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

(21) PI 0715551-4 A2

* B R P I 0 7 1 5 5 5 1 A 2 *

(22) Data de Depósito: 12/10/2007
(43) Data da Publicação: 02/07/2013
(RPI 2217)

(51) Int.Cl.:
A61K 39/00

(54) Título: COMPOSIÇÃO PARA BLOQUEAR A ENTRADA DE PELO MENOS UM SOROTIPO DE Shigella EM UMA CÉLULA PERMISSIVA,COMPOSIÇÃO PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE UMA INFECÇÃO COM Shigella, USOS, KIT DE BLOQUEIO DA ENTRADA E MÉTODOS

(30) Prioridade Unionista: 12/10/2006 CA 2,563,214

(73) Titular(es): INSTITUT PASTEUR, Inserm (Institut National De La Sante Et de La Recherche Medicale), Inserm (Institut National De La Sante Et de La Recherche Medicale), Rijksuniversiteit Te Groningen, Universite Libre de Bruxelles

(72) Inventor(es): Abdelmounaaïm ALLAOUI, Anne BOTTEAUX, Claude PARSOT, Egbert J.BOEKEMA, Musa SANI, Philippe SANSONETTI

(74) Procurador(es): Ana Paula Santos Celidonio

(86) Pedido Internacional: PCT IB2007004192 de 12/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/044149de 17/04/2008

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO PARA BLOQUEAR A ENTRADA DE PELO MENOS UM SOROTIPO DE Shigella EM UMA CÉLULA PERMISSIVA, COMPOSIÇÃO PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE UMA INFECÇÃO COM Shigella, USOS, KIT DE BLOQUEIO DA ENTRADA E MÉTODOS. A presente invenção refere-se a composições e métodos de bloqueio da entrada de Shigella em uma célula de um animal, de forma a fornecer proteção contra infecções de Shigella ou reduzir a sua severidade. Mais particularmente, ela se refere ao uso da proteína IpaD obtida de fontes naturais e/ou por meio de síntese ou tecnologia recombinante e seus conjugados para induzir a neutralização de anticorpos que possuem atividade protetora contra vários sorotipos de Shigella, particularmente S. flexneri. A composição de acordo com a presente invenção é útil para evitar e/ou tratar shigellose causada por uma bactéria da família de Shigella.

"COMPOSIÇÃO PARA BLOQUEAR A ENTRADA DE PELO MENOS UM SOROTIPO DE *Shigella* EM UMA CÉLULA PERMISSIVA, COMPOSIÇÃO PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE UMA INFECÇÃO COM *Shigella*, USOS, KIT DE BLOQUEIO DA ENTRADA E MÉTODOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições e métodos de bloqueio da entrada de *Shigella* em uma célula de um animal, de forma a fornecer proteção contra infecções de *Shigella* ou reduzir a sua severidade. Mais particularmente, ela se refere ao uso da proteína IpaD obtida de fontes naturais e/ou por meio de síntese ou tecnologia recombinante e seus conjugados para induzir a neutralização de anticorpos que possuem atividade protetora contra vários sorotipos de *Shigella*, particularmente *S. flexneri*. A composição de acordo com a presente invenção é útil para evitar e/ou tratar shigellose causada por uma bactéria da família de *Shigella*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Muitas bactérias patogênicas Gram-negativas utilizam um sistema de secreção do tipo 3 (T3S) para interagir com células do seu hospedeiro. Cada sistema T3S consiste de um aparelho de secreção (T3SA) que cobre o envelope bacteriano e estende-se sobre a superfície bacteriana, translocalizadores que transitam através do T3SA e inserem-se na membrana da célula hospedeira, onde formam um poro, efetores que transitam através do T3SA e do poro translocalizador para atingir o citoplasma da célula, chaperonas específicas que se associam a translocalizadores e efetores no citoplasma bacteriano e reguladores da transcrição. São necessárias cerca de quinze proteínas para montagem do T3SA.

As bactérias pertencentes à família de *Shigella* são os agentes causadores de disenteria bacilar em seres humanos [1]. Os genes necessários para entrada da bactéria em células epiteliais e indução da apoptose em

macrófagos são colocados em conjuntos em uma região de 30 kb, denominada região de entrada, de um plasmídeo de virulência de 220 kb. A região de entrada contém genes *mxi* e *spa* que codificam componentes do T3SA, os genes *ipaA*, *B*, *C* e *D*, *ipgB1*, *ipgD* e *icsB* que codificam proteínas que transitam através do T3SA, os genes *ipgA*, *ipgC*, *ipgE* e *spa15* que codificam chaperonas e os genes *virB* e *mixE* que codificam reguladores da transcrição [2].

O T3SA, que apresenta fraca atividade em bactérias que crescem em caldo, é ativado mediante contato de bactérias com células epiteliais [3]. A desativação de *ipaB*, *ipaC* ou *ipaD*, bem como a maior parte dos genes *mxi* e *spa*, elimina a capacidade das bactérias de entrar em células epiteliais, induz a apoptose em macrófagos e expressa a atividade hemolítica de contato. IpaB e IpaC contêm segmentos hidrofóbicos e permaneceram associados à membrana de eritrócitos lisados, o que sugere que essas duas proteínas são componentes do translocalizador de *S. flexneri*. Além disso, foram propostas funções efetoras para IpaB e IpaC [4,5,6,7,8]. A desativação de *ipaB* e *ipaD*, mas não de *ipaC*, gera um T3SA desregulado, ou seja, constitutivamente ativo, o que sugere que IpaB e IpaD desempenham um papel na manutenção do T3SA inativo na ausência de indutores [9, 10]. Uma pequena proporção de IpaD é associada ao envelope bacteriano [9, 11]. Picking e colaboradores [12] relataram que o papel de Ipad no controle da atividade de T3SA pode ser separado do seu papel na entrada de bactérias em células epiteliais.

Para obter visões adicionais da estrutura do complexo de agulha, os inventores realizaram uma análise micorscópica de imunoelétrons sobre bactérias tratadas com o agente reticulante BS^3, tanto sobre a bactéria completa quanto sobre o complexo de agulhas suavemente purificado (NC). Os inventores apresentam evidências de que IpaD é um componente do NC localizado na extremidade da agulha e que anticorpos elevados contra IpaD possuem um efeito inibidor sobre a entrada de *S. flexneri* em células epiteliais.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1: micrografias eletrônicas de bactérias manchadas negativamente tratadas com BS^3. As setas indicam densidades distintas na ponta de agulhas que se protuberam a partir da superfície bacteriana. A barra representa 100 nm.

Fig. 2: mapas de projeção (somas de classe) da parte de agulha de NCs obtidos por meio de análise de partículas isoladas. (A-B) Mapas de NCs isolados de tipo selvagem, tratados com BS^3 (A-C); de tipo selvagem sem tratamento com BS^3 (D-F) e de uma linhagem mutante de *ipaD* com tratamento com BS^3 (G-I). As setas apontam para densidades residuais ligadas a partes de agulhas preparadas sem tratamento com BS^3. A barra representa 10 nm.

Fig. 3: análise de imunomanchas de NCs purificados. Extratos de células inteiras (WCE) e NCs reticulados (+CR) e não reticulados (-CR) purificados a partir de linhagens do tipo selvagem e com deficiência de IpaD foram analisados por meio de SDS-PAGE e imunomanchas utilizando anticorpos específicos para MxiJ, MxiN e IpaD. IpaD foi enriquecido apenas até o nível de WCE em NCs preparados a partir de bactérias do tipo selvagem reticuladas. MxiJ é um controle positivo para demonstrar T3SA intacto. MxiN, um componente citoplasmático de T3S, é um controle positivo para demonstrar a contaminação por proteínas citoplasmáticas não unidas.

Fig. 4: localização de IpaD por meio de microscopia de imunoelétrons. NCs purificados a partir de bactérias do tipo selvagem tratadas com BS^3 foram incubados com anticorpos anti-IpaD e manchados negativamente (A-D). A imagem média de 250 NCs purificados a partir de bactérias não tratadas com BS^3 é exibida em E para comparação. A barra representa 10 nm.

Fig. 5: teste de invasão de células epiteliais por *S. flexneri* do tipo selvagem. As bactérias foram incubadas com diluições em série dos anticorpos

policlonais anti-IpaD ou anti-IpaB e as bactérias intracelulares resistentes a gentamicina foram contadas por meio de colocação de lisatos celulares em placas. A eficiência de entrada em cada condição é expressa com relação à da linhagem do tipo selvagem tratada com PBS. Os valores são as médias de pelo menos três experimentos independentes e as barras de erros indicam desvios padrão.

Fig. 6: sequência de aminoácidos do estado da técnica da proteína IpaD de uma linhagem de *Shigella* (acesso GenBank n° AL391753).

Fig. 7: sequência de ácidos nucleicos do estado da técnica que codifica a proteína IpaD da Fig. 6 (acesso GenBank n° AL391753).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os inventores descobriram surpreendentemente que anticorpos neutralizantes específicos de IpaD podem bloquear a entrada de *Shigella* em células permissivas, tais como células epiteliais, e que este efeito neutralizante é observado sobre diferentes sorotipos de *Shigella*. Neste particular, a presente invenção refere-se especificamente ao uso da proteína IpaD, polinucleotídeo que a codifica ou anticorpos neutralizantes anti-IpaD na preparação de composições e elaboração de métodos para permitir uma proteção cruzada contra infecções por *Shigella*.

DEFINIÇÕES:

Os termos "animal" ou "hospedeiro" designam qualquer animal suscetível ou conhecidamente infectado por uma linhagem de *Shigella*, tal como *S. flexneri*. Especificamente, o animal consiste de um ser humano.

A expressão "célula permissiva" designa uma célula que pode ser infectada por uma linhagem de *Shigella*. Essa célula pode ser, por exemplo, mas sem limitações, uma ou mais células epiteliais dos sistemas imunológicos, particularmente as que são alvos para invasão por *Shigella* no sistema imunológico da mucosa intestinal, tais como células dendríticas e

monócitos/macrófagos, mas também linfócitos B e T que podem sofrer injeção de efetores de *Shigella* por meio do sistema de secreção do Tipo III, mesmo se isso não gerar a sua invasão.

O termo "tratamento" indica um processo por meio do qual os sintomas de uma infecção ou uma doença associada a uma linhagem de *Shigella* são aliviados ou completamente eliminados. Da forma utilizada no presente, o termo "prevenção" designa um processo por meio do qual os sintomas de uma infecção ou doença associada a uma linhagem de *Shigella* são obstruídos ou retardados.

A expressão "reação protetora" indica a prevenção do início de uma doença associada a *Shigella* ou um infecção causada por uma espécie ou perda da severidade dessa doença existente em um animal.

A expressão "veículo aceitável" indica um veículo para conter os elementos da composição contemplada pela presente invenção que pode ser administrado a um animal hospedeiro sem efeitos prejudiciais. Os veículos apropriados conhecidos na técnica incluem, mas sem limitar-se a partículas de ouro, água estéril, solução salina, glicose, dextrose ou soluções tamponadas. Os veículos podem incluir agentes auxiliares que incluem, mas sem limitar-se a diluentes, estabilizantes (ou seja, açúcares e aminoácidos), conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes, agentes tamponadores do pH, aditivos aprimoradores da viscosidade, corantes e similares.

"Derivado funcional", da forma geralmente compreendida e utilizada no presente, designa uma sequência de proteínas ou peptídeos que possui uma atividade biológica funcional que é substancialmente similar à atividade biológica da sequência de proteína e peptídeo IpaD inteira. Em outras palavras, ela se refere preferencialmente a um polipeptídeo ou seu(s) fragmento(s) que retém(êm) substancialmente a capacidade de permitir a produção de agentes neutralizantes anti-IpaD contra uma infecção por

linhagem de *S.* quando o mencionado derivado funcional for administrado a um animal.

"Fragmento funcional", da forma geralmente compreendida e utilizada no presente, designa uma sequência de ácido nucleico que codifica uma atividade biológica funcional que é substancialmente similar à atividade biológica da sequência de ácido nucleico de IpaD completa. Em outras palavras e dentro do contexto da presente invenção, ela se refere preferencialmente a um ácido nucleico ou seu(s) fragmento(s) que retém(êm) substancialmente a capacidade de codificar uma proteína ou polipeptídeo de IpaD que permite a produção de agentes neutralizantes anti-IpaD contra uma infecção por linhagem de *Shigella* quando administrada a um animal.

A expressão "sorotipo de *Shigella*" designa os quatro grupos de *Shigella* que são identificados por uma letra maiúscula de A até D: *Shigella dysenteriae* (A), *Shigella flexneri* (B), *Shigella boydii* (C) e *Shigella sonnei* (D). Eles compreendem respectivamente: Grupo A, 8 sorotipos; Grupo B, 11 sorotipos e subsorotipos; Grupo C, 11 sorotipos; Grupo d, 1 serotipo. Um sorotipo de *Shigella* pode ser, mas sem limitações, por exemplo, *Shigella flexneri* 2a, 1b e 3a, *Shigella dysenteriae* 1 e *Shigella sonnei*.

Pelo termo "neutralização" ou "bloqueio", designa-se a capacidade de união específica dos anticorpos anti-IpaD de acordo com a presente invenção à proteína IpaD e de interferência na função biológica da proteína IpaD, de forma a bloquear, por exemplo, a capacidade da bactéria de fornecer os seus efetores de virulência às células alvo. Em outras palavras, esses anticorpos desarmam convenientemente o patógeno e o tornam incapaz de causar lesões e incapaz de resistir eficientemente às defesas imunológicas do hospedeiro.

COMPOSIÇÕES DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO:

Em um aspecto, a presente invenção fornece uma composição de tratamento e/ou prevenção de uma infecção de *Shigella*. A presente invenção

também fornece uma composição de bloqueio da entrada de pelo menos um sorotipo de *Shigella* em uma célula permissiva. Estas composições contempladas de acordo com a presente invenção compreendem pelo menos um dos elementos a seguir:

- um polipeptídeo de IpaD ou seu derivado funcional;
- um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de IpaD ou um de seus fragmentos funcionais;
- um anticorpo neutralizante anti-IpaD.

Como podem apreciar os técnicos no assunto, as composições de acordo com a presente invenção fornecem convenientemente uma proteção cruzada contra mais de um sorotipo de *Shigella* quando administrado a um hospedeiro. Em outras palavras, as composições de acordo com a presente invenção evitam ou reduzem substancialmente a entrada em uma célula permissiva de mais de um sorotipo de *Shigella*.

O polipeptídeo IpaD ou seu derivado funcional contemplado pela presente invenção possui, por exemplo, uma sequência de aminoácidos que é idêntica ou substancialmente idêntica à sequência de aminoácidos que possui o acesso GenBank n° AL391753 e ilustrada no presente como SEQ ID N° 1 (vide Fig. 6). No caso de um derivado funcional do polipleptídeo IpaD, pode-se utilizar o plasmídeo pMal-IpaD depositado no CNCM em dez de outubro de 2007 sob número de acesso I-3839. Esse plasmídeo codifica um fragmento da proteína IpaD que começa no códon 130 da proteína IpaD.

Por "substancialmente idêntica", ao referir-se a uma sequência de aminoácidos, compreender-se-á que o polipeptídeo contemplado pela presente invenção contém, por exemplo, uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 75% de identidade, 85% de identidade ou até 95% de identidade para a sequência exibida em SEQ ID N° 1, no todo ou em parte.

O polinucleotídeo ou seu fragmento funcional contemplado pela

presente invenção codifica o polipeptídeo IpaD ou um de seus derivados funcionais, conforme definido acima. Esse polinucleotídeo possui, por exemplo, uma sequência de nucleotídeos ou ácidos nucleicos que é idêntica ou substancialmente idêntica à sequência de nucleotídeos que possui acesso GenBank n° AL391753 e ilustrada no presente como SEQ ID N° 2 (vide Fig. 7). No caso de um fragmento funcional do polinucleotídeo IpaD, pode-se utilizar o plasmídeo pMal-IpaD, conforme definido acima.

Por "substancialmente idêntica", ao referir-se a uma sequência de nucleotídeos ou polinucleotídeos, compreender-se-á que o polinucleotídeo contemplado pela presente invenção possui, por exemplo, uma sequência de ácidos nucleicos que é pelo menos 65% idêntica ou 80% idêntica ou até 95% idêntica à sequência exibida em SEQ ID N° 2, no todo ou em parte.

Também são conhecidos na técnica métodos de determinação da "identidade de sequências" de aminoácidos e ácidos nucleicos. Tipicamente, esses métodos incluem a determinação da sequência de nucleotídeos do mRNA para um gene, a própria sequência de DNA e/ou determinação da sequência de aminoácidos por ela codificada e comparação dessas sequências com uma segunda sequência de aminoácidos ou nucleotídeos. De forma geral, "identidade" designa uma correspondência exata entre nucleotídeos ou entre aminoácidos de dois polinucleotídeos ou sequências de polipeptídeos, respectivamente. Duas ou mais sequências (polinucleotídeos ou aminoácidos) podem ser comparadas determinando-se o seu "percentual de identidade". O percentual de identidade de duas sequências, sejam elas sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos, é o número de coincidências exatas entre duas sequências alinhadas dividido pelo comprimento das sequências mais curtas e multiplicado por 100. Um alinhamento aproximado para sequências de ácidos nucleicos é fornecido pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981). Este algoritmo pode ser

aplicado a sequências de aminoácidos utilizando a matriz de avaliação desenvolvida por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff, ed., 5 suplemento 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC, Estados Unidos, e normalizado por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14 (6): 6745-6763 (1986). Um exemplo de implementação deste algoritmo para determinar o percentual de identidade de uma sequência é fornecido pela Genetics Computer Group (Madison, Wis.) na aplicação utilitária "BestFit". Os parâmetros padrão para este método são descritos no Manual do Programa de Pacote de Análise de Sequências Wisconsin, Versão 8 (1995) (disponível por meio da Genetics Computer Group, Madison, Wis.). Um método preferido de estabelecimento do percentual de identidade no contexto da presente invenção é o uso do pacote MSPRCH de programas de propriedade da Universidade de Edimburgo, desenvolvido por John F. Collins e Shane S. Sturrok e distribuído pela IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, Calif.). Deste conjunto de pacotes, pode ser empregado o algoritmo de Smith-Waterman, em que parâmetros padrão são utilizados para a tabela de avaliação (por exemplo, penalidade aberta de lacuna de 12, penalidade de extensão de lacuna de 1 e lacuna de 6). A partir dos dados gerados, o valor "Coincidência" reflete a "identidade de sequências". Outros programas apropriados para cálculo do percentual de identidade ou similaridade entre sequências são geralmente conhecidos na técnica; um outro programa de alinhamento, por exemplo, é BLAST, utilizado com parâmetros padrão. BLASTN e BLASTP podem ser utilizados, por exemplo, utilizando os parâmetros padrão a seguir: código genético = padrão; filtro = nenhum; linhagem = ambos; corte = 60; espera = 10; Matriz BLOSUM62; descrições = 50 sequências; ordenamento por = ALTA AVALIAÇÃO; bancos de dados = não redundantes, GenBank+EMBL+DDBJ+PDP+traduções CDS do GenBank+proteínas Suíças+Spupdate+PIR.

Os anticorpos neutralizantes contemplados pela presente invenção que se unem especificamente à proteína IpaD podem ser preparados por meio de uma série de métodos conhecidos dos técnicos no assunto. O polipeptídeo IpaD pode ser administrado, por exemplo, a um animal, a fim de induzir a produção de anticorpos policlonais. Alternativamente, os anticorpos neutralizantes anti-Ipad utilizados conforme descrito no presente podem ser anticorpos monoclonais, que são preparados utilizando tecnologias de hibridoma conhecidas (vide, por exemplo, Hammerling et al, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, Nova Iorque, 1981). Com relação aos anticorpos contemplados de acordo com a presente invenção, a expressão "une-se especificamente a" designa anticorpos que se unem com uma afinidade relativamente alta a um ou mais epítopos do polipeptídeo IpaD, mas que não reconhecem substancialmente nem unem moléculas diferentes do polipeptídeo IpaD. Da forma utilizada no presente, a expressão "afinidade relativamente alta" indica uma afinidade de união entre o anticorpo e o polipeptídeo IpaD de pelo menos 10^6 M^{-1} e, preferencialmente, pelo menos cerca de 10^7 M^{-1} e, de preferência ainda maior, 10^8 M^{-1} a 10^{10} M^{-1}. A determinação dessa afinidade é preferencialmente conduzida sob condições de imunoteste de união competitiva padrão que são de conhecimento comum dos técnicos no assunto.

Compreende-se que se encontra dentro do conhecimento da técnica selecionar e identificar anticorpos que neutralizem a entrada de *Shigella* em uma célula.

Em uma realização preferida, a composição de acordo com a presente invenção compreende adicionalmente um adjuvante. Da forma utilizada no presente, o termo "adjuvante" indica uma substância adicionada à composição de acordo com a presente invenção para aumentar a imunogenicidade da composição. O mecanismo de operação de um adjuvante

não é completamente conhecido. Acredita-se que alguns adjuvantes aumentem a reação imunológica (reação humoral e/ou celular) por meio de lenta liberação do antígeno, enquanto outros adjuvantes são fortemente imunogênicos por si próprios e acredita-se que funcionem de forma sinérgica. Os adjuvantes conhecidos incluem, mas sem limitar-se a emulsões de óleo em água (por exemplo, adjuvante de Freund completo e adjuvante de Freund incompleto), Corytzebacterium parvuin, Quil A, citoquinas tais como IL-12, Emulsigen Plus®, Bacillus calmette Guerin, hidróxido de alumínio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de ferro, alginato de sódio, adjuvante Bacto, certos polímeros sintéticos tais como poliaminoácidos e copolímeros de aminoácidos, saponina, óleo de parafina e dipeptídeo muramila. Os adjuvantes também englobam adjuvantes genéticos, tais como moléculas imunomoduladoras codificadas em um DNA coinoculado, ou como oligonucleotídeos de CpG. O DNA coinoculado pode estar na mesma construção de plasmídeo do imunogene de plasmídeo ou em um vetor de DNA separado.

Segundo uma realização preferida da presente invenção, as composições podem compreender adicionalmente um antígeno poliosídico, tal como os descritos em WO 2005/003995. Antígenos poliosídicos contemplados podem ser, por exemplo, mas sem limitações, polissacarídeos sintéticos correspondentes às cadeias laterais O (constitutivas dos sorotipos) de linhagens de interesse, particularmente os sorotipos cuja alta prevalência é preferencialmente considerada: *Shigella flexneri* 2a, 1b e 3a, *Shigella dysenteriae* 1 e *Shigella sonei*. Os antígenos poliosídicos contemplados podem também ser lipopolissacarídeo desintoxidado (LPS) extraído de cultivos bacterianos de sorotipos similares.

MÉTODOS DE TRATAMENTO E COMPOSIÇÕES:

O polipeptídeo IpaD ou seus derivados funcionais, o polinucleotídeo ou fragmentos funcionais que os codificam e anticorpos

contemplados pela presente invenção podem ser utilizados de muitas formas no tratamento e/ou prevenção de infecções de *Shigella* o u na entrada de bloqueio de linhagens de *Shigella* em uma célula permissiva.

Segundo um aspecto da presente invenção, por exemplo, o polipeptídeo IpaD pode ser utilizado como imunogene para a produção de anticorpos neutralizantes anti-Ipad específicos. Conforme mencionado anteriormente, anticorpos neutralizantes anti-IpaD apropriados podem ser determinados utilizando métodos de seleção conhecidos, tais como por meio da medição da capacidade de um anticorpo específico de neutralizar ou bloquear a entrada de uma linhagem de *Shigella* em uma célula.

Segundo um outro aspecto, os polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo IpaD ou seus derivados podem ser utilizados em um método de imunização de DNA de forma a produzir anticorpos neutralizantes anti-Ipad. Isso significa que eles podem ser incorporados em um vetor que é reproduzível e expressível mediante injeção, de forma a produzir o polipeptídeo antigênico *in vivo*. Polinucleotídeos podem ser incorporados, por exemplo, em um vetor de plasmídeos sob o controle do promotor de CMV que é funcional em células eucarióticas. Preferencialmente, o vetor é injetado por via intramuscular.

O uso de um polinucleotídeo de acordo com a presente invenção em imunização genética empregará preferencialmente um sistema ou método de fornecimento apropriado, tal como injeção direta de DNA de plasmídeo em músculos (Wolf et al, *H M G* (1992) 1: 363, Turnes et al, *Vaccine* (1999), 17: 2089, Le et al, *Vaccine* (2000) 18: 1893, Alves et al, *Vaccine* (2001), 19: 788), injeção de DNA de plasmídeo com ou sem adjuvantes (Ulmer et al, *Vaccine* (1999) 18: 18, MacLaughlin et al, *J. Control Release* (1998) 56: 259, Hartikka et al, *Gene Ther.* (2000) 7: 1171-82, Benvenisty e Reshef, *PNAS USA* (1986) 83: 9551, Singh et al, *PNAS USA* (2000) 97: 811), direcionamento de células por meio do fornecimento de DNA em complexo com veículos específicos (Wa et

al, *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 16985, Chaplin et al, *Infect. Immun.* (1999) 67: 6434), injeção de plasmídeo em complexo ou encapsulado em várias formas de lipossomos (Ishii et al, *AIDS Research and Human Retroviruses* (1997) 13: 142, Perrie et al, *Vaccine* (2001), 19: 3301), administração de DNA com diferentes métodos de bombardeamento (Tang et al, *Nature* (1992) 356: 152, Eisenbraun et al, *DNA Cell Biol.* (1993) 12: 791, Chen et al, *Vaccine* (2001) 19: 2908) e administração de DNA com vetores vivos (Tubulekas et al, *Gene* (1997) 190: 191, Pushko et al, *Virology* (1997) 239: 389, Spreng et al, *FEMS* (2000) 27: 299, Dietrich et al, *Vaccine* (2001) 19: 2506).

Um aspecto adicional da presente invenção é o uso dos anticorpos neutralizantes anti-IpaD para imunização passiva.

Ainda outro aspecto da presente invenção é o fornecimento de um método de tratamento e/ou prevenção de uma infecção de *Shigella* em animais. O método de acordo com a presente invenção compreende a etapa de administração ao animal de uma composição de acordo com a presente invenção.

Ainda um outro aspecto da presente invenção é o fornecimento de um método de bloqueio da entrada de pelo menos um sorotipo de *Shigella* em uma célula permissiva, que compreende a etapa de permissão da formação de um complexo imune por meio de contato de um anticorpo neutralizante anti-IpaD com uma linhagem de *Shigella* capaz de infectar a mencionada célula permissiva, em que o mencionado complexo imune evita ou reduz substancialmente a entrada da mencionada linhagem de *Shigella* na célula permissiva.

A quantidade dos componentes ou dos elementos das composições de acordo com a presente invenção é preferencialmente uma quantidade terapeuticamente eficaz. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do componente contemplado é a quantidade necessária para permitir que ele

desempenhe o seu papel imunológico (ou seja, a produção de anticorpos neutralizantes anti-IpaD) sem causar efeitos negativos excessivos no hospedeiro ao qual a composição é administrada. A quantidade exata dos componentes a serem utilizadas e a composição a ser administrada variará de acordo com fatores tais como o tipo de condição sendo tratado, o tipo e a idade do animal a ser tratado, o modo de administração, bem como os demais ingredientes da composição.

As composições de acordo com a presente invenção podem ser fornecidas a um animal por meio de várias vias de administração. As composições podem ser administradas, por exemplo, na forma de preparações injetáveis estéreis, tais como suspensões oleaginosas ou aquosas injetáveis estéreis. Estas suspensões podem ser formuladas de acordo com métodos conhecidos na técnica utilizando agentes umectantes ou dispersantes e agentes formadores de suspensão apropriados. As preparações injetáveis estéreis podem também ser soluções ou suspensões injetáveis estéreis ou diluentes ou solventes parenteralmente aceitáveis não tóxicos. Eles podem ser administrados por via parenteral, tal como por via intravenosa, intramuscular ou subcutânea por meio de injeção, infusão ou os. As dosagens apropriadas variarão, dependendo de fatores tais como a quantidade de cada um dos componentes nas composições, o efeito desejado (curto ou longo prazo), a via de administração, a idade e o peso do animal a ser tratado. Qualquer outro método bem conhecido na técnica pode ser utilizado para administração da composição de acordo com a presente invenção.

Um aspecto adicional da presente invenção é o fornecimento de kits para uso em qualquer dos métodos acima contemplados pela presente invenção. Um kit pode compreender dois ou mais componentes necessários para realizar um teste definido. Os componentes podem ser compostos, reagentes, recipientes e/ou equipamento. Um recipiente em um kit pode conter,

por exemplo, um anticorpo monoclonal ou seu fragmento ou anticorpos policlonais que neutralizam especificamente uma proteína IpaD. Um ou mais recipientes adicionais podem incluir elementos, tais como reagentes ou tampões, a serem utilizados no teste. Outros kits contemplados pela presente invenção podem compreender pelo menos um polipeptídeo IpaD ou polinucleotídeo que o codifica, conforme descrito acima, para dirigir uma reação imunológica neutralizante contra a proteína IpaD de *Shigella*.

A presente invenção será mais facilmente compreendida por meio de referência aos exemplos a seguir. Estes exemplos ilustram a ampla variedade de aplicação da presente invenção e não se destinam a limitar o seu escopo. Podem ser realizadas modificações e variações sem abandonar o espírito e escopo da presente invenção. Embora qualquer método e material similar ou equivalente aos descritos no presente possa ser utilizado na prática para teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são descritos a seguir.

EXEMPLOS

Sistemas de secreção do tipo III (T3S) são utilizados por numerosas bactérias patogênicas Gram-negativas para injetar proteínas de virulência em células hospedeiras animais e vegetais. O núcleo do aparelho T3S, conhecido como o complexo de agulha, é composto de um corpo basal que atravessa as duas membranas bacterianas e uma agulha que se protubera acima da superfície bacteriana. Em *Shigella flexneri*, IpaD é necessário para inibir a atividade do aparelho T3S antes do contato da bactéria com o hospedeiro e propôs-se que ele assista a translocação de proteínas bacterianas em células hospedeiras. Os inventores investigaram a localização de IpaD por meio de análise de microscopia eletrônica de bactérias reticuladas e complexos de agulhas suavemente purificados. Esta análise revelou a presença de uma densidade distinta na extremidade da agulha. Uma

combinação de análise de partículas isoladas, imunomarcas e análise bioquímica demonstrou que IpaD faz parte da estrutura na extremidade da agulha. Demonstrou-se que anticorpos anti-IpaD bloqueiam a entrada de bactérias em células epiteliais.

MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS:

LINHAGENS BACTERIANAS E MEIOS DE CRESCIMENTO:

As linhagens utilizadas neste estudo são a linhagem M90T-Sm de *S. flexneri* 5 do tipo selvagem [13], seu derivado de *ipaD* SF622 [14]. As bactérias foram cultivadas em caldo de soja com caseína tríptica (TSB) (Sigma) a 37 °C.

PURIFICAÇÃO DE COMPLEXO DE AGULHAS (NC):

NCs foram purificados conforme descrito [15]. As bactérias na fase exponencial de crescimento em um litro de TSB a 37 °C foram recolhidas por meio de centrifugação, novamente suspensas em 25 ml de solução salina tamponada com fosfato e incubadas na presença de 1 mM de suberato de (bis)sulfossuccinimidila (BS^3) por trinta minutos a 37 °C. A mistura foi suplementada com 100 mM de Tris-HCl e incubada por quinze minutos a 37 °C. Cultivos tratados com BS^3 foram colhidos e novamente suspensos em um tampão de lise resfriado com gelo (0,5 M sacarose, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 mM EDTA, 0,5 mg/ml de lisozima) suplementado com 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonila e incubado por 45 minutos a 4 °C e por quinze minutos a 37 °C. Esferoplastas resultantes foram incubados com 0,01% Triton X-100 por trinta minutos e tratados com 4 mM $MgCl_2$ e 80 µg/ml de DNAse (Sigma) por vinte minutos a 30 °C. Os fragmentos foram removidos por meio de centrifugação (20.000 g por vinte minutos a 4 °C) e a fração de membrana foi peletizada por meio de centrifugação (110.000 g por trinta minutos a 4 °C) e novamente suspensa em tampão TET (20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM de EDTA, 0,01% Triton X-100). Realizou-se análise de imunomanchas com

anticorpos elevados contra MxiJ, MxiN e IpaD conforme descrito [16].

MICROSCOPIA ELETRÔNICA E ANÁLISE DE IMAGENS:

Células inteiras e amostras de NCs purificados foram manchadas negativamente com acetato de uranila a 2% sobre grades de cobre revestidas com carbono com descarga luminosa. Realizou-se microscopia eletrônica em um Philips CM120FEG equipado com uma pistola de emissão de campo operada a 120 kV. As imagens foram registradas com uma câmera CCD de varrimento lento 4000 SP 4K em ampliação de 80.000x em um tamanho de pixel (após colocação das imagens em compartimento) de 3,75 Å no nível de amostra, com software "GRACE" para seleção de amostras semiautomatizada e obtenção de dados [17]. Análise de partículas isoladas incluindo procedimentos sem referência e de múltiplas referências, análise estatística multivariada e classificação foi realizada conforme descrito [15]. Para imunomarcação, NCs purificados foram incubados com anticorpos policlonais de IpaD purificados por afinidade (pAbs) em uma concentração final de 0,132 ng/µl por uma hora a 20 °C. Amostras foram manchadas com acetato de uranila a 2% e observadas conforme acima.

TESTE DE INVASÃO:

Dois mililitros de cultivos de linhagens *mxiD* ou de tipo selvagem na fase exponencial de crescimento (OD_{600nm} de 0,4) foram incubados na presença de anticorpos anti-IpaD (diluição 1/2000 a 1/50) ou anti-IpaB (1/50) por uma hora a 37 °C e as bactérias foram centrifugadas sobre placas contendo 2 x 10^5 células Hela por dez minutos a 2000 g. Após incubação por uma hora a 37 °C, as células foram lavadas por três vezes com 2 ml de EBSS e incubadas por uma hora com 2 ml de meio MEM contendo 50 µg/ml de gentamicina. Após três lavagens com 2 ml de EBSS, as placas foram incubadas com uma solução de deoxicolato a 0,5% por quinze minutos a 20 °C e os lisatos celulares foram diluídos e colocados em placas sobre placas agar

para contagem de colônias.

EXEMPLO 1

ESTRUTURA DISTINTA NA PONTA DA AGULHA T3SA

Os procedimentos de purificação de proteínas tendem a selecionar os complexos mais estáveis e poderão não conter subunidades fracamente associadas. Os inventores demonstraram recentemente que uma concentração de detergente Triton-X100 de até 0,01% era suficiente para induzir a liberação de NCs da membrana (Sani et al, 2006). Para detectar subunidades potencialmente instáveis ligadas à agulha, os inventores realizaram uma etapa de retícula com BS^3 sobre bactérias antes de qualquer purificação. Análise de microscopia eletrônica indicou que, após o tratamento com BS^3, a maior parte das bactérias exibiu apêndices de agulhas com uma densidade adicional na extremidade da ponta (Fig. 1).

NCs foram purificados a partir de bactérias tratadas com BS^3 após a solubilização em detergente de membranas conforme descrito [18]. As preparações continham uma quantidade suficiente de NCs com as densidades adicionais na ponta da agulha para realizar uma análise estrutural. Para calcular mapas de projeção bidimensional de NCs isolados, foram analisadas imagens de microscopia eletrônica por meio de análise de partículas isoladas. Os inventores selecionaram várias centenas de imagens de NCs com um apêndice de agulha curto e relativamente reto e um comprimento de cerca de 45 nm. A média dos NCs exibiu claramente a presença de uma densidade em volta da ponta da agulha, bem como a parte superior do corpo base (Fig. 2A e 2B; vide também a Fig. 4E para uma vista total de um NC). NCs apareceram, entretanto, um pouco borrados após o cálculo da média como resultado de variações do comprimento da agulha. Características mais pontiagudas na ponta da parte de agulha foram obtidas quando as projeções eram alinhadas e classificadas após mascarar a parte de base (Fig. 2C). Características

marcantes do mapa médio de partículas reticuladas são a presença de densidades em qualquer dos lados da ponta de agulha. Por outro lado, os mapas médios de partículas preparadas a partir da linhagem do tipo selvagem sem retícula exibiram agulhas que não possuem a maior parte dessas densidades (Fig. 2D a F). Densidades opacas são visíveis nessas amostras na mesma posição em que as densidades fortes estavam presentes em preparações reticuladas (setas, Fig. 2E e 2F). Estes resultados sugerem que, na ausência de retículas, a maior parte dos NCs purificados perdeu a(s) molécula(s) adicional(is) que forma(m) a densidade observada após a retícula. Para identificar molécula(s) que forma(m) a densidade na ponta do T3SA, os inventores realizaram experimentos similares com um *ipaD* mutante que não possui a expressão de IpaD. IpaD é necessário, junto com IpaB, para manter o T3SA inativo na ausência de indutores e uma pequena proporção de IpaD é associada à membrana [9]. NCs purificados a partir do mutante *ipaD* tratado com BS^3 não exibiram densidades em nenhum dos lados da ponta de agulha (Fig. 2G-I), o que sugere que IpaD é uma parte desse elemento estrutural ou necessário para a sua montagem.

EXEMPLO 2

IPAD ESTÁ PRESENTE NA PONTA DA AGULHA T3SA

Para testar se IpaD contribui com a densidade observada, NCs purificados a partir de bactérias do tipo selvagem tratadas com BS^3 foram analisados por meio de SDS-PAGE e imunomanchas (Fig. 3). IpaD foi enriquecido em NCs preparados a partir de bactérias do tipo selvagem reticuladas, em comparação com NCs preparados a partir de bactérias não reticuladas (Fig. 3, painel direito, linha direita), embora pequenas quantidades também sejam copurificadas em preparação não reticulada e, desta forma, corroborem as densidades opacas na ponta da agulha para médias de NCs não reticulados. MxiJ, que é um componente de NC importante, está presente

em quantidades similares em todas as preparações (Fig. 3). Experimentos de controle utilizando anticorpos que reconhecem componentes citoplasmáticos do sistema T3S, tais como MxiN, não revelaram nenhuma contaminação de NCs por componentes intracelulares (Fig. 3), o que indica que a presença de IpaD nas preparações não se deveu a contaminação por proteínas citoplasmáticas.

Para confirmar que as densidades detectadas na ponta de NCs continham IpaD, os inventores realizaram imunomanchas utilizando um soro anti-IpaD. Anticorpos uniram-se especificamente à ponta da agulha em NCs preparados a partir de bactérias do tipo selvagem tratadas com BS^3 (Fig. 4 A-D). Também se observou a associação de algumas agulhas pela sua ponta, presumivelmente como resultado da interação com anticorpos divalentes com duas agulhas (quadro inferior à esquerda, Fig. 4D). Em experimentos de controle, não se encontrou nenhum anticorpo que se unisse à agulha de NCs isolados do mutante *ipaD* (dados não exibidos).

EXEMPLO 3

ANTICORPOS ANTI-IPAD BLOQUEIAM A ENTRADA DE BACTÉRIAS EM CÉLULAS EPITELIAIS

Como IpaD é necessário para a entrada de bactérias em células epiteliais [14] e como, conforme exibido no presente, ele está localizado na ponta do T3SA, os inventores pesquisaram se anticorpos anti-IpaD poderiam interferir na entrada de bactérias em células HeLa. Bactérias incubadas com diferentes concentrações do soro anti-IpaD ou um soro anti-IpaB como controle foram utilizadas para infectar células de HeLa. A exposição de bactérias ao soro anti-IpaD, mas não ao soro anti-IpaB, inibiu a entrada de bactérias de forma dependente da dosagem (Fig. 5). O tratamento com os anticorpos anti-IpaD também inibiu a entrada de uma linhagem de *S. flexneri 2a* (dados não exibidos).

DISCUSSÃO GERAL REFERENTE AOS EXEMPLOS 1 A 3:

S. flexneri T3SA é ativado mediante contato das bactérias com células epiteliais e é desregulado por meio da desativação de *ipaB* ou *ipaD*. Propôs-se que estas proteínas são necessárias para formar um complexo que obstrui T3SA. No presente, os inventores apresentam evidências que IpaD está presente na ponta da agulha. Micrografia eletrônica de transmissão de agulhas expostas na superfície de bactérias reticuladas demonstrou uma estrutura distinta presente na ponta da agulha e análise de imunomanchas de NCs suavemente purificados indicou que IpaD é copurificado com os NCs reticulados.

Médias calculadas de NCs isolados de bactérias do tipo selvagem reticuladas exibiram densidades distintas nos dois lados da ponta da agulha. Esta característica não foi observada em NCs isolados da linhagem do tipo selvagem que não haviam sido tratados com o reticulante e do *ipaD* mutante tratado com o reticulante. Resultados de microscopia imunoeletrônica indicam que a densidade observada na ponta da agulha contém moléculas de IpaD. A configuração exata da densidade adicional, entretanto, não pode ser recuperada de mapas de projeção 2D. As duas massas adicionais possuem dimensões de cerca de 7 x 7 nm. Como o tamanho de IpaD é de 37 kDa, várias cópias de Ipad provavelmente estão presentes nessas estruturas. De fato, propôs-se que IpaD forme oligômeros [19]. IpaD apresenta algumas analogias funcionais com LcrV de *Yersinia enterocolitica*, já que as duas proteínas possuem tamanhos similares e ambas são necessárias para inserção dos translocalizadores propostos, IpaB e IpaC em *S. flexneri* e YopB e UopD em *Y. enterocolitica*, na membrana de células hospedeiras [9, 20, 21]. Dados recentes indicaram que LcrV está localizado na ponta da agulha T3SA [20]. A estrutura em *Yersinia* aparentemente é levemente diferente de *Shigella* com densidades protuberantes menores no lado e com uma ponta diferente.

A identificação de um elemento estrutural que contém IpaD na ponta da agulha T3SA fornece indicações adicionais sobre a composição e a estrutura de *S. flexneri* T3SA. Muito recentemente, também se demonstrou com métodos bioquímicos que IpaD localiza-se na ponta da agulha T3SA, onde funciona para controlar a secreção e a inserção apropriada de translocalizadores em membranas de células hospedeiras [22]. A análise de partículas isoladas do presente demonstra diretamente, entretanto, a posição de Ipad na ponta da agulha e agrega credenciais à hipótese que IpaD age como um batoque para o T3SA antes do contato da bactéria com células. Conforme proposto para LcrV em *Yersinia*, IpaD poderá também facilitar a inserção de componentes dos translocalizadores no interior da membrana celular. A inibição da entrada de bactérias em células HeLa por meio de tratamento com anticorpos neutralizantes anti-IpaD indica que a união de anticorpos a IpaD interfere com a função da proteína. Também se demonstrou que LcrV é um antígeno protetor para doenças de pragas em estudos animais [23, 24]. Consequentemente, IpaD representa um alvo interessante para a preparação de vacinas que seriam eficazes contra vários sorotipos de *Shigella*.

EXEMPLO 4

EFEITO PROTETOR DE ANTICORPOS ANTI-IPAD *IN VIVO*

Conjuntos ilíacos intestinais realizados em coelhos foram inoculados com uma suspensão de 10^9 CFU de sorotipo 5a de *Shigella flexneri* isolado ou foram incubados na presença de diluições diferentes de um soro policlonal de coelho específico para IpaD. O soro policlonal anti-Ipad foi produzido após uma imunização com um derivado funcional da proteína IpaD expresso pelo vetor de expressão de pMal-IpaD depositado no CNCM em dez de outubro de 2007 com número de acesso I-3839. Este modelo resume o conjunto de lesões observadas durante shigellose em seres humanos após a ruptura, invasão e destruição inflamatória do epitélio intestinal por esta bactéria

enteroinvasiva. Estas lesões manifestam-se por meio de uma combinação de alterações morfológicas das vilosidades intestinais e edema, combinadas com um filtrado celular inflamatório, particularmente neutrófilos polinucleares, e abscessos que eventualmente tornam-se ulcerados no lúmen intestinal. Ao todo, isso gera os exudados mucopurulentos luminais que frequentemente são invasivos.

Comparando-se a destruição dos tecidos nos circuitos intestinais inoculados com bactérias isoladamente com os que receberam bactérias na presença de soro policlonal anti-IpaD, observou-se um efeito protetor que é dependente da concentração de anticorpos anti-IpaD. De fato, quando o soro utilizado não é diluído, nenhuma lesão é visível. Quando o soro utilizado estiver em uma diluição 1/10, entretanto, aparecem lesões muito discretas, que se tornam mais claras ao utilizar-se uma diluição 1/100, enquanto todas permanecem menos importantes que as observadas com bactérias isoladamente. Nenhuma proteção é observada com um soro policlonal de controle dirigido a uma proteína não relevante. A proteção observada é ligada especificamente, portanto, à presença de anticorpos anti-IpaD.

REFERÊNCIAS

[1] E. H. LaBrec, H. Schneider, T. J. Magnani, S. B. Formal, *Epithelial Cell Penetration as an Essential Step in the Pathogenesis of Bacillary Dysentery*, *J. Bacteriol.* 43 (1994), 1503-1518.

[2] C. Parsot, *Shigella spp and Enteroinvasive Escherichia coli Pathogenicity Factors*, *FEMS Microbiol. Lett.* 252 (2005) 11-18.

[3] F. G. van der Goot, G. Trans van Nhieu, A. Allaoui, P. Sansonetti, F. Lafont, *Rafts can Trigger Contact-Mediated Secretion of Bacterial Efforts via a Lipid-Based Mechanism*, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 47792-47798.

[4] Y. Chen, M. R. Smith, K. Thirumalai, A. Zychlinsky, *A Bacterial Invasin Induces Macrophage Apoptosis by Binding Directly to ICE*, *EMBO J.* 15 (1996) 3853-3860.

[5] A. Kuwae, S. Yoshida, K. Tamano, H. Mimuro, T. Suzuki, C. Sasakawa, *Shigella Invasion of Macrophage Requires the Insertion of IpaC into the Host Plasma Membrane: Functional Analysis of IpaC*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32230-32239.

[6] R. Ménard, M. C. Prevost, P. Gounon, P. Sansonetti, C. Dehio, *The Secreted Ipa Complex of Shigella flexneri Promotes Entry Into Mammalilan Cells*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 1254-1258.

[7] G. Tran Van Nhieu, R. Bourdeet-Sicard, G. Dumenil, A. Blocker, P. J. Sansonetti, *Bacterial Signals and Cell Responses During Shigella entry into Epithelial Cells*, *Cell Microbiol.* 2 (2000) 187-193.

[8] G. Tran Van Nhieu, E. Caron, A. Hall, P. J. Sansonetti, *IpaC Induces Actin Polymerization and Filopodia Formation During Shigella Entry into Epithelial Cells*, *EMBO J.* 18 (1999) 3249-3262.

[9] R. Ménard, P. Sansonetti, C. Parsot, *The Secretion of the Shigella flexneri Ipa Invasins is Activated by Epithelial Cells and Controlled by IpaB and IpaD*, *EMBO J.* 13 (1994) 5293-5302.

[10] C. Parsot, R. Menard, P. Gounon, P. J. Sansonetti, *Enhanced Secretion through the Shigella flexneri Mxi-Spa Translocon Leads to Assembly of Extracellular Proteins into Macromolecular Structures*, *Mol. Microbiol.* 16 (1995) 291-300.

[11] K. R. Turbyfill, J. A. Mertz, C. P. Mallett, E. V. Oaks, *Identification of Epitope and Surface-Exposed Domains of Shigella flexneri Invasion Plasmid Antigen D (IpaD)*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 1999-2006.

[12] W. L. Picking, H. Nishioka, P. D. Hearn, M. A. Baxter, A. T. Harrington, A. Blocker, W. D. Picking, *IpaD of Shigella flexneri is Independently Required for Regulation of Ipa Protein Secretion and Efficient Insertion of IpaB and IpaC into Host Membranes*, *Infect. Immun.* 73 (2005) 1432-440.

[13] A. Allaoui, P. J. Sansonetti, C. Parsot, *MxiJ, a Lipoprotein Involved in Secretion of Shigella Ipa Invasins, is Homologous to Yscj, a Secretion Factor of the Yersinia Yop Proteins*, *J. Bacteriol.* 174 (1992) 7661-7669.

[14] R. Menard, P. J. Sansonetti, C. Parsot, *Nonpolar Mutagenesis of the Ipa Genes Defines IpaB, IpaC and IpaD as Effectors of Shigella-Flexneri Entry into Epithelial Cells*, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 5899-5906.

[15] M. Sani, A. Allaoui, F. Fusetti, G. T. Oostergetel, W. Keegstra, E. J. Boekema, *Structural Organisation of the Needle Complex of the Type III Secretion Apparatus of Shigella flexneri*, *Micron* (em impressão), 2006.

[16] N. Jouihri, M. P. Sory, A. L. Page, P. Gounon, C. Parsot, A. Allaoui, *MxiK and MxiN Interact with the Spa47 ATPase and are Required for Transit of the Needle Components MxiH and MxiI, but Not of Ipa Proteins, through the Type III Secretion Apparatus of Shigella flexneri*, *Mol. Microbiol.* 49 (2003) 755-767.

[17] G. T. Oostergetel, W. Keegstra, A. Brisson, *Automation of Specimen Selection and Data Acquisition for Protein Electron Crystallography*, *Ultramicroscopy* 74 (1998) 47-59.

[18] R. Schuch, A. T. Maurelli, *MxiM and MxiJ, Base Elements of the Mxi Spa Type III Secretion System of Shigella, Interact with and Stabilize the MxiD Secretin in the Cell Envelope*, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 6991-6998.

[19] R. Davis, M. E. Marquart, D. Lucius, W. D. Picking, *Protein-Protein Interactions in the Assembly of Shigella flexneri Invasion Plasmid Antigens IpaB and IpaC into Protein Complexes*, *Biochim. Biophys. Acta* 1429 (1998) 45-56.

[20] C. A. Mueller, P. Broz, S. A. Muller, P. Ringler, F. Erne-Brand I., Sorg, M. Kuhn, A. Engel, G. R. Cornelis, *The V-Antigen of Yersinia Forms a Distinct Structure at the Tip of Injectisome Needles*, *Science* 310 (2005) 674-676.

[21] L. J. Mota, *Type III Secretion Gets an LcrV Tip*, *Trends Microbiol.* 14 (2006) 197-200.

[22] M. Espina, A. J. Olive, R. Kenjale, D. S. Moore, S. F. Ausar, R. W. Kaminski, E. V. Oaks, C. R. Middaugh, W. D. Picking, W. L. Picking, *IpaD Localizes to the Tip of the Type III Secretion System Needle of Shigella flexneri*, *Infect. Immun.* 74 (2006) 4391-4400.

[23] J. Hill, J. E. Eyles, S. J. Elvin, G. D. Healey, R. A. Lukaszweski, R. W. Titball, *Administration of Antibody to the Lung Protects Mice Against Pneumonic Plague*, *Infect. Immun.* 74 (2006) 3068-3070.

[24] S. J. Elvin, J. E. Eyles, K. A. Howard, E. Ravichandran, S. Somavarappu, H. O. Alpar, E. D. Williamson, *Protection Against Bubonic and Pneumonic Plague with a Single Dose Microencapsulated Sub-Unit Vaccine*, *Vaccine* 24 (2006) 4433-4439.

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO PARA BLOQUEAR A ENTRADA DE PELO MENOS UM SOROTIPO DE *Shigella* EM UMA CÉLULA PERMISSIVA, que compreende pelo menos um dos elementos a seguir:

- um polipeptídeo IpaD ou seu derivado funcional;
- um polinucleotídeo ou seu fragmento funcional que codifica um polipeptídeo IpaD; e/ou
- um anticorpo neutralizante anti-IpaD.

2. COMPOSIÇÃO PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE UMA INFECÇÃO COM *Shigella*, que compreende pelo menos um dos elementos a seguir:

- um polipeptídeo Ipad ou seu derivado funcional;
- um polinucleotídeo ou seu fragmento funcional que codifica um polipeptídeo IpaD; e/ou
- um anticorpo neutralizante anti-IpaD.

3. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2, em que o mencionado polipeptídeo IpaD possui uma sequência de aminoácidos idêntica ou substancialmente similar a SEQ ID N° 1.

4. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2, em que o mencionado polinucleotídeo possui uma sequência de nucleotídeos idêntica ou substancialmente similar a SEQ ID N° 2.

5. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que o anticorpo neutralizante anti-IpaD é policlonal.

6. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que o anticorpo neutralizante anti-IpaD é monoclonal.

7. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, que compreende adicionalmente um antígeno poliosídico.

8. USO, de pelo menos um dos elementos a seguir para bloquear a entrada de pelo menos um sorotipo de *Shigella* em uma célula permissiva, que compreende:

- um polipeptídeo IpaD ou seu derivado funcional;
- um polinucleotídeo ou seu fragmento funcional que codifica um polipeptídeo IpaD; e/ou
- um anticorpo neutralizante anti-IpaD.

9. USO, de pelo menos um dos elementos a seguir para o tratamento e/ou a prevenção de uma infecção de *Shigella*, que compreende:

- um polipeptídeo IpaD ou seu derivado funcional;
- um polinucleotídeo ou seu fragmento funcional que codifica um polipeptídeo IpaD; e/ou
- um anticorpo neutralizante anti-IpaD.

10. USO, de acordo com qualquer das reivindicações 8 ou 9, em que o mencionado polipeptídeo IpaD possui uma sequência de aminoácidos idêntica ou substancialmente similar a SEQ ID N° 1.

11. USO, de acordo com qualquer das reivindicações 8 ou 9, em que o mencionado polipeptídeo possui uma sequência de nucleotídeos idêntica ou substancialmente similar a SEQ ID N° 2.

12. USO, de acordo com qualquer das reivindicações 8 a 11, em que o anticorpo neutralizante anti-IpaD é policlonal.

13. USO, de acordo com qualquer das reivindicações 8 a 11, em que o anticorpo neutralizante anti-IpaD é monoclonal.

14. USO, de acordo com qualquer das reivindicações 8 a 13, que compreende adicionalmente um antígeno poliosídico.

15. KIT DE BLOQUEIO DA ENTRADA, de pelo menos um sorotipo de *Shigella* em uma célula permissiva, que compreende:

- um polipeptídeo IpaD ou seu derivado funcional;

- um polinucleotídeo ou seu fragmento funcional que codifica um polipeptídeo IpaD; e/ou
- um anticorpo neutralizante anti-IpaD.

16. MÉTODO, de tratamento e/ou prevenção de uma infecção de *Shigella* em animais, que compreende a etapa de administração ao mencionado animal de uma composição conforme definido em qualquer das reivindicações 1 a 7.

17. MÉTODO, de bloqueio da entrada de pelo menos um sorotipo de *Shigella* em uma célula permissiva, que compreende a etapa de permissão da formação de um complexo imune por meio de contato de um anticorpo neutralizante anti-IpaD com uma linhagem de *Shigella* capaz de causar infecção à mencionada célula permissiva, em que o mencionado complexo imune evita ou reduz substancialmente a entrada da mencionada linhagem de *Shigella* na célula permissiva.

18. MÉTODO, conforme a reivindicação 17, que consiste de um método *in vivo*.

19. MÉTODO, conforme qualquer das reivindicações 17 ou 18, em que o anticorpo neutralizante anti-IpaD é produzido por um hospedeiro que compreende a mencionada célula permissiva após a administração ao mencionado hospedeiro de um polipeptídeo IpaD ou seu derivado funcional e/ou de um polinucleotídeo ou seu fragmento funcional que codifica um polipeptídeo IpaD.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, em que o mencionado polipeptídeo IpaD possui uma sequência de aminoácidos idêntica ou substancialmente similar a SEQ ID N° 1.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, em que o mencionado polinucleotídeo possui uma sequência de nucleotídeos idêntica ou substancialmente similar a SEQ ID N° 2.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17, em que o anticorpo neutralizante anti-IpaD é fornecido a um hospedeiro que compreende a mencionada célula permissiva por meio de imunização passiva do mencionado hospedeiro.



Fig.1

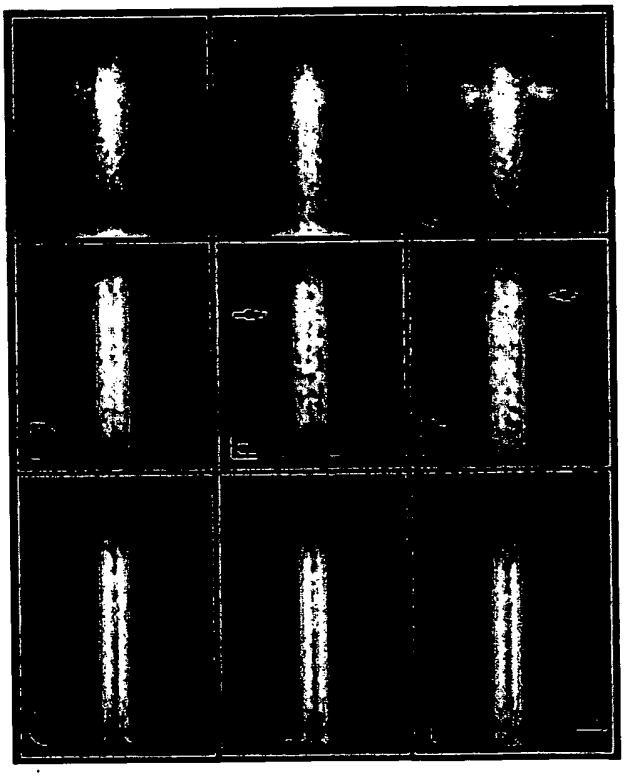


Fig.2

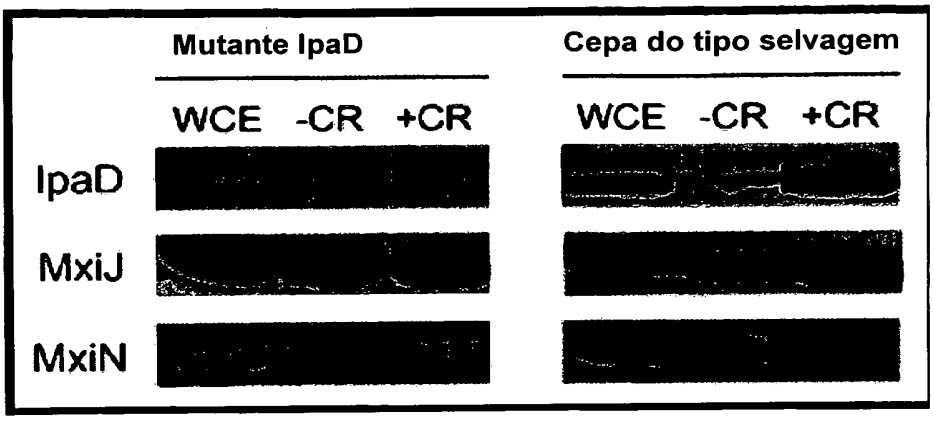

Mutante IpaD
Cepa do tipo selvagem
WCE -CR +CR
WCE -CR +CR
IpaD
MxiJ
MxiN

Fig.3

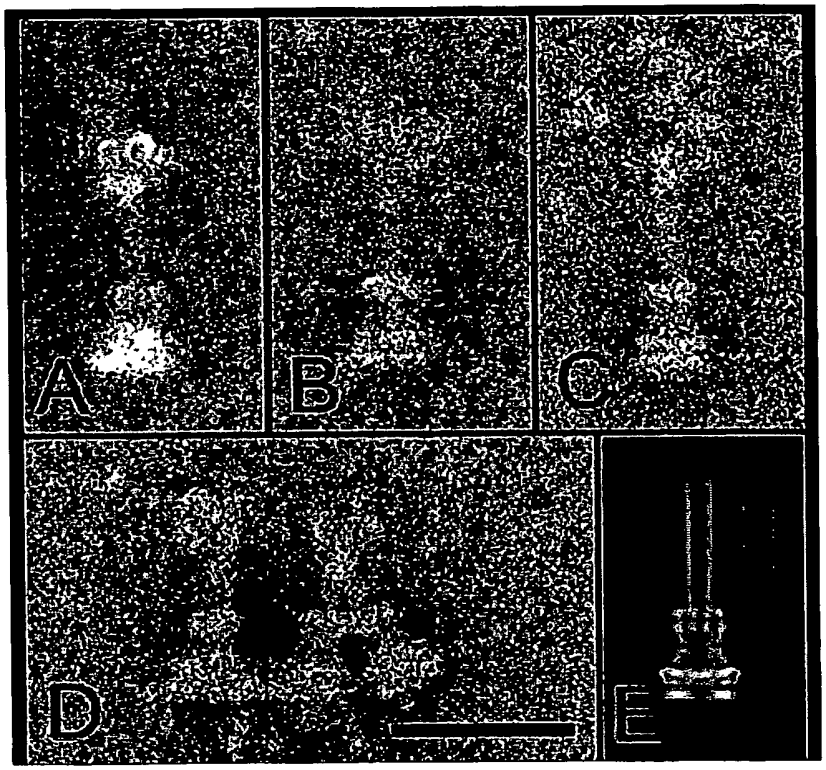

A
B
C
D
E

Fig.4

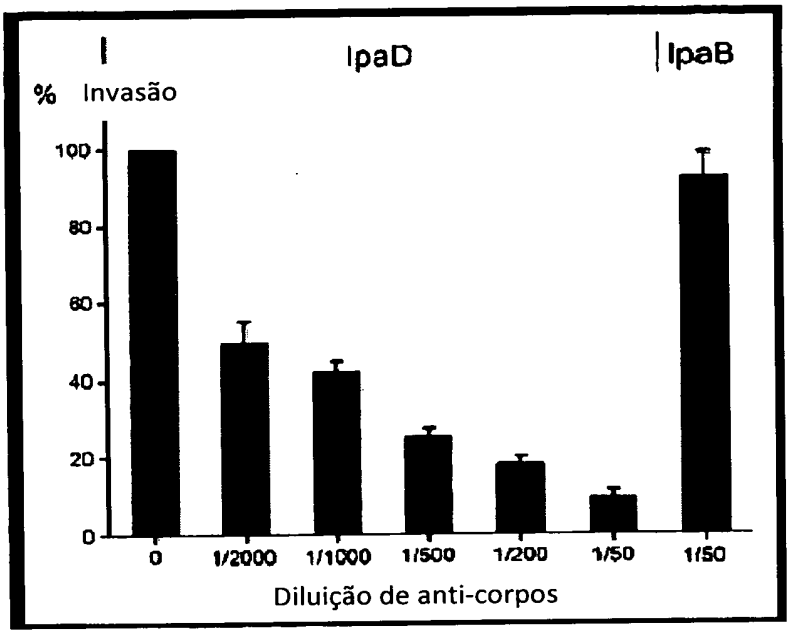

IpaD
IpaB
% Invasão
100
80
60
40
20
0
0
1/2000
1/1000
1/500
1/200
1/50
1/50
Diluição de anti-corpos

Fig.5

```
MNITTLTNSI STSSFSPNNT NGSSTETVNS DIKTTTSSHP VSSLTMLNDT LHNIRTTNQA 60
LKKELSQKTL TKTSLEEIAL HSSQISMDVN KSAQLLDILS RNEYPINKDA RELLHSAPKE 120
AELDGDQMIS HRELWAKIAN SINDINEQYL KVYEHAVSSY TQMYQDFSAV LSSLAGWISP 180
GGNDGNSVKL QVNSLKKALE ELKEKYKDKP LYPANNTVSQ EQANKWLTEL GGTIGKVSQK 240
NGGYVVSINM TPIDNMLKSL DNLGGNGEVV LDNAKYQAWN AGFSAEDETM KNNLQTLVQK 300
YSNANSIFDN LVKVLSSTIS SCTDTDKLFL HF                               332
```

Fig.6

```
   1 tcagaaatgg agaaaaagtt tatctgtatc tgtacatgag cttattgtac tactcaaaac
  61 ctttactaaa ttatcaaaaa tactattggc attactgtat ttttgaacta aagtttgaag
 121 attatttttc attgtttcat cttcggcaga gaatccggca ttccatgcct gatattttgc
 181 attatctagc acaacctcgc catttccacc tagattatct aagcttttta acatattgtc
 241 tattggggtc atgtttatac tgacaacata tcccccgttt ttttgagata ccttgccgat
 301 tgttccacct aattctgtaa gccatttatt tgcttgttcc tgactaacag tattatttgc
 361 tggatatagc ggtttatctt tatatttttc cttgagttct tccaatgcct ttttaagcga
 421 gttgacttgt aatttcacgg agtttccgtc gttacctccg ggagagatcc agccggcaag
 481 actggaaaga acagcgctaa aatcttgata catttgagta tatgaactaa cggcatgttc
 541 atatactttc agatactgtt cattaatatc attgatggag tttgcaattt tagcccacag
 601 ttctctatga gatatcattt gatctccatc aagctcggct tctttcgggg ctgaatgtaa
 661 taattctctt gcgtctttat taattggata ttcgttcctg gaaagaatat ccaatagttg
 721 agcggattta tttacatcca tgctaatctg agatgaatgt aatgctattt cttctagcga
 781 tgttttagtc aacgtttttt gtgaaagctc tttctttaat gcctgatttg ttgttctgat
 841 attatgaagg gtgtcgttga gcatagtaag ggaacttaca ggatgagaac tggtcgttgt
 901 ttttatatca gaattaactg tttcggttga tgaaccgttg gtattgtttg gactgaatga
 961 tgaggtggaa atactattag tcagagttgt tatattcat
```

Fig.7

RESUMO

"COMPOSIÇÃO PARA BLOQUEAR A ENTRADA DE PELO MENOS UM SOROTIPO DE *Shigella* EM UMA CÉLULA PERMISSIVA, COMPOSIÇÃO PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE UMA INFECÇÃO COM *Shigella,* USOS, KIT DE BLOQUEIO DA ENTRADA E MÉTODOS"

A presente invenção refere-se a composições e métodos de bloqueio da entrada de *Shigella* em uma célula de um animal, de forma a fornecer proteção contra infecções de *Shigella* ou reduzir a sua severidade. Mais particularmente, ela se refere ao uso da proteína IpaD obtida de fontes naturais e/ou por meio de síntese ou tecnologia recombinante e seus conjugados para induzir a neutralização de anticorpos que possuem atividade protetora contra vários sorotipos de *Shigella*, particularmente *S. flexneri*. A composição de acordo com a presente invenção é útil para evitar e/ou tratar shigellose causada por uma bactéria da família de *Shigella*.