

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0620867-3 A2



(22) Data de Depósito: 28/12/2006
(43) Data da Publicação: 29/11/2011
(RPI 2134)

(51) Int.Cl.:
A61K 39/095
C12Q 1/68
A61P 31/04

(54) Título: FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE
CONTÊM A PROTEÍNA NMA0939

(30) Prioridade Unionista: 29/12/2005 CU 2005-0279

(73) Titular(es): Centro de Ingeniería Genética Y Biotecnología
Cubana

(72) Inventor(es): Agustín Lage Castellanos, Daniel Yero Corona,
Darién García Díaz, Gretel Sardiñas García, Rolando Pajón Feyt,
Sonia González Blanco

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT CU2006000019 de
28/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/073705de
05/07/2007

(57) Resumo: FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE
CONTÊM A PROTEÍNA NMA0939. A presente invenção refere-se ao
campo da medicina, particularmente ao desenvolvimento de
formulações farmacêuticas que contêm a proteína NMA0939. As
formulações descritas nesta invenção são capazes de conferir
proteção contra diferentes doenças causadas ou não por agentes
patogênicos. A proteína NMA0939 foi identificada como componente
de vesículas da membrana externa de *Neisseria meningitidis*, e ela foi
obtida através de tecnologia de DNA recombinante, sendo sua
imunogenicidade e atividade protetora avaliadas em modelos animais.
Devido ao alto nível de conservação que o gene codificador de
NMA0939 demonstrou, as composições farmacêuticas que contêm
esta proteína têm um alto valor como indutores de uma resposta
imunológica com reação cruzada. As formulações apresentadas nesta
invenção são aplicáveis ao campo de medicina humana.

PI0620867-3

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "FORMULAÇÕES FARMACÉUTICAS QUE CONTÊM A PROTEÍNA NMA0939".

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo da medicina, particularmente ao desenvolvimento de novas formulações de vacinas com aplicação preventiva ou terapêutica, que permite um aumento na qualidade da resposta imunológica contra antígenos de vacinas de doenças de diferentes origens.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

10 *Neisseria meningitidis*, um diplococo gram-negativo cujo único hospedeiro é o Homem, é o agente causador da meningite meningocócica. Usualmente, esta bactéria é encontrada em portadores assintomáticos entre a população normal, sendo este nicho a fonte mais comum para seu isolamento microbiológico.

15 Mundialmente, as crianças pequenas com menos de dois anos de idade são a população mais suscetível para contrair meningite meningocócica; entretanto, adultos jovens e a população adulta normal também podem ser afetados.

20 A doença meningocócica não tratada tem um curso fatal para a maioria dos indivíduos afetados, e a vacinação poderia prevenir esta situação, detendo os episódios precocemente na fase da colonização bacteriana.

25 Várias estratégias foram desenvolvidas com o objetivo de obter uma vacina capaz de atender aos requisitos necessários para induzir proteção contra essa doença na população em geral. Com este propósito, antígenos capsulares foram levados em consideração, pois sua especificidade imunológica permitiu a classificação em sorogrupos deste microorganismo. Cinco destes sorogrupos foram definidos como responsáveis pela maioria dos casos clínicos da doença meningocócica no mundo inteiro. O sorogrupo A é a causa principal de epidemia na África subsaariana. Os sorogrupos B e 30 C estão associados, na maioria dos casos, às ocorrências em nações desenvolvidas. Os sorogrupos Y e W135 são comuns na maioria dos casos recorrentes da doença, e eles são prevalentes em algumas áreas dos Estados

Unidos da América do Norte, com um aumento acentuado nos últimos anos. A partir destes dados, fica óbvia a razão do uso, estudo e avaliação de polissacáideos capsulares como candidatos a vacinas. Uma vacina tetravalente, baseada em polissacáideos capsulares, que confere proteção contra os sorogrupo A, C, Y e W-135, foi aprovada nos Estados Unidos. Os anticorpos eliciados depois da vacinação são específicos dos sorogrupo (Rosenstein, N. et al., "Meningococcal Disease", *N. Engl. J. Med.* 344:1378-1388 (2001)).

O sorogrupo B, que é diferente do resto, continua a ser uma causa significativa da doença meningocócica endêmica e epidêmica, e isto se deve principalmente à falta completa de vacinas eficientes contra ele. Notou-se que o polissacáideo capsular B é deficientemente imunogênico, mas a existência do risco teórico de uma vacina baseada neste composto induzir imunotolerância e auto-imunidade por causa da sua similaridade estrutural com cadeias de oligossacáideos que estão presentes em estruturas fetais neurais humanas ((Finne, J. et al., "An IgG monoclonal antibody to group B glycoproteins in neural and extraneural tissues", *J. Immunol.* 138:4402-4407 (1987)). Portanto, o desenvolvimento de vacinas contra sorogrupo B está concentrado no uso de抗ígenos subcapsulares.

Proteínas de Membrana Externa e Vacinas Vesiculares

As tentativas iniciais, na década de 70, para produzir vacinas baseadas em proteínas de membrana externa se basearam na depleção de LPS de preparações de proteínas da membrana externa por detergente (Frasch, C.E. e Robbins, J.D., "Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model", *J. Exp. Med.* 147(3):629-44 (1978)). As proteínas da membrana externa, OMPs, foram então precipitadas para produzir agregados em suspensão em cloreto de sódio. Apesar dos resultados promissores em estudos animais, estas vacinas deixaram de induzir anticorpo bactericida em adultos ou crianças (Zollinger, W.D. et al., "Safety and immunogenicity of a *Neisseria meningitidis* type 2 protein vaccine in animals and humans", *J. Infect. Dis.* 137(6):728-39 (1978)), o desempenho deficiente destas vacinas foi amplamente atribuído à perda da estrutura terciária que acompanha

nha a precipitação. A próxima etapa lógica foi, portanto, produzir uma vacina com proteínas apresentadas na sua conformação nativa na forma de vesículas de membrana externa (Zollinger, W.D. *et al.*, "Complexo of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man", *J. Clin. Invest.* 63(5):836-48 (1979); Wang, L.Y. e Frasch, C.E., "Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model", *Infect. Immun.* 46(2):408-14136 (1984)).

Estas vacinas vesiculares de membrana externa foram significativamente mais imunogênicas do que os agregados de OMPs e a imunogenicidade demonstrou ser ainda mais intensificada por adsorção ao hidróxido de alumínio adjuvante Wang, L.Y. e Frasch, C.E., "Neisseria meningitidis group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model", *Infect. Immun.* 46(2):408-14136 (1984)).

Inúmeros testes de eficácia foram conduzidos usando vacinas vesiculares de membrana externa solúveis de diferentes formulações. As duas vacinas mais extensivamente estudadas foram desenvolvidas na década de 80 em resposta a surges da doença em Cuba (Sierra, G.V. *et al.*, "Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba", *NIPH Ann. Dis.* 14(2):195-210 (1991)); e na Noruega (Bjune, G. *et al.*, "Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway", *Lancet* 338(8775):1093-6 (1991)). A vacina OMV produzida pelo Instituto Finlay em Cuba (comercializada como VA-MENGOC-BC) é produzida a partir da cepa B:4:P1.19,15 com polissacarídeo do sorogrupo C e a preparação de OMPs com alto peso molecular e é adsorvida ao hidróxido de alumínio (Sierra, G.V. *et al.*, "Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba", *NIPH Ann. Dis.* 14(2):195-210 (1991)). Esta vacina contribuiu para o rápido declínio da epidemia em Cuba (Rodriguez, A.P. *et al.*, "The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94(4):433-40 (1999)).

A vacina produzida pelo Norwegian National Institute for Public Health (NIPH) foi intencionada similarmente no início para uso durante um

período de doença hiperendêmica causada por outro organismo a partir do clone ET-5 (B:15:P1.7,16). Ela também era uma vacina monovalente produzida a partir de vesículas da membrana externa purificadas adsorvidas sobre hidróxido de alumínio (Bjune, G. *et al.*, "Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway", *Lancet* 338(8775):1093-6 (1991)).

As vacinas vesiculares da membrana externa parecem apresentar eficazmente proteínas da membrana externa em uma conformação suficientemente natural, para permitir a geração de anticorpos bactericidas funcionais, pelo menos em adolescentes e adultos. As respostas geradas pelo anticorpo demonstraram também aumentar a opsonofagocitose de meningococos. A formulação precisa das vacinas (isto é, o teor de OMP, o teor de LPS e a presença ou ausência de adjuvante) tem um impacto significativo sobre a imunogenicidade (Lehmann, A.K. *et al.*, "Immunization against serogroup B meningococci. Opsonin response in vaccinees as measured by chemiluminescence", *APMIS* 99(8):769-72 (1991); Gomez, J.A. *et al.*, "Effect of adjuvants in the isotypes and bactericidal activity of antibodies against the transferrin-binding proteins of *Neisseria meningitidis*", *Vaccine* 16(17):1633-9 (1998); Steeghs *et al.*, "Immunogenicity of Outer Membrane Proteins in a Lipopolysaccharide-Deficient Mutant of *Neisseria meningitidis*: Influence of Adjuvants on the Immune Response", *Infect. Immun.* 67(10):4988-93 (1999)).

O perfil antigênico isolados de doença também muda rapidamente e uma vacina com cobertura de apenas um número limitado de cepas selecionadas possivelmente se torna ineficaz dentro de poucos anos, a menos que a composição da vacina seja alterada para espelhar a epidemiologia local.

Atualmente, as vacinas OMV foram usadas mais amplamente do que qualquer outra vacina de sorogrupo B e são potencialmente úteis no contexto de surgimentos da doença causados por um único tipo de PorA.

Os imunógenos que geram reatividade cruzada entre cepas devem ser ainda definidos. Estudos de soros pós-vacinação de testes de vacinas do Instituto Finlay e do NIPH sugerem que os anticorpos contra PorA (P1, a proteína sorossubtipo classe 1) e OpcA (outra OMP importante, conhecida anteriormente como Opc) (Wedge, E. *et al.*, "Immune Responses

against Major Outer Membrane Antigens of *Neisseria meningitidis* in Vaccines and Controls Who Contracted Meningococcal Disease during the Norwegian Serogroup B Protection Trial", *Infect. Immun.* 66(7):3223-31 (1998)), foram ambos importantes na mediação da atividade bactericida sérica (sendo PorA mais imunogênico), e estes dois抗ígenos apresentam variabilidade acentuada de cepa para cepa.

A proeminência da proteína PorA, e o nível significativo de variabilidade nesta proteína que parece sofrer variação contínua entre e durante surgimentos em epítocos para os quais a maior parte da atividade bactericida na pós-vacinação (e pós-doença) está direcionada aumentou as preocupações que a proteção oferecida por vacinas baseadas em OMV de cepa única (monovalentes) poderia ser restrita ao sorosubtipo (Jelfs, J. et al., "Sequence Variation in the PorA Gene of a Clone of *Neisseria meningitidis* during Epidemic Spread", *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7(3):390-5 (2000)).

Em uma tentativa de superar este problema potencial, uma vacina OMV foi desenvolvida na Holanda em RIVM, que continha proteínas PorA de seis isolados patogênicos prevalentes diferentes (Van Der Ley, P. e Polman, J.T., "Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain based on the class 1 outer membrane protein", *Infect. Immun.* 60(8):3156-61 (1992); Claassen, I. et al., "Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine", *Vaccine* 14(10):1001-8 (1996)). Neste caso, as vesículas de vacina forma extraídas de duas variantes da cepa H44/76 bem caracterizada que tinha sido geneticamente manipulada para expressar três proteínas PorA separadas.

Pesquisa de um Antígeno Universal

É evidente que as proteínas de membrana externa (OMP) podem induzir uma resposta imunológica funcional contra doença do sorogrupo B, mas que nenhuma das vacinas desenvolvidas até agora é universalmente protetora devido à grande heterogeneidade das regiões expostas da superfície das proteínas de membrana externa. A modesta imunidade com reação cruzada induzida pelas vacinas de vesículas da membrana externa (OMV)

abasteceu as pesquisas por um antígeno (ou grupo de antígenos) de membrana externa, que induz anticorpos funcionais e que está presente em todas cepas meningocócicas. Tais antígenos, caso eles estivessem presentes em todas cepas independentemente do sorogrupo, poderiam formar a base de um vacina meningocócica verdadeiramente universal, que eliminaria o problema potencial de permutação capsular em cepas patogênicas após a vacinação com polissacarídeos.

Depois que ficou evidente que a variabilidade da proteína PorA imunodominante limitaria seu uso como uma vacina universal, inúmeras outras proteínas de membrana externa importantes foram consideradas quanto ao seu potencial de vacina e várias delas estão em desenvolvimento adicional. Aquelas que foram consideradas incluem as proteínas classe 5 (OpcA), NspA e proteínas reguladas por ferro (TbpA e B, FbpA, FetA). TbpB faz parte do complexo ligante de transferrina com TbpA. Um trabalho recente sugere que TbpA tem um maior papel funcional na ligação do ferro (Pintor, M. et al., "Analysis of TbpA and TbpB functionality in defective mutants of *Neisseria meningitidis*", *J. Med. Microbiol.* 47(9):757-60 (1998)), e é um imunógeno mais eficaz do que TbpB.

Uma proteína de membrana externa pequena altamente conservada foi descoberta por intermédio de uma técnica inovadora, usando combinações de preparações de proteínas de membrana externa de diferentes cepas meningocócicas para imunizar camundongos (Martin, D. et al., "Highly Conserved *Neisseria meningitidis* Surface Protein Confers Protection against Experimental Infection", *J. Exp. Med.* 185(7):1173-83 (1997)). As células B dos camundongos foram usadas para produzir hibridomas que foram triados quanto à reatividade cruzada contra múltiplas cepas de meningococos. Um anticorpo monoclonal altamente reativo de forma cruzada demonstrou se ligar a uma proteína de membrana externa de 22 kDa que foi designada NspA. A imunização com a proteína NspA recombinante demonstrou induzir uma resposta bactericida com reação cruzada em camundongos contra cepas dos sorogrupos A-C. A vacinação também protege os camundongos contra infecção meningocócica letal (Martin, D. et al., "Highly Conserved

"Neisseria meningitidis Surface Protein Confers Protection against Experimental Infection", *J. Exp. Med.* 185(7):1173-83 (1997)). Uma comparação de seqüência sde NspA entre cepas meningocócicas geneticamente divergentes demonstra que a proteína é altamente conservada (97% de homologia) (Cadieux, N. *et al.*, "Bactericidal and Cross-Protective Activities of a Monoclonal Antibody Directed against *Neisseria meningitidis* NspA Outer Membrane Protein", *Infect. Immun.* 67(9):4955-9 (1999)).

A presença de NspA foi detectada por ELISA em 99,2% das cepas testadas dos sorogrupos A-C, usando anticorpos monoclonais anti-NspA (Martin, D. *et al.*, "Highly Conserved *Neisseria meningitidis* Surface Protein Confers Protection against Experimental Infection", *J. Exp. Med.* 185(7): 1173-83 (1997)). Estes anticorpos monoclonais demonstraram ser bactericidas contra inúmeras cepas de meningococos e são capazes de reduzir a bactériemia meningocócica em um modelo de camundongos (Cadieux, N. *et al.*, "Bactericidal and Cross-Protective Activities of a Monoclonal Antibody Directed against *Neisseria meningitidis* NspA Outer Membrane Protein", *Infect. Immun.* 67(9):4955-9 (1999)). Embora estes dados pareçam sugerir que NspA é um candidato promissor a vacina, que é capaz de proteger em todos limites de sorogrupos, o soro anti-NspA recombinante policlonal dos camundongos não se liga à superfície de cerca de 35% das cepas meningocócicas patogênicas do sorogrupo B, apesar da presença do gene *nspA* nesses organismos (Moe, G.R. *et al.*, "Differences in surface Expression of NspA among *Neisseria meningitidis* Group B Strains", *Infect. Immun.* 67(11):5664-75 (1999)).

A Seqüência do Genoma de *N. meningitidis* e seu Impacto no Desenho de Vacinas

As seqüências do genoma de MC58 (um meningococo do sorogrupo B) (Tettelin, H. *et al.*, "Complete Genome Sequence of *Neisseria meningitidis* Serogroup B Strain MC58", *Science* 287(5459):1809-15172 (2000)) e de Z2491 (uma cepa do sorogrupo A) (Parkhill, J. *et al.*, "Complete DNA Sequence of a Serogroup A Strain of *Neisseria meningitidis* Z2491", *Nature* 404(6777):502-6173 (2000)) foram elucidadas e publicadas durante 2000. A disponibilidade das seqüências gênicas assinaladas deve ter uma influência

dramática sobre a pesquisa de vacinas meningocócicas. Embora o seqüenciamento de MC58 estivesse em progresso, Pizza *et al.* começaram identificando as estruturas de leitura aberta previstas (ORF) de codificar proteínas ligadas à membrana, expostas na superfície ou exportadas. Eles identificaram 570 dessas ORFs, ampliaram-nas por intermédio de reação de polimerase em cadeia e as clonaram em *Escherichia coli*, para permitir a expressão das proteínas codificadas como proteínas de fusão marcadas com His ou de glutationa S-transferase (Pizza, M. *et al.*, "Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing", *Science* 287(5459):1816-20 (2000)). Os 61% (350) das ORFs selecionadas foram expressados exitosamente, aquelas que deixaram de expressar foram freqüentemente aquelas que contêm mais do que um domínio transmembrana hidrofóbico (possivelmente excluindo inúmeras proteínas ligadas à membrana externa). As proteínas recombinantes foram purificadas e usadas para vacinar camundongos. Os soros imunes foram então avaliados quanto à ligação da superfície às múltiplas cepas meningocócicas pelo ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) e citometria de fluxo e quanto à atividade bactericida contra duas cepas, usando o ensaio bactericida do soro. Finalmente, sete proteínas foram selecionadas para estudo adicional na base de uma resposta positiva em todos os três ensaios. Formulações de vacinas para teste, usando inúmeras dessas proteínas em combinação com adjuvantes demonstraram induzir títulos bactericidas significativos contra a cepa meningocócica homóloga (MC58) em camundongos, mas nenhuma das proteínas induziu títulos de SBA tão altos quanto uma vacina vesicular de membrana externa de MC58 (Giuliani, M.M. *et al.*, 2000 "Proceedings 12th INPC", página 22). Por outro lado, há alguma evidência que combinações dessas proteínas podem apresentar imunogenicidade mais alta em camundongos do que as proteínas individuais (Santini, L. *et al.*, 2000 "Proceedings 12th INPC", página 22). As inúmeras estruturas de leitura aberta que foram excluídas durante este trabalho, talvez por falha de expressão de proteína ou modificação das suas propriedades imunológicas, também podem ser potencialmente vacinas e requerem investigação adicional.

Os componentes das vacinas podem ser selecionados mais eficazmente depois de conseguir uma compreensão da contribuição de抗ígenos individuais para a patogênese de *N. meningitidis*. Os抗ígenos em si podem produzir candidatos eficazes a vacinas ou, alternativamente, os mutantes atenuados poderiam ser considerados como constituintes de vacinas. Um problema importante da prevenção e/ou terapia da doença meningocócica é que nenhuma vacina disponível até agora confere uma proteção universal devido à heterogeneidade dos抗ígenos usados como vacinas até agora.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Esta invenção contribui para solucionar o problema mencionado anteriormente, fornecendo formulações farmacêuticas que contêm uma proteína cuja seqüência é altamente conservada, mesmo em diferentes gêneros bacterianos patogênicos. O objetivo técnico que esta invenção persegue é o desenvolvimento de formulações com a capacidade de aumentar a resposta imunológica sistêmica e da mucosa do hospedeiro contra diferentes novos patógenos ou um espectro mais amplo dos existentes. No objeto do trabalho da presente invenção relata-se pela primeira vez o uso da proteína NMA0939 como um componente de uma formulação de vacina com caráter terapêutico ou preventivo contra a doença meningocócica ou qualquer infecção causada por um membro do gênero *Neisseria*. O caráter inovador desta invenção consiste no uso, não relatado anteriormente, da proteína NMA0939 em formulações com novas propriedades, capazes de induzir uma resposta imunológica sistêmica e da mucosa de proteção com amplo espectro, devido ao caráter conservado desta proteína em diferentes isolados de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Em outra modalidade desta invenção, as composições farmacêuticas poderiam conter um ou vários抗ígenos de origem sintética, recombinante ou natural. Em outra modalidade desta invenção, composições farmacêuticas combinadas poderiam conter抗ígenos polissacarídeos, incluindo polissacarídeos bacterianos, e mais especificamente, polissacarídeos de *N. meningitidis*. As formulações da presente invenção podem conter proteína/polissacarídeos conjugados, sendo o polissacarídeo de origem bacteriana.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, as formulações farmacêuticas que contêm NMA0939 contêm também抗ígenos de natureza peptídica, com o propósito de expandir o espectro de proteção induzido por vacinas derivadas das ditas composições.

As formulações farmacêuticas aqui descritas são administradas por via parenteral ou pela mucosa, incluindo a via oral.

Em outra modalidade preferida da presente invenção, a proteína NMA0939 pode ser empregada como adjuvante, ou veículo de peptídeos, polissacarídeos, ou qualquer抗ígeno com imunogenicidade menor, objetivando reforçar a imunogenicidade dos ditos elementos. O Exemplo 11 demonstra que a proteína NMA0939 é capaz de intensificar os níveis de anticorpos contra um peptídeo de origem viral quando o dito peptídeo está conjugado a NMA0939. Está incluído também dentro do âmbito da presente invenção cobrir o uso de determinantes protetores para um抗ígeno protéico, desde que eles estejam inseridos na seqüência de aminoácidos de NMA0939, objetivando induzir uma resposta imunológica intensificada contra tais determinantes, sendo assim parte de novas proteínas híbridas presentes em uma composição farmacêutica.

Em outra modalidade preferida da presente invenção, as composições farmacêuticas incluídas na presente invenção poderiam conter fragmentos da proteína NMA0939, capazes de induzir uma resposta protetora contra o meningococo ou qualquer outra bactéria do gênero *Neisseria*. Em uma modalidade específica da presente invenção, as composições farmacêuticas contêm peptídeos mimótopos de NMA0939 ou miméticos de NMA0939 gerados por síntese ou tecnologia de DNA recombinante. O termo "mimótopo" descreve neste relatório descritivo qualquer peptídeo que é capaz de produzir anticorpos, e que estão combinados com a proteína NMA0939, e ao mesmo tempo, sendo capazes de induzir uma resposta imunológica protetora contra *Neisseria*.

Faz também parte da presente invenção a detecção de doença meningocócica através do uso de componentes farmacêuticos que contêm NMA0939, ou o gene codificador de NMA0939, junto com ou em combina-

ção com outros componentes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 representa o vetor de clonagem pM238 empregado na clonagem e expressão da proteína NMA0939.

A figura 2 representa a construção final da seqüência de nucleotídeos do gene *NMA0939* no vetor pM238.

A figura 3 ilustra a análise SDS-PAGE de frações obtidas a partir do rompimento celular: fileira 1, células integrais; fileira 2, pélete celular após rompimento; fileira 3, sobrenadante após rompimento; PM: Marcadores de Peso Molecular.

A figura 4 ilustra a análise SDS-PAGE das diferentes frações da processo de solubilização do processo de purificação da proteína NMA0939 recombinante partindo do pélete rompido: fileira 1, pélete depois da solubilização com uréia 2 M em tampão de carbonato/bicarbonato; fileira 2, sobrenadante da solubilização; fileira 3, fração não-ligada que sai da matriz de purificação; fileira 4, contaminante de baixo peso molecular liberado a partir da matriz em um pico de eluição diferente; fileira 5, proteína purificada; PM: Marcador de Peso Molecular.

A figura 5 ilustra os níveis de anticorpo (IgG) contra a proteína NMA0939 recombinante, obtidos depois da imunização de camundongos com o mesmo antígeno adjuvado com adjuvante de Freund (Freud), hidróxido de alumínio (Alum) ou polissacarídeo de *N. meningitidis* por via intraperitoneal. Os resultados da ELISA estão representados como o inverso da diluição mais alta que duplica o valor dos soros pré-imunes.

A figura 6 representa o reconhecimento de determinantes抗génicos presentes em *N. meningitidis*, cepa CU385, OMVs usando soros murinos obtidos depois da imunização dos camundongos com o mesmo antígeno adjuvado com adjuvante de Freund (Freud), hidróxido de alumínio (Alum) ou polissacarídeo de *N. meningitidis* por via intraperitoneal. Os resultados da ELISA estão representados como o inverso da diluição mais alta que duplica o valor dos soros pré-imunes.

A figura 7 representa os resultados de buscas de homologia entre

a proteína NMA0939 ("consulta") e seqüências anotadas em genomas de diferentes sorogrupos de *N. meningitidis* ("Sbjct"), usando o programa BLAST.

A figura 8 representa o reconhecimento da proteína NMA0939 em cinco cepas diferentes de *N. meningitidis*, por soros eliciados contra o antígeno recombinante adjuvado com polissacarídeo C de *N. meningitidis* por via intraperitoneal. Os soros eliciados com outros adjuvantes tiveram um perfil similar. Os resultados estão expressos como o inverso da diluição mais alta que duplica o valor dos soros pré-imunes.

A figura 9 ilustra experimentos de proteção passiva contra infecção meningocócica no modelo do rato lactente, usando soros eliciados contra o antígeno recombinante adjuvado com adjuvante de Freund (Freud), hidróxido de alumínio (Alum) ou polissacarídeo C de *N. meningitidis* (PsC). "A": infecção com a cepa CU385; e "B": infecção com a cepa 233 (C:2a:P1.5); "C-": coleção de animais não-tratados; "C+": soros de camundongos hiperimunes contra vesículas de membrana externa de cepas Esther CU385 ou 233, dependendo do experimento. O símbolo "*" representa uma diferença estatística significante em relação ao controle negativo (C-). Quanto aos níveis de bacteriemia, eles estão expressos como unidades formadoras de colônias por mililitro (cfu/mL).

A figura 10 representa o reconhecimento da proteína NMA0939 e um painel de antígenos não-relacionados por mAbs gerado (mAbs H10/67, 3H3/24 e 7D6/18. P1, proteína Classe 1 da cepa de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.15; P64k, subunidade E3 de piruvato desidrogenase de *Neisseria meningitidis*; T.T, toxóide do tétano; HBsAg, Antígeno superficial de Hepatite B. Estes resultados estão indicados como valores de absorvância (492 nm) em um ensaio do tipo ELISA.

A figura 11 representa o reconhecimento da proteína NMA0939 por soros convalescentes humanos de sobreviventes de doença meningocócica. Foram empregados soros de doadores sadios como controle negativo. Os resultados estão indicados como absorvância (492 nm) em um ensaio do tipo ELISA.

A figura 12 ilustra os títulos anti-peptídeo JY1 a partir dos soros

de animais imunizados com peptídeo livre (JY1), proteína recombinante (NMA0939) ou com o conjugado JY1-NMA0939.

A figura 13 ilustra os níveis de anticorpo (IgA) contra a proteína NMA0939 recombinante em amostras de lavagem pulmonar de camundongos imunizados por via intranasal com um polissacarídeo C de *N. meningitidis* e NMA0939 recombinante (NMA0939+PsC) ou com a proteína incorporado dentro de lipossomas (NMA0939_Lip).

Exemplos para Realização

Exemplo 1: Detecção da proteína NMA0939 em preparações de vesículas da membrana externa de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B

Com o objetivo de estudar proteínas que estão presentes em vesículas da membrana externa de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B (cepa B:4:P1.19,15), foi conduzida uma eletroforese bidimensional de acordo com um método descrito alhures (Görg, A. et al., *Electrophoresis* 6:599-604 (1985). Subseqüentemente, foi feita uma digestão enzimática em proteínas extraídas com gel usando tripsina (Promega, Madison, WI, EUA). Os peptídeos gerados depois da digestão foram extraídos em solução, usando microcolunas (ZipTips, Millipore, MA, EUA). Para a análise por espectrometria de massas, os peptídeos foram eluídos de microcolunas com acetonitrila a 60%, ácido fórmico a 1%, e em seguida, uma aplicação imediata dentro de "Nanotips" (Protana, Dinamarca).

As medições foram conduzidas em um espectrômetro de massas híbrido com quadripolo e temo de vôo (QToF-2[®], Manchester, Reino Unido), equipado com uma fonte de ionização (nanoESI). Os dados da espectrometria de massas foram obtidos em uma faixa w/z de 400-2.000 em 0,98 segundo e usando 0,02 segundo entre varreduras. A obtenção de dados e o processamento dos dados foram conduzidos usando o programa MassLynx (versão 3.5, Micromass).

A identificação das proteínas, naseada em dados de espectros de massas, foi conduzida usando o programa ProFound (Zhang, W. e Chait, B.T., "ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information", *Anal. Chem.* 72:2482-2489 (2000);

HTTP://prowl.rocketfeller.edu/cgi-bin/ProFound). A busca foi subscrita para os genes e seqüências de proteínas derivadas contidas na base de dados SwissProt (HTTP://www.ebi.ac.uk/swissprot/) e NCBI (HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/), considerando a oxidação de metioninas, desamidação e carboxiamidometilação de cisteínas como modificações possíveis a serem encontradas.

A identificação de proteínas, baseada nos espectros de massas, foi conduzida com o programa MASCOT (Perkins, D.N. *et al.*, "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data", *Electrophoresis* 20:3551-3567 (1999); http://www.matrixscience.com/). Os parâmetros da busca incluíram modificações de cisteínas, bem como oxidações e desamidações.

Partindo da análise dos resultados obtidos a partir da identificação de proteínas presentes em reparações de vesículas da membrana externa, um grupo de peptídeos foi selecionado para seqüenciamento adicional.

A partir dos dados de seqüências obtidos a partir de um peptídeo, a presença de um homólogo da proteína NMA0939 no sorogrupo B foi confirmada, não estando prevista ou identificada nos genomas publicados anteriores. Este homólogo da proteína do sorogrupo B à NMA0939 é denominado NMA0939 neste relatório descritivo inteiro.

Exemplo 2: Análise baseada em homologia da proteína NMA0939 com produtos gênicos relatados em bases de dados

Para a identificação da proteína NMA0939, uma busca de homologia de seqüência foi feita na base de dados do NCBI, empregando o programa BLAST (Altschul, S.F. *et al.*, "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Este procedimento permitiu identificar o homólogo de *N. gonorrhoeae* e o gene de *N. meningitidis* do sorogrupo A, não sendo este caso o mesmo para a cepa do sorogrupo B MC58. Entretanto, a busca realizada usando a seqüência codificadora do DNA de NMA0939, gene nma0939, rendeu a identificação da presença desse gene no genoma relatado de MC58, indicando assim um erro na anotação deste genoma. O gene do sorogrupo B detectado também é homólogo ao homólogo nma0939 de *N. gonorrhoeae* (NGO0306). No so-

rogrupo B, o gene relatado detectado neste trabalho fica localizado um uma região do DNA entre as posições 761673 e 762295, a jusante do gene *nmb0729* e a montante do gene *nmb0730*. Assim sendo, este é até agora o primeiro relato da existência de um homólogo da proteína NMA0939 em meningococos do sorogrupo B. Em microorganismos diferentes, as proteínas homólogas não foram detectadas com sucesso, indicando assim que NMA0939 é um antígeno específico de *Neisseria*.

Exemplo 3: Clonagem e expressão do gene *nma0939*, que codifica a proteína NMA0939 da *N. meningitidis* em *Escharichia coli*

Para clonar e expressar o gene de NMA0939, o vetor de clonagem PM-100 foi empregado. Este vetor permite que a clonagem seja conduzida usando diferentes enzimas de restrição e a geração de altos níveis de expressão de proteínas heterólogas na forma de corpos de inclusão em *E. coli*.

O vetor PM-100 (figura 1) tem os seguintes elementos: promotor de triptofano, segmento gênico que codifica a seqüência estabilizadora de aminoácidos 47 do fragmento Nt de P64 kDa da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.19,15, a seqüência do terminador transcrional do bacteriófago T4, e a seqüência do gene que confere resistência à ampicilina como marcador de seleção. Este vetor de clonagem permite também a seleção recombinante por meio de uma coloração de cor azul/branca de colônias transformadas, devido à presença da subunidade lacZ alfa de beta-galactosidase.

A partir da seqüência de nucleotídeos do gene que codifica NMA0939 (Exemplo 1), um par de iniciadores oligonucleotídeos (704467U e 704467L) foi desenhado para a ampliação do dito segmento gênico, evitando a região que codifica o peptídeo sinalizador, a partir do DNA genômico da cepa CU385 (B:4:P1.19,15).

Xba-I Bgl-II

704467U: 5' GTGGTATCTAGATCTGCCAGCCAGAAACTC 3'

(SEQ ID NO: 1)

704467L: 5' CAACCCCGGGATCCTCCTGTCCAAATC 3'

BamH-I

(SEQ ID NO: 2)

Para a previsão do peptídeo sinalizador, empregou-se o servidor SignalP world Wide Web (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0>).

Depois da ampliação por PCR do gene que codifica NMA0939 (Saiki, R.K. et al., "S Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science* 239:487-491 (1988)), empregando os iniciadores 7740 e 7741, o produto da PCR foi digerido usando as enzimas de restrição Bgl-II e Bam-HI, e clonado no vetor de clonagem pM238 digerido previamente com o vetor. A construção final está indicada na figura 2, e a proteína NMA0939 é expressada como uma proteína de fusão ao segmento Nt da proteína P64 kDa. O seqüenciamento do gene clonado *nma0939* foi conduzido usando o seqüenciador automático ALFexpress II (Kit Terminador Termo Sequenase® com o Corante Cy® 5, Amersham Biosciences) e os oligonucleotídeos 1573 (SEQ ID NO: 8) e 6795 (SEQ ID NO: 9) que se ligam à seqüência do estabilizador P64 e ao terminador transcripcional T4, respectivamente. O plasmídeo gerado neste caso foi designado PM-NMA0939 para uso posterior.

Para a expressão do gene de NMA0939, a cepa de *E. coli* GC366 foi transformada pelo método químico com o plasmídeo PM-NMA0939 (figura 2). O experimento de expressão foi conduzido em meio mínimo (M9) (Miller, J.H., "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EUA), suplementado com 1% de glicerina, 1% de caseína hidrolisada, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 1 mM e 50 ug/mL de ampicilina. As culturas bacterianas foram incubadas por 12 horas a 37 °C e 250 rpm. As culturas desenvolvidas foram centrifugadas e o rompimento ultra-sônico do pélete celular foi realizado (IKA LABORTECHNIK). As frações do pélete e do sobrenadante foram analisadas por SDS-PAGE (Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* 277:680 (1970) mais coloração com Azul Brilhante de Coomassie R-250. A porcentagem da expressão foi conduzida por densitometria em gel (densitômetro a laser LKB Bromma 2202 Ultrascan; Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido). A proteína NMA0939 foi obtida a partir da fração do pélete, sendo cerca de 20% do teor protéico desta fração (figura 3). As a-

mostras do pélete celular foram solubilizadas em tampão de carbonato/bicarbonato (carbonato de sódio 0,1 M, bicarbonato de sódio 0,1 M), contendo uréia em diferentes concentrações molares (2 M, 4 M, 6 M e 8 M). Quando o tampão anterior com uréia 2 M foi empregado, a proteína NMA0939 foi solubilizada. O sobrenadante depois da solubilização passou por uma cromatografia de afinidade com metal para conseguir a purificação da proteína de interesse. Como resultado, obteve-se uma amostra com uma pureza de 80%, como ilustrado na figura 4. Uma última etapa de diálise foi realizada antes de sua avaliação em cobaias.

Exemplo 4: Avaliação da resposta imunológica induzida depois da imunização com a proteína NMA0939 por via intraperitoneal

Para avaliar a imunogenicidade da proteína NMA0939, foi desenhado e conduzido um experimento de imunização em camundongos, onde a proteína NMA0939 foi administrada adjuvada com Hidróxido de Alumínio, Adjuvante de Freund, ou Polissacarídeo C de *N. meningitidis*.

Com estas preparações, camundongos Balb/C fêmeos (8-10 semanas de idade) foram imunizados, depois de divididos em 4 grupos de 8 camundongos cada um. Três imunizações foram aplicadas por via intraperitoneal, com 7 dias de intervalo entre elas. Um grupo de controle foi empregado, e consequentemente, imunizado com PBS; entretanto, similarmente aos outros grupos no experimento, uma dose de reforço com a proteína adjuvada com hidróxido de alumínio foi dada no dia 45. Na Tabela 1, está descrita a composição dos grupos:

Tabela 1

Grupos de Camundongos Balb/C Empregados no Experimento de Imunização

Grupo	Imunógeno
1	20 µg de NMA0939 + Adjuvante de Freund
2	20 µg de NMA0939 + Hidróxido de Alumínio
3	20 µg de NMA0939 + Polissacarídeo C
4	PBS

Os títulos de anticorpo (IgG) contra a proteína recombinante e a proteína homóloga presentes na bactéria foram determinados por ELISA, em

amostras de soro retiradas depois da dose de reforço. Na figura 5, estão indicados os títulos de anticorpo contra a proteína recombinante de animais individuais. Os níveis específicos do anticorpo foram detectados logo depois da segunda inoculação (dados não ilustrados), embora eles fossem mais altos depois da última inoculação. Além disso, foi feita a imunoidentificação por *Western blotting*, onde a respectiva banda da proteína foi reconhecida (dados não ilustrados). Os grupos imunizados por via intraperitoneal tiveram títulos significativamente mais altos do que aqueles eliciados por via intranasal.

Os soros obtidos depois da imunização com a proteína recombinante reconheceram a proteína natural presente em uma preparação de proteína de membrana externa (OMP) da cepa CU385. Estes resultados estão representados na figura 6.

Para a análise estatística dos resultados, foi realizada uma transformação logarítmica dos títulos de anticorpo, para obter uma distribuição normal da variância e sua homogeneidade. Genericamente, a significância estatística de diferenças registradas entre as médias dos grupos foi realizada através de um ANOVA simples, e em seguida, um teste de múltiplas pontuações de Neuman Keuls.

Exemplo 5: Caracterização da seqüência do gene que codifica a proteína NMA0939 em diferentes cepas de *N. meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*

Para analisar a conservação da seqüência do gene que codifica a proteína NMA0939 na espécie patogênica do gênero *Neisseria*, foi feita uma busca de similaridade com os genomas de *Neisseria meningitidis* (sorogrupos A, B e C) e *Neisseria gonorrhoeae*, anotados na base de dados do NCBI (NC 003116.1, NC003112.1, NC 003221, NC 002946), empregando o programa BLAST (Altschul, S.F. et al., "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A figura 7 ilustra os resultados da comparação de seqüências para as seqüências que produzem um alinhamento significativo em cada um dos genomas analisados. Essas seqüências têm 99% de identidade no sorogrupo B, 100% de

identidade no sorogrupo A e uma identidade de 96% com *escherichia* *gonorrhoeae*, com a seqüência obtida para o gene que codifica a proteína NMA0939 (SEQ ID NO: 3). Além disso, a seqüência do gene referido foi determinada para isolados cubanos (SEQ ID NO: 5-7), que pertencem ao sorogrupo B (B:4:P1.19,15) e um alinhamento de seqüências foi feito usando o programa ClustalX (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Os resultados do alinhamento indicam que há uma grande conservação na seqüência de nucleotídeos do gene NMA0939 entre as cepas analisadas e em geral no gênero *Neisseria*.

O uso da proteína NMA0939 como um candidato a vacina, levando em conta o alto grau de similaridade existente entre as seqüências mencionadas anteriormente, permitiria a geração de uma resposta imunológica eficaz, com uma proteção de amplo espectro (devido à reatividade cruzada) contra a doença meningocócica.

Exemplo 6: Caracterização da resposta imunológica com ação de amplo espectro, induzida pela imunização de camundongos Balb/C com a proteína NMA0939

Para avaliar se a imunização com a proteína NMA0939 induziu uma resposta amplamente reativa de forma cruzada com outras cepas de *Neisseria*, foi feito um ensaio ELISA. As placas de poliestireno foram revestidas com células integrais de 7 cepas de *Neisseria*, que pertencem a diferentes sorotipos e sorossubtipos. As placas foram incubadas com soros colecionados obtidos contra a proteína NMA0939, por duas vias de imunização, como descrito no Exemplo 4.

A figura 8 ilustra o reconhecimento de抗ígenos presentes em cepas dos sorogrupo A, B e C de *N. meningitidis* pelos soros eliciados depois da imunização com a proteína NMA0939 recombinante adjuvada com polissacarídeos C. Como se observa, os soros imunes reconheceram a proteína presente em diferentes cepas, com níveis similares ao encontrado na cepa CU385. Os soros restantes tiveram um comportamento comparável neste ensaio.

Exemplo 7: Proteção induzida pelos soros murinos específicos para a proteína NMA0939 contra cepas homólogas e heterólogas, no modelo

do rato infante.

Para determinar a atividade funcional dos anti-soros obtidos, foi conduzido um ensaio de proteção no modelo do rato infante para infecção meningocócica. Vinte e quatro ratos (5-6 dias de idade) foram divididos em grupos de 6 ratos cada um.

Foi determinado se os soros administrados por via intraperitoneal protegeram os ratos contra a infecção causada por bactérias (cepa CU385), inoculados pela mesma via uma hora depois. Os soros de cada grupo foram coletados e diluídos 1/10 (em PBS estéril) antes de serem inoculados em ratos infantes. Quatro horas depois, os animais foram amostrados e as bactérias viáveis no seu sangue foram contadas.

Para interpretar os resultados, foi feito um teste t de Student de cauda única, comparando cada grupo com o grupo de controle negativo (coleção de animais não-tratados). Como pode ser observado na figura 9A, o grupo que recebeu soros de camundongos imunizados com NMA0939 adjuvada com polissacarídeo C não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em comparação com o grupo de controle negativo, e assim sendo, os títulos de anticorpo foram protetores no modelo do rato infante. A resposta de anticorpo, gerada depois da imunização com a proteína adjuvada com hidróxido de alumínio, também foi protetora neste modelo animal (dados não ilustrados).

Um ensaio similar foi feito infectando os ratos infantes com a cepa 233 (C:2a:P1.5) e os resultados estão indicados na figura 9B, indicando que, como no experimento anterior, os anticorpos eliciados com a proteína-alvo NMA0939 adjuvada com hidróxido de alumínio ou polissacarídeo C foram capazes de proteger os ratos contra infecção meningocócica.

Exemplo 8: Geração de anticorpos monoclonais contra a proteína NMA0939 capazes de mediar a atividade bactericida contra *Neisseria meningitidis*

Para gerar anticorpos monoclonais (mAbs) específicos contra a proteína NMA0939, e estudar a capacidade funcional de mediar a atividade bactericida contra cepas homólogas e heterólogas de *N. meningitidis*, foi

conduzido um programa de imunização com uma preparação da proteína NMA0939 com 80% de pureza (Exemplo 3). A imunização foi feita em Balb/C (H-2^d, fêmeas, 5-6 semanas de idade) e 4 doses foram aplicadas da seguinte maneira: nos dias 0, 15 e 30 da rotina de imunização, 10 µg antígeno NMA0939 por camundongo (volume total 100 µL) foram administrados por via subcutânea, emulsificados com adjuvante de Freund; no dia 50, 10 µg de antígeno por camundongo em solução salina tamponada com fosfato (NaCl 140 mM, KCl 270 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 6,5 mM, pH 7,2) foram administrados por via intraperitoneal. As extrações de sangue foram feitas nos Dias 0 e 45.

Os esplenócitos do animal com o título mais alto, medido por um ensaio ELISA indireto, usando a proteína NMA0939 como antígeno do revestimento (Exemplo 3), foram fundidos com células do mieloma do camundongo X63 Ag8 653. Os hibridomas resultantes foram isolados e triados de acordo com procedimentos padronizados (Gavilondo, J.V., "Anticuerpos Monoclonales: Teoría y Práctica", *Elfos Scientiae*, La Habana, Cuba).

A reatividade dos anticorpos secretados pelos hibridomas direcionados para a proteína NMA0939, bem como seus抗ígenos não-relacionados com reatividade cruzada, foi testada por um ensaio ELISA indireto, empregando 5 µg/mL de cada antígeno, a mesma concentração de cada mAbs a ser testado. A figura 10 ilustra os resultados obtidos neste experimento, foram obtidos 2 clones positivos no total (mAbs H10/67, 3H3/24 e 7D6/18) que reconheceram especificamente a proteína NMA0939, e não reagiram com a seqüência de aminoácidos correspondente ao terminal N de P64k nem com o restante dos抗ígenos não-relacionados testados.

Para determinar a capacidade de os mAbs gerados contra a proteína NMA0939 mediarem uma resposta bactericida contra cepas homólogas e heterólogas de *Neisseria meningitidis*, foi realizado um teste bactericida. O título do anticorpo bactericida foi expresso como a recíproca da diluição mais alta dos anticorpos testados, que foi capaz de exterminar 50% ou mais bactérias; dois dos Ambs (3H3/24 e 7D6/18) atingiram títulos bactericidas mais altos do que 1:128 contra a cepa homóloga B:4:P1.19,15 e um

(H10/67) atingiu um título mais alto do que 1:80. Eles apresentaram também títulos mais altos do que 1:64 contra as cepas heterólogas B:15:P1.7,16 e C:2a:P1.5, respectivamente.

Exemplo 9: Caracterização das regiões-alvo da resposta imunológica murina contra a proteína NMA0939

Para identificar as regiões na proteína, que são mais freqüentemente reconhecidas pelos anti-soros murinos gerados contra o antígeno recombinante, foi feito um ensaio SPOTScan. Um conjunto de peptídeos sobrepostos que cobrem a seqüência da proteína foi sintetizado sobre uma membrana de celulose, que foi incubada com soros colecionados diluídos 1:100. A reação antígeno/anticorpo foi detectada pela incubação com um conjugado imunoglobulina G antimurina/fosfatase alcalina, e em seguida, a adição de uma solução que continha o substrato bromo-cloro-indolil-fosfato. Várias regiões antigênicas comuns com a proteína foram observadas, independentemente da preparação empregada para a imunização. Entretanto, nos grupos imunizados com a proteína adjuvada com adjuvante de Freund, houve um padrão muito mais amplo de reconhecimento.

Exemplo 10: Reconhecimento da proteína NMA0939 por soros humanos

Uma coleção de soros humanos, advindos de indivíduos convalescentes, foi empregada neste estudo, que foi realizado por ELISA. As placas foram revestidas com a proteína NMA0939 obtida por eletroforese preparatória (5 µg/mL). Depois de bloquear as placas com leite desnatado em pó a 3% em PBS contendo Tween-20, os soros foram diluídos (1:50) na mesma solução e foram incubados nas placas. O imunoensaio prosseguiu como foi amplamente relatado. Soros de doadores sadios foram empregados como controles negativos. Além disso, os soros colecionados de indivíduos vacinados com uma vacina recombinante contra hepatite B foram usados como um controle não-relacionado (dados não ilustrados).

A figura 11 ilustra os resultados obtidos com 5 soros dos convalescentes neste ensaio. Pode-se observar que os soros humanos reconheceram a proteína, o que indica que ela é expressada durante a infecção me-

ningocócica e ela é imunogênica.

Exemplo 11: Proteína NMA0939 como um veículo para um peptídeo

Para demonstrar a capacidade veículo da proteína NMA0939 recombinante, ela foi conjugada a um peptídeo sintético de 15 meros, derivado da região V3 da proteína gp120 de HIV-1, o isolado JY1. A conjugação foi feita pelo método de glutaraldeído. O peptídeo JY1, a proteína NMA0939 recombinante e o conjugado JY1/NMA0939, foram administrados a camundongos adultos em um programa de 3 doses, onde os imunógenos foram emulsificados com adjuvante de Freund. Duas semanas depois da terceira dose, foram obtidas amostras de soro dos animais imunizados, e as amostras foram analisadas por ELISA para determinar os títulos de anticorpo anti-peptídeo. Para fazer isto, as placas foram revestidas com peptídeo livre (20 µg/mL) e o imunoensaio continuou como descrito anteriormente. Os resultados do experimento (figura 12) ilustram a capacidade carreadora da proteína NMA0939, capaz de potencializar significativamente a resposta do anticorpo contra o peptídeo JY1, depois da sua conjugação.

Exemplo 12: Avaliação da resposta imunológica induzida depois da imunização com a proteína NMA0939 por via de mucosa

Para avaliar a imunogenicidade da proteína NMA0939, foi desenhado e conduzido um experimento de imunização em camundongos, onde a proteína NMA0939 foi administrada encapsulada dentro de liposomas ou adjuvadas com polissacarídeo C de *N. meningitidis*. Os lipossomas foram obtidos por desidratação/reidratação como descrito anteriormente (Carmenate, T. et al., "Recombinant Opc protein from *Neisseria meningitidis* reconstituted into liposomes elicits antibodies following immunization", *Biotechnol. Appl. Biochem.* 34:63-69 (2001)). Com estas duas preparações, camundongos Balb/C fêmeos (8-10 semanas de idade) foram imunizados. Três doses de 50 µg foram aplicadas por via intranasal, com 15 dias de intervalo entre elas. Para analisar a resposta imunológica no nível da mucosa, os níveis do anticorpo IgA foram medidos em lavagens pulmonares dos animais imunizados. Na figura 13 estão indicados os níveis do anticorpo IgA detectados para os dois grupos avaliados.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Center for Genetic Engineering and Biotechnology
<120> FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM A PROTEÍNA NMA0939
<130> FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM A PROTEÍNA NMA0939

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial: Oligo
704467U

<400> 1

gtggtatcta gatctgccag ccagaaactc

30

<210> 2

<211> 28

<212> ADN

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial: Oligo
704467L

<400> 2

caaccggga tccttccttg tccaaatc

28

<210> 3

<211> 348

<212> ADN

<213> Neisseria meningitidis (grupo B)

<400> 3

atgcgcggca gaaaactcaaa agcatggtgg aacactacta tgacaaaacaa cgttgatttg 60
aagggtcccg caaaacgcta tttcacgctg gacgagttgt gcggactgtt gcaaattcagc 120
ccctatggtt ttgcgcatacg gcagcatgat tatggtgtgg ttgtcggtta cggcggcgaa 180
cgctacaccc gtttggatgt ggtgaaactg ttgaaattgc agagcacgtt tgcaccgtat 240
gcagaaggcg cggagtcggg ttcggacggc aaccgtccgg ttacgcttca ggaaatcgga 300

gacggctctga aagagctgtt ggcggatttg gataaggaat tgtgctga 348

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

<400> 4

Met Pro Ala Arg Asn Ser Lys Ala Trp Trp Asn Thr Thr Met Thr Asn

1 5 10 15

Asn Val Asp Leu Lys Val Pro Ala Lys Arg Tyr Phe Thr Leu Asp Glu

20 25 30

Leu Cys Gly Leu Leu Gln Ile Ser Pro Tyr Gly Phe Ala Gln Trp Gln

35 40 45

His Asp Tyr Gly Val Val Val Gly Tyr Gly Gly Glu Arg Tyr Thr Arg

50 55 60

Leu Asp Val Val Lys Leu Leu Lys Leu Gln Ser Thr Phe Ala Pro Tyr

65 70 75 80

Ala Glu Gly Ala Glu Ser Gly Ser Asp Gly Asn Arg Pro Val Thr Leu

85 90 95

Gln Glu Ile Gly Asp Gly Leu Lys Glu Leu Leu Ala Asp Leu Asp Lys

100 105 110

Glu Leu Cys

115

<210> 5

<211> 348

<212> ADN

<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

<400> 5

atgccagcca gaaactcaa agcatggtgg aacactacta tgacaaacaa cgttgatttg 60

aagggtcccg caaaacgcta tttcacgctg gacgagttgt gcggactgtt gcaaatcagc 120

ccctatggtt ttgcgcaatg gcagcatgtat tatggtgtgg ttgtcggtta cggcggcgaa 180

cgctacaccc gtttggatgt ggtgaaactg ttgaaattgc agagcacgtt tgcaccgtat 240

gcagaagggtg cggagtcggg ttgcgacggc aaccgtccgg ttacgcttca ggaaatcgga 300

gacggctctga aagagctgtt ggcggatttg gataaggaat tgtgctga 348

<210> 6

<211> 348

<212> ADN

<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

<400> 6

atgccagcca gaaactcaa agcatggtgg aacactacta tgacaaacaa cgttgatttg 60

aagggtcccg caaaacgcta tttcacgctg gacgagttgt gcggactgtt gcaaatcagc 120

ccctatggtt ttgcgcaatg gcagcatgat tatggtgtgg ttgtcggtta cggcggcgaa 180
cgctacaccc gtttggatgt ggtgaaactg ttgaaattgc agagcacgtt tgcaccgtat 240
gcagaaggtg cggagtcggg ttcggacggc aaccgtccgg ttacgcttca gaaaatcgga 300
gacggtctga aagagctgtt ggcggatttg gataaggaat tgtgctga 348

<210> 7

<211> 348

<212> ADN

<213> *Neisseria meningitidis* (grupo B)

<400> 7

atgccagcca gaaactcaaa agcatggtgg aacactacta tgacaaaacaa cgttgatttg 60
aagggttcccg caaaaacgcta tttcacgctg gacgagttgt gcggactgtt gcaaattcagc 120
ccctatggtt ttgcgcaatg gcagcatgat tatggtgtgg ttgtcggtta cggcggcgaa 180
cgctacaccc gtttggatgt ggtgaaactg ttgaaattgc agagcacgtt tgcaccgtat 240
gcagaaggtg cggagtcggg ttcggacggc aaccgtccgg ttacgcttca gaaaatcgga 300
gacggtctga aagagctgtt ggcggatttg gataaggaat tgtgctga 348

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial:Oligo 1573

<400> 8

ttccatggta gataaaagaa tggctttag

29

<210> 9

<211> 27

<212> ADN

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição da Seqüência Artificial:Oligo 6795

<400> 9

aactgcaggc ttgtaaaccg ttttgtg

27

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação farmacêutica, caracterizada por conter a proteína NMA0939 identificada como SEQ ID NO: 4.
2. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, 5 caracterizada por ser uma vacina capaz de gerar no organismo recebedor uma resposta protetora contra infecções causadas por bactérias do gênero *Neisseria*.
3. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser uma vacina capaz de gerar no organismo recebedor 10 uma resposta protetora contra infecções causadas por *Neisseria meningitidis* ou *Neisseria gonorrhoeae*.
4. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por conter ainda um ou vários抗ígenos de natureza diferente, obtidos por meios recombinantes, sintéticos ou naturais.
5. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, 15 caracterizada por conter抗ígenos polissacarídeos, incluindo polissacarídeos bacterianos.
6. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por conter polissacarídeos capsulares de *Neisseria meningitidis*.
7. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, 20 caracterizada por conter conjugados proteína/polissacarídeo nos quais o componente polissacarídeo é um polissacarídeo bacteriano.
8. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por conter抗ígenos peptídicos.
9. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, 25 para ser administrada por via parenteral ou pela mucosa.
10. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo uso da proteína NMA0939 como um adjuvante ou veículo para抗ígenos de natureza diferente.
11. Formulação farmacêutica, caracterizada por conter fragmentos de peptídeos ou peptídeos miméticos do抗ígeno proteína NMA0939.
12. Formulação farmacêutica, caracterizada por conter a proteína

NMA0939 identificada como SEQ ID NO: 4, para ser usada na detecção de doença meningocócica em seres humanos, seja isoladamente ou em combinação com outros componentes.

13. Formulação farmacêutica, caracterizada por conter o gene
- 5 codificador de NMA0939, identificado como SEQ ID NO: 3, para ser usada na detecção de doença meningocócica em seres humanos, seja isoladamente ou em combinação com outros componentes.

Fig. 1

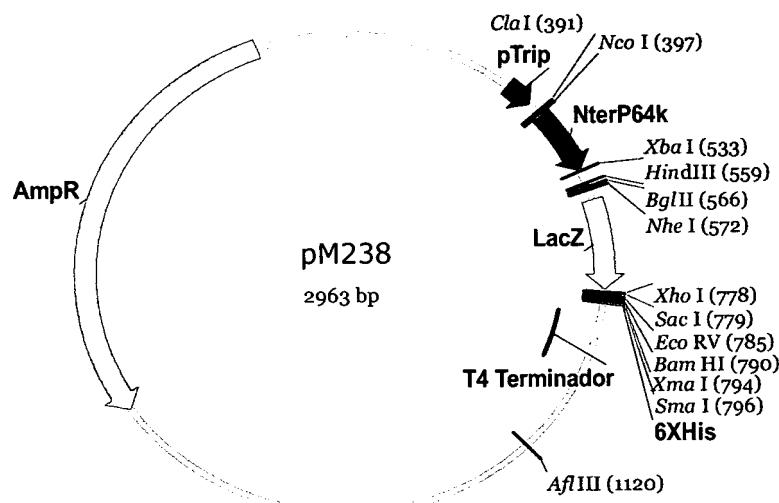


Fig. 2

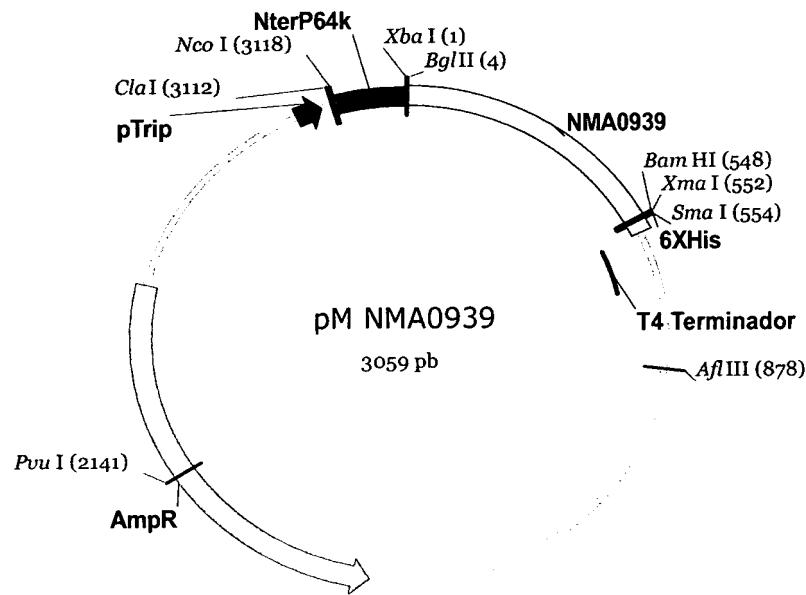


Fig. 3

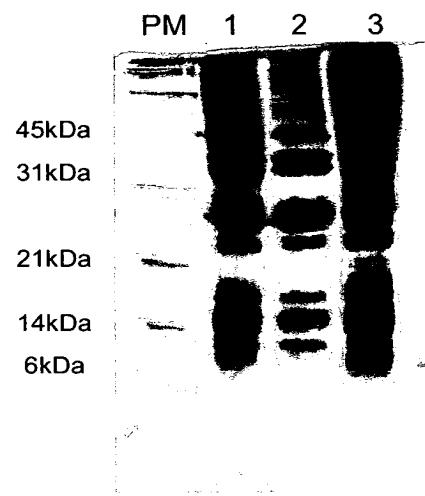


Fig. 4

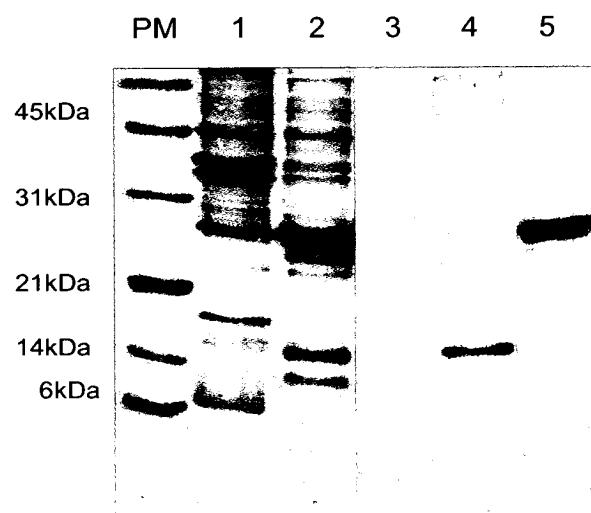


Fig. 5

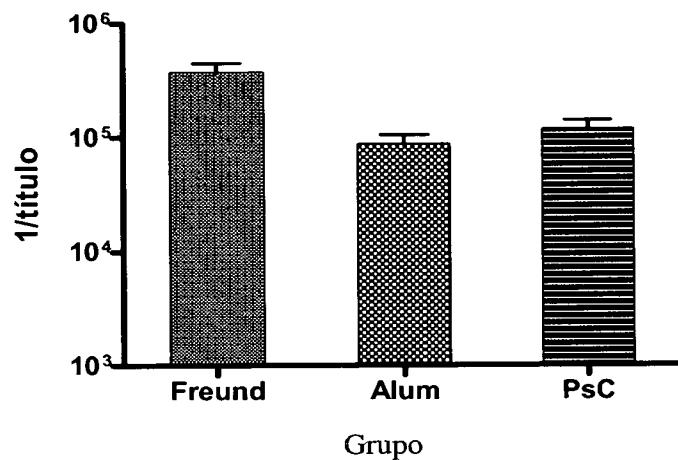


Fig. 6

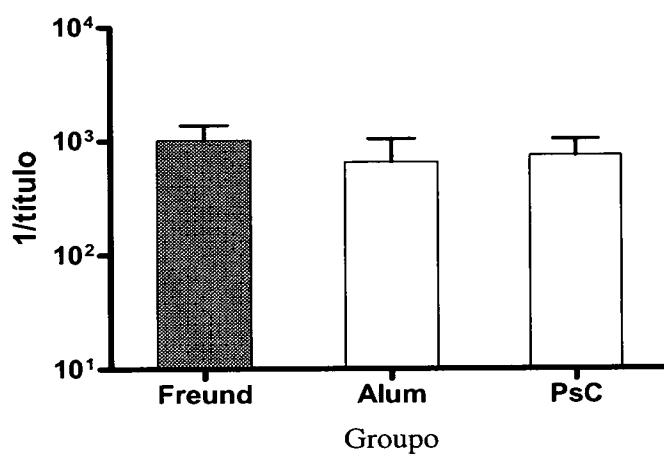


Fig. 7

gi|7379424|emb|AL162754.2|NMA322491  Genoma completo da cepa Z2491 do sorogrupo A de *Neisseria meningitidis*
 Segmento 3/7
 Comprimento=311321

Características nesta parte da sequência em questão:
Proteína hipotética NMA0939

Escore = 577 bits (291), Esperado = 7e-162
Identidades = 291/291 (100%), Lacunas = 0/291 (0%)
Filamentos=Mais/Mais

Query 1	TTGAAGGTCCCCGAAACGCTATTCACGCTGGACGAGTTGTGCGGACTGTTGCAAATC	60
Sbjct 219660	TTGAAGGTCCCCGAAACGCTATTCACGCTGGACGAGTTGTGCGGACTGTTGCAAATC	219719
Query 61	AGCCCTATGGTTTGCATGGCAGCATAATCACGGTGTGGTTACGGCGGC	120
Sbjct 219720	AGCCCTATGGTTTGCATGGCAGCATAATCACGGTGTGGTTACGGCGGC	219779
Query 121	GAACGCTACACCCGTTGGATGTGGTGAACACTGTTGAAATTGCAGAGCACGTTGCACCG	180
Sbjct 219780	GAACGCTACACCCGTTGGATGTGGTGAACACTGTTGAAATTGCAGAGCACGTTGCACCG	219839
Query 181	TATGCAGAAGGTGCGGAATCGGGTCGGACGGCAACCGTCCGGTTACGCTTCAGGAAATC	240
Sbjct 219840	TATGCAGAAGGTGCGGAATCGGGTCGGACGGCAACCGTCCGGTTACGCTTCAGGAAATC	219899
Query 241	GGAGACGCTCTGAAAGACCTGTTGGCGGATTGGATAAGGAATTGTGCTGA	291
Sbjct 219900	GGAGACGCTCTGAAAGACCTGTTGGCGGATTGGATAAGGAATTGTGCTGA	219950

gi|66731897|gb|AE002098.2|  Genoma completo de *Neisseria meningitidis* Mc58
Comprimento=2272360

Características que flanqueiam esta parte da sequência em questão:
2 pb na extremidade 5': fator de integração do hospedeiro, subunidade alfa
330 bp na extremidade 3': Proteína hipotética

Escore = 569 bits (287), Esperado = 2e-159
Identidades = 290/291 (99%), Lacunas = 0/291 (0%)
Filamentos=Mais/Mais

Query 1	TTGAAGGTCCCCGAAACGCTATTCACGCTGGACGAGTTGTGCGGACTGTTGCAAATC	60
Sbjct 761675	TTGAAGGTCCCCGAAACGCTATTCACGCTGGACGAGTTGTGCGGACTGTTGCAAATC	761734
Query 61	AGCCCTATGGTTTGCATGGCAGCATAATCACGGTGTGGTTACGGCGGC	120
Sbjct 761735	AGCCCTATGGTTTGCATGGCAGCATAATCACGGTGTGGTTACGGCGGC	761794
Query 121	GAACGCTACACCCGTTGGATGTGGTGAACACTGTTGAAATTGCAGAGCACGTTGCACCG	180
Sbjct 761795	GAACGCTACACCCGTTGGATGTGGTGAACACTGTTGAAATTGCAGAGCACGTTGCACCG	761854
Query 181	TATGCAGAAGGTGCGGAATCGGGTCGGACGGCAACCGTCCGGTTACGCTTCAGGAAATC	240
Sbjct 761855	TATGCAGAAGGTGCGGAATCGGGTCGGACGGCAACCGTCCGGTTACGCTTCAGGAAATC	761914
Query 241	GGAGACGCTCTGAAAGACCTGTTGGCGGATTGGATAAGGAATTGTGCTGA	291
Sbjct 761915	GGAGACGCTCTGAAAGACCTGTTGGCGGATTGGATAAGGAATTGTGCTGA	761965

gi|59717368|gb|AE004969.1|  Genoma completo de *Neisseria gonorrhoeae* FA 1090

Comprimento=2153922

Características nesta parte da seqüência em questão:
Proteína hipotética conservada

Escore = 492 bits (248), Esperado = 3e-136
Identidades = 275/284 (96%), Lacunas = 0/284 (0%)
Filamentos-Mais/Mais

<u>Query 8</u>	<u>TTCCCGCAAAACGCTATTCACGCTGGACGAGTGTGCGGACTGTTGCAAATCAGCCCC</u>	<u>67</u>
<u>Sbjct 305971</u>	<u>TTCTGCAAAACGCTATTCACGCTGGACGAGTGTGCGGACTGTTGCAAATCAGCCCC</u>	<u>306030</u>
<u>Query 68</u>	<u>ATGGTTTGCGCAATGGCAGCATAATCACGGTGTGGTTGTCGGTTACGGCGGAACGCT</u>	<u>127</u>
<u>Sbjct 306031</u>	<u>ATGGTTTGCGCAATGGCAACATGATCACGGTGTGGTTGTCGGTTACGGCGGAACGCT</u>	<u>306090</u>
<u>Query 128</u>	<u>ACACCCGTTGGATGTGGTGAACACTGTTGAAATTGCAAGAGCACGTTGCACCGTATGCAG</u>	<u>187</u>
<u>Sbjct 306091</u>	<u>ACACCCGTTGGATGTGGTGAACACTGTTGAAACTGAAGAGCACGTTGCACCGTATGCAG</u>	<u>306150</u>
<u>Query 188</u>	<u>AAGGTGCGGAATCGGGTTCGGACGGCAACCGTCCGGTTACGCTTCAGGAAATCGGAGACG</u>	<u>247</u>
<u>Sbjct 306151</u>	<u>AAGGTGCGGAATCGGGTTCGGACGGCAACCGTCCGGTTACGCTTCAGGAAATCGGAGACG</u>	<u>306210</u>
<u>Query 248</u>	<u>CTCTGAAAGACCTGTTGGCGGATTGGATAAGGAATTGTGCTGA</u>	<u>291</u>
<u>Sbjct 306211</u>	<u>GTCTGAAAGACCTGTTGGAGGATTGGATAAGGAATTGTGCTGA</u>	<u>306254</u>

Fig. 8

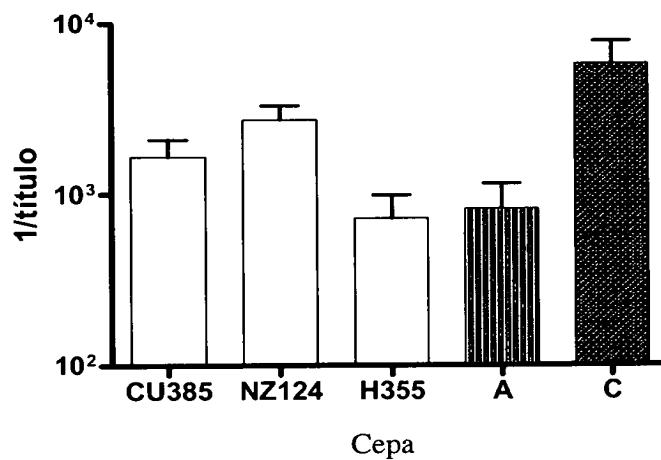


Fig. 9A

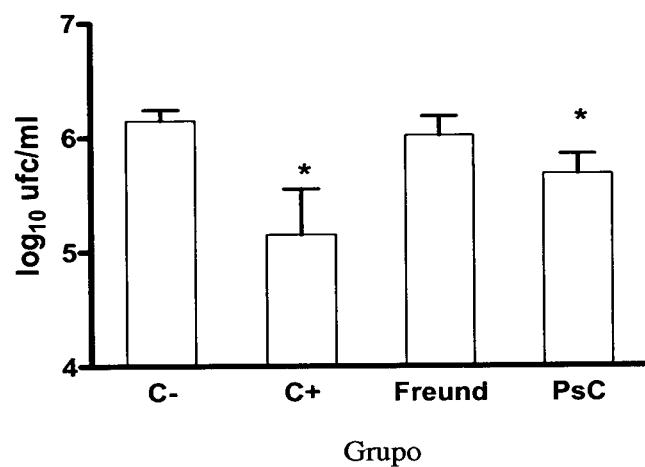


Fig. 9B

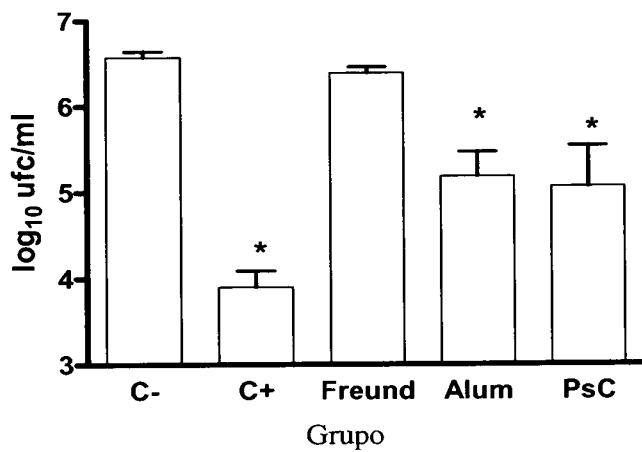


Fig. 10

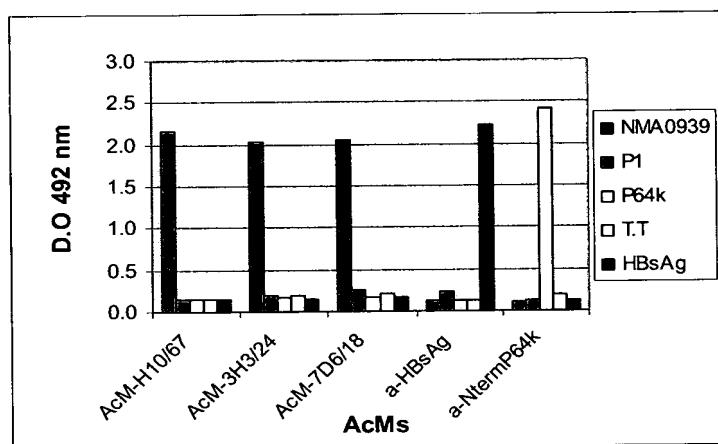


Fig. 11

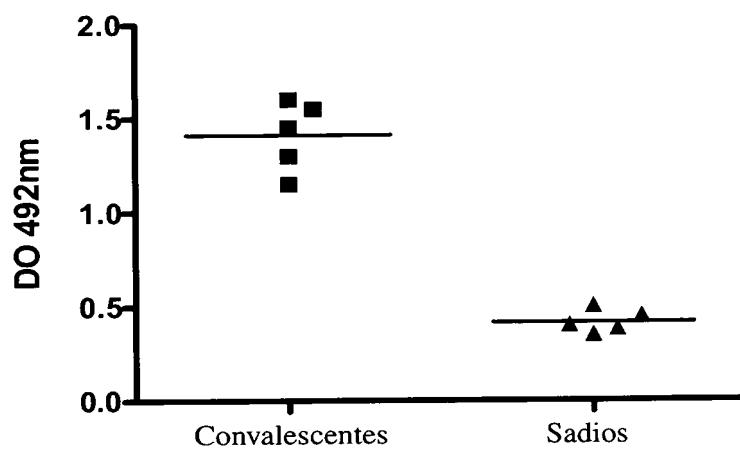


Fig. 12

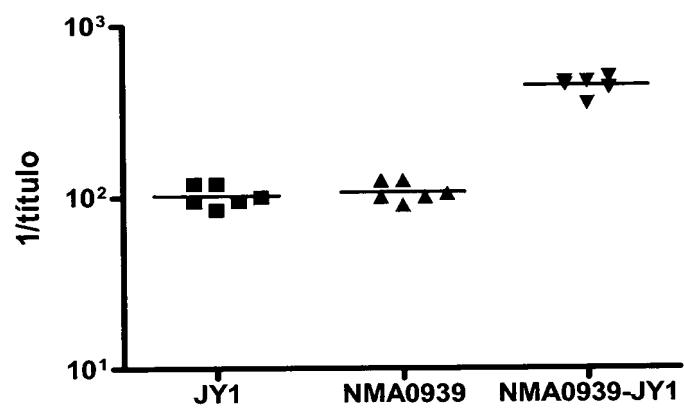
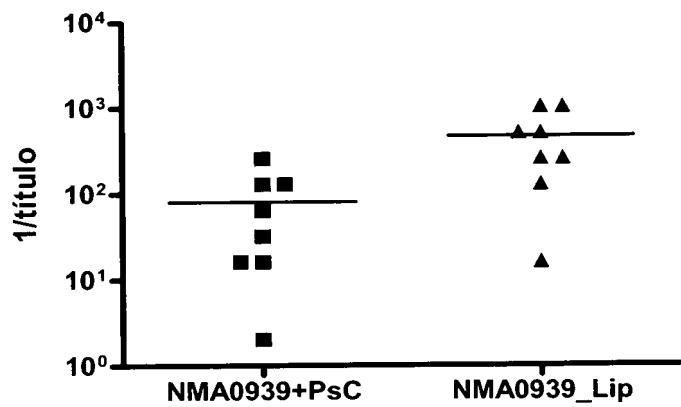


Fig. 13



PI 0620867-3

RESUMO

Patente de Invenção: "FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM A PROTEÍNA NMA0939".

A presente invenção refere-se ao campo da medicina, particularmente ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas que contêm a proteína NMA0939. As formulações descritas nesta invenção são capazes de conferir proteção contra diferentes doenças causadas ou não por agentes patogênicos. A proteína NMA0939 foi identificada como componente de vesículas da membrana externa de *Neisseria meningitidis*, e ela foi obtida através de tecnologia de DNA recombinante, sendo sua imunogenicidade e atividade protetora avaliadas em modelos animais. Devido ao alto nível de conservação que o gene codificador de NMA0939 demonstrou, as composições farmacêuticas que contêm esta proteína têm um alto valor como indutores de uma resposta imunológica com reação cruzada. As formulações apresentadas nesta invenção são aplicáveis ao campo de medicina humana.