825-3831 [0005]
- **MARGER, M.D.; SAIER, M.H.**, *Trends Biochem. Sci.*, 1993, vol. 18, 13-20 [0005]
- **HIGGINS, C.F.** *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1992, vol.8, 67-113 [0005]
- **SAIER, M.H.JR. et al.** *Mol. Microbiol.*, 1994, vol. 11, 1841-1847 [0005]
- **BURNIE et al.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1995, vol. 10, 157-164 [0006]
- **BOWIE et al.** *Science*, 1990, vol. 247, 1306-1310 [0008]
- *Computational Molecular Biology*. Oxford University Press, 1988 [0009]
- *Computer Analysis of Sequence DATA*. Humana Press, 1994 [0009]
- **VON HEINJE, G.** *Sequence Analysis in Molecular Biology*. Academic Press, 1987 [0009]
- *Sequence Analysis Primer*, M. Stockton Press, 1991 [0009]
- **ALTSCHUL, S.F. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0009]
- **ALTSCHUL, S.F. et al.** *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0009]
- **LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, vol. 89, 8938-8942 [0010]
- **ROUCH, D.A. et al.** *Mol. Microbiol.*, 1990, vol. 4(12), 2051-2062 [0010]

- **DESHAZER, D. et al.** *J. Bacteriology*, 1999, vol. 181(15), 4661-4664 [0010]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1.101-1.11011.45-11.61 [0015]
- **GEYSEN, H.M et al.** *Journal of Immunological Methods*, 1987, vol. 102, 259-274 [0018]
- **GEYSEN, H.M. et al.** *J. Mol. Recognit.*, 1988, vol. 1(1), 32-41 [0018]
- **JUNG, G.; BECK-SICKINGER, A.G.** *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 1992, vol. 31, 367-486 [0018]
- **GUPTA, S. et al.** *Biotechniques*, 1999, vol. 27(2), 328-332 [0018]
- Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopeia. Mack Publishing Company, 1984 [0022]
- **HARLOW, E.; LANE, D.** *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998 [0028]
- **GEYSEN et al.** *Journal of Immunological Methods*, 1987, vol. 102, 259-274 [0062]
- **BURNIE et al.** *Infection & Immunity*, 2000, vol. 68, 3200-3209 [0076]
- **MARKS, J.D. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0076]
- **NEYFAKH, A.A.** *Antimicrobial Agents. Chemother.*, 1992, vol. 36, 484-485 [0095]
- **VON HEIJNE, G.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 225, 287-494 [0099]

REIVINDICAÇÕES

1. Bomba de efluxo de multifármacos que possui a sequência designada por SEQ ID NO: 2 ou bomba de efluxo de multifármacos que possui pelo menos 90% de homologia com esta.
2. Bomba de efluxo de multifármacos de acordo com a reivindicação 1, que possui pelo menos 95% a 99% de homologia com a sequência designada por SEQ ID NO: 2.
3. Sequência nucleotídica que codifica uma bomba de efluxo de multifármacos de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores.
4. Sequência nucleotídica de acordo com a reivindicação 3 que possui a sequência designada por SEQ ID NO: 1.
5. Bomba de efluxo de multifármacos de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2, para utilização num método de tratamento ou de diagnóstico do corpo humano ou de um animal.
6. Utilização de uma bomba de efluxo de multifármacos de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2, ou de um seu fragmento imunogénico, que possua a sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20, para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma infecção por um organismo em que tenha lugar a sua expressão.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o medicamento é uma vacina.

8. Utilização de um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma infecção provocada por um organismo em que tenha lugar a sua expressão, sendo o inibidor constituído por um anticorpo ou por um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o medicamento contém também um antibiótico seleccionado entre o conjunto constituído por uma tetraciclina e uma quinolona.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 9, em que a quinolona é o ácido nalidíxico.

11. Preparação combinada de um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, conforme definido numa qualquer das reivindicações 1 ou 2, e pelo menos um antibiótico para utilização simultânea, separada ou sequencial no tratamento de uma infecção provocada por um organismo em que tenha lugar a expressão da referida bomba de efluxo de multifármacos, sendo o referido inibidor constituído por um anticorpo ou por um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20.

12. Utilização de um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, conforme definido numa qualquer das reivindicações 1 ou 2, para a preparação de um desinfectante para um organismo em que tenha lugar a sua expressão, sendo o referido inibidor constituído por um anticorpo ou por um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o referido desinfectante incorpora suplementarmente um desinfectante de amónio quaternário

14. Composição antimicrobiana que compreende um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, e pelo menos um antibiótico, sendo o referido inibidor constituído por um anticorpo ou por um seu fragmento de ligação do antigénio, específico contra um polipeptido que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20.

15. Composição antimicrobiana de acordo com a reivindicação 14, em que o referido antibiótico, eventualmente único, é seleccionado entre o conjunto constituído por uma tetraciclina e por uma quinolona.

16. Composição antimicrobiana de acordo com a reivindicação 15, em que a quinolona é o ácido nalidíxico.

17. Composição antimicrobiana que compreende um inibidor de uma bomba de efluxo de multifármacos, conforme definido

numa qualquer das reivindicações 1 ou 2, e pelo menos um desinfectante, sendo o referido inibidor constituído por um anticorpo ou por um seu fragmento de ligação ao antigénio, sendo o referido anticorpo ou o referido fragmento de ligação ao antigénio específicos contra um polipeptido que possui uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20.

18. Composição antimicrobiana de acordo com a reivindicação 17, em que o desinfectante, eventualmente único, incorpora um desinfectante de amónio quaternário.

19. Método de desinfeção que consiste em aplicar sobre uma superfície, que se pretende desinfectar, uma composição antimicrobiana de acordo com uma qualquer das reivindicações 17 ou 18.

20. Método para detectar resistência a multifármacos numa bactéria, o qual compreende os passos seguintes:

(i) fazer contactar a bactéria com um reagente específico para a bomba de efluxo de multifármacos, conforme definida numa qualquer das reivindicações 1 a 14, sendo o reagente seleccionado entre o conjunto constituído por:

(a) um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que possua uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20; e

(b) uma sequência nucleotídica complementar de uma sequência nucleotídica que codifique um polipeptido que possua a sequência identificada por SEQ ID NO: 2;

(ii) detectar qualquer reacção de ligação anticorpo-antigénio ou qualquer reacção de hibridação da sequência nucleotídica; e

(iii) correlacionar os resultados do passo de detecção (ii) com a presença ou com a ausência de resistência a multifármacos na bactéria.

21. Método para detectar a presença de uma bactéria que possua resistência a multifármacos, conferida pela presença de uma bomba de efluxo de multifármacos, conforme definida numa qualquer das reivindicações 1 a 4, o qual compreende os passos seguintes:

(i) fazer contactar uma amostra com um reagente específico para a referida bomba de efluxo de multifármacos, sendo o referido reagente seleccionado entre o conjunto constituído por:

(a) um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, específico contra um polipeptido que tenha uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20; e

(b) uma sequência nucleotídica complementar de uma sequência nucleotídica que codifique um polipeptido que tenha a sequência identificada por SEQ ID NO: 2;

(ii) detectar qualquer reacção de ligação anticorpo-antigénio ou qualquer reacção de hibridação da sequência nucleotídica; e

(iii) correlacionar os resultados do passo de detecção (ii) com a presença ou com a ausência de uma bactéria que tenha resistência a multifármacos.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que a amostra é seleccionada entre sangue, soro, fluidos de aspiração bronquial e saliva.

23. Polipeptido que possui uma sequência seleccionada entre SEQ ID NOs: 11-20 e que apresenta um epítipo.

24. Organismo não humano, diferente de *Burkholderia cepacia*, onde foi introduzida uma bomba de efluxo de multifármacos de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2.

Lisboa, 15/04/2009