

(11) Número de Publicação: **PT 1068522 E**

(51) Classificação Internacional:

G01N 30/02 (2007.10) **C07K 14/205** (2007.10)
C12N 15/00 (2007.10) **C07K 16/12** (2007.10)
A61K 39/00 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **1999.04.07**

(30) Prioridade(s): **1998.04.08 GB 9807721**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.01.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.03.26**
108/2009

(73) Titular(es):

NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS
S.R.L.

VIA FIORENTINA 1 53100 SIENA SI IT

(72) Inventor(es):

GUIDO GRANDI IT

(74) Mandatário:

FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE
ATAYDE

AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROTEÍNA NAP DE HELICOBACTER PYLORI**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

<u>EPÍGRAFE:</u>	<u>"Proteína NAP de <i>Helicobacter Pylori</i>"</u>
------------------	--

Este invento relaciona-se com a proteína NAP de *Helicobacter pylori*.

Antecedentes do invento

Helicobacter pylori é uma bactéria espiralada gram-negativa que infecta o estômago humano. Crê-se que mais do que 50% da população mundial seja portadora desta bactéria.

Os isolados clínicos de *H. pylori* podem ser caracterizados pela expressão de uma citotoxina vacuolizante (VacA), a qual induz a formação de vacúolos nas células epiteliais, e de um antigénio imunodominante associado à citotoxina (CagA). As estirpes de tipo I, que predominam nos pacientes com úlceras ou cancro, expressam ambas as proteínas, enquanto que as estirpes de tipo II não expressam nenhuma delas.

Foram já descritas diversas proteínas antigénicas de *H. pylori* [p.ex., referências 1 e 2], incluindo a sua urease, VacA, proteínas flagelares e adesinas. Uma proteína conhecida como NAP (proteína activadora dos neutrófilos [3,4]), que é encontrada tanto nas estirpes de tipo I como nas de tipo II, parece ser protectora quando testada no modelo de *H. pylori* no rato [5].

A NAP é um homodecâmero com subunidades de 15 kDa [6], e tem sido proposto que o complexo multimérico possui uma estrutura em forma de anel que forma espontaneamente estruturas paracristalinas hexagonais. A proteína completa parece interagir com os receptores de glicosfingolípido dos neutrófilos humanos [7].

Tomando como base a sua homologia com as bacterioferritinas, sugeriu-se que a NAP possa actuar como um tampão para o ferro [3]. No entanto, até ao presente não foi detectada a presença de ferro ou do grupo heme. A proteína tem ainda sido referida como um antitransportador de Na^+/H^+ [8].

Tal como o seu nome sugere, a NAP promove a activação e a adesão dos neutrófilos às células endoteliais. Apesar de se ter já sugerido que esta função não está provavelmente relacionada com a sua função intracelular [3], a actividade proadesiva pode ser neutralizada por um antisoro [6]. Uma vez que a activação dos neutrófilos e a adesão às células endoteliais constituem mecanismos de inflamação, e uma vez que *H. pylori* é responsável pela inflamação do estômago, parece provável que a NAP represente um factor, ou o factor, de *H. pylori* que é responsável pela inflamação, provavelmente num estágio precoce da úlcera gástrica em que se observa uma acumulação abundante de neutrófilos na mucosa gástrica superficial.

Foi já descrito um protocolo para a purificação do decâmero de NAP a partir de *H. pylori* [6], envolvendo cromatografia em agarose, filtragem molecular e cromatografia de troca iónica. Este protocolo proporcionou um rendimento de 72%. Foi também proposta a produção recombinante de NAP em *E. coli* [7]. O gene foi clonado no plasmídeo pTrxFus para produzir uma proteína de fusão com a tioredoxina. A proteína foi então purificada do mesmo modo que a proteína nativa. Foi referido que a tioredoxina N-terminal não afectava a actividade biológica da NAP.

Verifica-se ainda neste campo técnico, no entanto, a necessidade de produzir NAP pura sem a presença de artefactos de clonagem, domínios de fusão ou semelhantes. Constitui, deste modo, um objectivo do invento o fornecimento de um processo para a purificação de NAP nativa. Constitui um objectivo adicional do invento que este processo seja simples,

facilmente transposto para uma escala de fabrico e economicamente viável. Constitui ainda um objectivo deste invento o fornecimento de uma proteína com elevado grau de pureza.

Verificou-se no âmbito deste invento que a NAP tem uma solubilidade surpreendentemente elevada em meio aquoso, permanecendo solúvel mesmo com uma saturação de 80% em sulfato de amónio.

Descrição do invento

De acordo com o presente invento, é fornecido um processo para o enriquecimento da presença da NAP de *H. pylori* numa mistura de proteínas, compreendendo o passo de efectuar o salting-out das outras proteínas.

O passo de salting-out deixa a maior parte da NAP na forma solúvel. Se bem que se possa usar qualquer sal adequado, é preferido o uso de sulfato de amónio. A concentração final de sal é de 50% de saturação ou mais (p.ex., 60%, 70%, 80% ou mais). O passo de salting-out preferencialmente precipita pelo menos 50% das proteínas presentes na mistura (p.ex., 60%, 70%, 80% ou mais). O salting-out de sonicados de *H. pylori* é descrito na referência 11.

Devido à solubilidade surpreendentemente elevada da NAP, este passo de salting-out remove só por si a maioria das proteínas, enriquecendo consideravelmente a presença de NAP.

A mistura resultante de proteínas solúveis, enriquecida em NAP, é então submetida a um enriquecimento adicional. É no entanto preferida a clarificação inicial da mistura, de modo a remover o material precipitado durante o passo de salting-out. Tal é tipicamente conseguido por filtração ou, preferencialmente, por centrifugação.

O enriquecimento adicional utiliza a cromatografia de quelatos metálicos [9]. Poderá utilizar-se qualquer ião

metálico imobilizado adequado (p.ex., zinco, cobalto, cobre), mas é preferido o níquel.

Por "purificação" pretende-se indicar que a NAP forma pelo menos 75% (em peso) da mistura resultante (p.ex., 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% ou mais).

A mistura de proteínas poderá corresponder a qualquer fonte adequada da proteína NAP. Os exemplos incluem as próprias bactérias de *H. pylori*, ou outros hospedeiros que expressem o gene que codifica para a NAP de *H. pylori* (tal como bactérias transformadas). Estas são preferencialmente submetidas a lise ou a destruição de membranas celulares antes do enriquecimento/purificação de NAP de modo a possibilitar o acesso aos seus componentes citoplásmicos (p.ex., por sonicação, prensa francesa, prensa de Hughes, lise enzimática, trituração, congelação/descongelação, etc.).

As condições e reagentes preferidos para colocar em prática os processos do invento são os apresentados nos Exemplos abaixo (p.ex., estirpes bacterianas, vectores, enzimas de restrição, meios de cultura, temperaturas, tampões, métodos analíticos, etc.). Por exemplo, de modo a remover os componentes de baixo peso molecular, é preferida a inclusão de pelo menos um passo de diálise durante o processo de enriquecimento/purificação.

A NAP poderá possuir a mesma sequência que a NAP que ocorre naturalmente em *H. pylori*, isenta de sequências de aminoácidos que são tipicamente introduzidas durante o processo de recombinação ou de expressão recombinante (por exemplo, marcadores de poli-histidina, fusões com tioredoxina, fusões com GST, sequências inteína-terminais, etc.).

De acordo com o invento, é ainda fornecido um processo para a preparação de um agente para diagnóstico ou de um agente terapêutico (p.ex., uma composição imunogénica ou vacina), compreendendo o enriquecimento/purificação da NAP tal como acima se descreve, seguindo-se uma formulação adequada.

Para os agentes a administrar a animais, por exemplo, tal poderá envolver a formulação da NAP num tampão fisiologicamente aceitável. Para uma composição imunogénica ou vacina tal poderá incluir a adição de um adjuvante, por exemplo. Para um agente para diagnóstico, o processo poderá envolver a adição de um marcador detectável à NAP (p.ex., um marcador radioactivo ou fluorescente). Estes passos de formulação encontram-se facilmente ao alcance de um perito neste campo técnico.

Em formas de realização preferidas, os agentes para diagnóstico ou terapêutica preparados através do invento compreendem proteínas ou antigénios adicionais de *H. pylori*. Por exemplo, as composições poderão compreender VacA (citotoxina vacuolizante) e/ou CagA (antigénio associado a citotoxina) e/ou proteínas de urease para além da NAP.

As vacinas poderão ser profilácticas (i.e., para prevenção da infecção) ou terapêuticas (i.e., para o tratamento da doença após a infecção).

Estas vacinas compreendem um antigénio ou vários antigénios, usualmente em combinação com "transportadores farmacologicamente aceitáveis", os quais incluem qualquer molécula que por si mesma não induz a produção de anticorpos prejudiciais para o indivíduo que recebe a composição. Os transportadores adequados são tipicamente macromoléculas grandes e de metabolização lenta, tais como proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos (tais como gotículas de óleo ou lipossomas), e partículas de vírus inactivas. Tais transportadores são bem conhecidos dos técnicos de perícia média. Adicionalmente, estes transportadores poderão funcionar como agentes imunoestimulantes ("adjuvantes"). Ainda, o antigénio poderá ser conjugado com um toxóide bacteriano.

Os adjuvantes preferidos para aumentar a eficácia da composição incluem, sem limitação: (1) sais de alumínio (alum) tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, etc.; (2) formulações de emulsão óleo-em-água (com ou sem outros agentes imunoestimuladores específicos tais como muramil-péptidos ou componentes da parede celular bacteriana), tais como, por exemplo, (a) MF59™ (WO 90/14837), contendo 5% de esqualeno, 0,5% de Tween™ 80 e 0,5% de Span 85 (contendo opcionalmente quantidades diversas de MTP-PE, se bem que tal não seja necessário), formulado em partículas submicrónicas por meio de um microfluidificador, (b) SAF, contendo 10% de esqualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado por plurónico, e thr-MDP (ver abaixo), microfluidizado até uma emulsão submicrónica ou vortexado para gerar uma emulsão com partículas de maior tamanho, e (c) sistema adjuvante RIBI™ (RAS) contendo 2% de esqualeno, 0,2% de Tween 80 e um ou mais componentes da parede celular bacteriana pertencentes ao grupo que consiste em monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trealose (TDM) e esqueleto da parede celular (CWS), preferencialmente MPL+CWS (Detox™); (3) poderão usar-se adjuvantes de saponinas, tal como o Stimulon™, ou partículas criadas a partir destes, tal como os ISCOMS (complexos imunoestimuladores); (4) Adjuvante Completo de Freund e Adjuvante Incompleto de Freund (CFA e IFA); (5) citocinas, tais como interleucinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferões (p.ex., IFN γ), factor estimulador de colónias de macrófagos (M-CSF), factor de necrose de tumor (TNF), etc.; e (6) outras substâncias que actuam como agentes imunoestimuladores para aumentar a eficácia da composição. São preferidos o alum e o MF59™.

Tal como acima se mencionou, os muramilpéptidos incluem, mas não se limitam a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-

isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glycero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

As composições imunogénicas (p.ex., o antigénio, o transportador farmacologicamente aceitável e o adjuvante) conterão tipicamente diluentes, tais como água, soro fisiológico, glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, poderão estar presentes nestes veículos substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsificantes, substâncias tamponantes de pH e semelhantes.

Tipicamente, as composições de vacina são preparadas sob a forma de injectáveis, como soluções ou suspensões líquidas; poderão igualmente preparar-se formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em veículos líquidos antes da injeção. A preparação poderá igualmente ser emulsificada ou encapsulada em lipossomas para proporcionar um efeito adjuvante intensificado, tal como acima referido.

As composições imunogénicas usadas como vacinas compreendem uma quantidade imunologicamente eficaz dos polipéptidos antigénicos, assim como qualquer outro dos componentes acima mencionados, segundo necessário. Por "quantidade imunologicamente eficaz" pretende-se significar que a administração desta quantidade a um indivíduo, em dose única ou como parte de uma série de doses, é eficaz para fins de tratamento ou prevenção. A quantidade necessária variará, dependendo do estado de saúde ou da condição física do indivíduo a ser tratado, do grupo taxonómico do indivíduo a tratar (p.ex., primata não humano, primata, etc.), da capacidade de síntese de anticorpos evidenciada pelo sistema imune do indivíduo, do grau de protecção desejado, da formulação da vacina, da avaliação da situação médica por parte do clínico, entre outros factores relevantes. Espera-se que esta quantidade caia num intervalo relativamente largo que poderá ser determinado através de ensaios de rotina.

As composições imunogénicas são convencionalmente administradas por via parentérica, p.ex. por injeção subcutânea ou intramuscular. Estas composições podem também ser administradas à superfície de mucosas (p.ex., por via oral ou intranasal) ou sob a forma de formulações pulmonares, supositórios ou aplicações transdérmicas. A dosagem de tratamento poderá ser administrada num regime de dose única ou de doses múltiplas. A vacina poderá ser administrada em associação a outros agentes imunoreguladores.

A NAP enriquecida segundo o invento poderá ainda ser usada em imunoensaios para detecção dos níveis de anticorpos (ou, inversamente, poderão usar-se anticorpos anti-NAP para detecção dos níveis de antigénio). Poderão desenvolver-se imunoensaios baseados em antigénios recombinantes bem definidos para substituir os métodos de diagnóstico invasivos. Poderão detectar-se anticorpos contra a NAP em amostras biológicas, incluindo, por exemplo, amostras de sangue ou soro. A concepção dos imunoensaios é susceptível de um elevado grau de variação, sendo já conhecidos da técnica diversos tipos de imunoensaio. Os protocolos de imunoensaio poderão basear-se, por exemplo, em competição, ou em reacção directa, ou em ensaios de tipo sanduíche. Os protocolos poderão também, por exemplo, usar suportes sólidos ou recorrer a imunoprecipitação. A maioria dos ensaios utiliza um anticorpo ou um polipéptido marcado; os marcadores poderão ser, por exemplo, fluorescentes, quimioluminescentes, radioactivos ou corantes. São também conhecidos ensaios que amplificam os sinais da sonda; como exemplos destes encontram-se os ensaios que utilizam biotina e avidina, e os imunoensaios mediados e marcados por enzimas, tais como os ensaios de ELISA.

Descrição dos esquemas

A Figura 1 apresenta a sequência completa do gene que codifica para a NAP na estirpe CCUG, o qual foi clonado no

plasmídeo pSM214G para produzir o pSM214-NAP. A Figura apresenta ainda a sequência do vector plasmídico que flanqueia a extremidade 5' do gene (letras minúsculas) e a sequência de aminoácidos deduzida.

A Figura 2 mostra uma comparação entre a sequência nucleotídica da NAP clonada e as sequências das referências 6 e 8. Podem detectar-se diferenças que resultam na diferença de aminoácidos (Figura 3) a nível dos resíduos 8, 58 e 80 (em comparação com a referência 6) e dos resíduos 8, 73, 97, 101 e 140 (em comparação com a referência 8, deduzida a partir da sequência genómica completa).

A Figura 4 apresenta os resultados do SDS-PAGE (A) e do Western Blot (B) das proteínas celulares totais de *E. coli*. Carreira 1: extracto total das células transformadas; carreira 2: controlos negativos; carreira 3: marcadores de baixo PM.

A Figura 5 apresenta a coloração por Ponceau (A) e o Western Blot (B) do microorganismo *E. coli* transformado. Carreira 1: extracto solúvel; carreira 2: extracto insolúvel; carreira 3: marcadores de baixo PM.

A Figura 6 apresenta a coloração por Ponceau (A) e o Western Blot (B) do microorganismo *B. subtilis* transformado. Carreiras 1 e 2: estirpe SMS118, extractos solúveis e insolúveis, respectivamente; carreiras 3 e 4: estirpe SMS300, extractos solúveis e insolúveis, respectivamente; carreira 5: controlo negativo (*B. subtilis* transformado com pSM214 sem o fragmento inserido de NAP).

A Figura 7 ilustra o efeito do salting-out com sulfato de amónio. Carreiras 1 e 2: saturação a 60%, pellet e sobrenadante (de *E. coli*), respectivamente; carreiras 3 e 4: saturação aumentada de 60% para 80% (pellet e sobrenadante, respectivamente); carreira 5: NAP purificada; carreira 6: marcadores.

A Figura 8 apresenta a pureza do produto de NAP final. As carreiras 1-3 contêm material purificado a partir de *E. coli*;

as carreiras 5-7 contêm material purificado a partir de *B. subtilis* (SMS118). Da esquerda para a direita, estas carreiras contêm 1 µg, 2 µg e 3 µg de proteína, respectivamente. As carreiras 5 e 8 são marcadores.

Exemplos

A colocação em prática do presente invento utilizará, a não ser que de outro modo indicado, técnicas convencionais de biologia molecular, microbiologia, DNA recombinante e imunologia, as quais são bem conhecidas neste campo técnico. Tais técnicas encontram-se descritas em detalhe na literatura; p.ex., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Ed. (Sambrook, 1989); *DNA Cloning*, Volumes I e II (ed. Glover, 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (ed. Gait, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (eds. Hames & Higgins, 1984); *Transcription and Translation* (eds. Hames & Higgins, 1984); *Animal Cell Culture* (ed. Freshney, 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (Perbal, 1984); a série *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.), especialmente os volumes 154 e 155; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (eds. Miller e Calos, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (eds. Mayer e Walker, 1987); *Protein Purification: Principles and Practice* (Scopes, 1987); *Handbook of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (eds. Weir e Blackwell, 1986).

Clonagem do gene que codifica para a NAP

O gene apresentado na Figura 1 foi amplificado a partir do cromossoma CCUG utilizando os seguintes primers de PCR, os quais introduziram ainda locais de restrição para *SacI* e *HindIII*:

5'-ctcgagctctagaggggtattaataatgaaaacattgaat-3'
5'-cccttaagcttttaagccaaatgagcttc-3'.

O produto de amplificação foi digerido com *SacI* e *HindIII* e ligado ao plasmídeo pSM214G [10] que havia sido digerido com estas mesmas duas enzimas. Este plasmídeo é um vector de expressão de vai-vem entre *E. coli* e *B. subtilis*. Tal como se pode ver na Figura 1, o gene recombinante é expresso sob o controlo de um promotor constitutivo e de um local de ligação ao ribossoma, os quais funcionam tanto em *E. coli* como em *B. subtilis*.

O plasmídeo ligado foi usado para transformar *E. coli* e os clones positivos foram seleccionados em placas de cloranfenicol. Foi isolado e caracterizado um plasmídeo a partir de um clone positivo ("pSM214-NAP"). Armazenaram-se lotes deste clone em glicerol a -80°C.

Adicionalmente, o plasmídeo foi usado para transformar *B. subtilis*, procedendo-se também à sua armazenagem em lotes de glicerol a -80°C.

Análise preliminar da expressão

Inocularam-se colónias isoladas de estirpes transformadas de *E. coli* ou de *B. subtilis* em 4 ml de meio LB-CAP (i.e., meio LB + cloranfenicol a 20 µg/ml), deixando-se em cultura durante 14 horas a 37°C. Foram cultivadas estirpes de controlo contendo o vector de transformação sem o fragmento inserido de NAP.

As culturas de *E. coli* foram recolhidas e ressuspensas em tampão de carga de amostras para SDS-PAGE. As culturas de *B. subtilis* foram recolhidas, tratadas com lisozima a 0,3 mg/ml (30 minutos, 37°C) e adicionou-se então 3 x tampão de carga de amostras para SDS-PAGE. As amostras foram incubadas durante 5 minutos a 95°C e separadas por SDS-PAGE, após o que as

proteínas foram analisadas por coloração com azul de Coomassie e Western Blot. O blot foi visualizado recorrendo a um antisoro obtido por imunização de um coelho com um produto de fusão NAP-tioredoxina (Figura 4).

As bactérias transformadas expressam claramente uma proteína de 15 kDa que não se encontra presente nas estirpes não transformadas, tal como evidencia o antisoro de coelho.

Cultura celular e lise das células

Inocularam-se colónias isoladas de *E. coli* ou de *B. subtilis* transformadas em 5 ml de LB-CAP, incubando-se o meio a 37°C durante 10 horas. As culturas de 5 ml foram então usadas para inocular frascos de 2 litros contendo 500 ml de LB-CAP. Após uma incubação de 14 horas a 37°C num agitador rotativo (250 ciclos/min), as células foram recolhidas por centrifugação a 6000 g durante 20 minutos a 4°C. Os pellets celulares foram lisados por sonicação ou usando uma prensa francesa.

Para a sonicação, os pellets foram ressuspensos em 8 ml de tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8) suplementado com lisozima a 0,3 mg/ml. Após incubação em gelo (10 minutos) e depois a 37°C (7 minutos), adicionaram-se 35 µl de uma solução a 2 mg/ml de DNase I (Sigma D-4263). As amostras foram colocadas em gelo e extensamente sonicadas até ao desaparecimento da viscosidade (sonicador Branson 450, ponta média, ciclo de trabalho 50, controlo de output 5, aproximadamente 25 ciclos x 2 minutos com 1 minuto de sonicação/1 minuto em gelo). Perfez-se um volume de 14 ml de lisado adicionando tampão A, centrifugando-se então a 20000 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante (extracto total solúvel) e os pellets (extracto total insolúvel) foram separados e usados de imediato ou armazenados a -20°C.

Para a destruição das membranas celulares, com prensa francesa, as células foram ressuspensas em 15 ml de tampão A e

lisadas com três passagens pela prensa. As proteínas solúveis foram recolhidas por centrifugação a 12000 g durante 30 minutos a 4°C e perpez-se um volume de 28 ml do sobrenadante com tampão A.

A análise por SDS-PAGE dos extractos totais solúveis e insolúveis (Figuras 5 e 6) mostra que o soro anti-NAP reage apenas com a fracção solúvel, o que indica que a NAP é completamente solúvel no tampão A.

Purificação da proteína

As proteínas totais solúveis de *B. subtilis* foram diluídas com tampão A para fornecer uma concentração de proteínas totais de 8 mg/ml (Bradford). Adicionou-se sulfato de amónio até uma concentração final de 60% de saturação e o processo de salting-out foi deixado a decorrer durante 12 horas a 4°C com agitação suave. As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação a 12000 g durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi dialisado durante 12 horas contra o tampão A.

A solução dialisada foi carregada sobre uma coluna FF de sefarose quelante activada por níquel (1 x 8 cm) equilibrada com tampão A. A coluna foi lavada com tampão A + NaCl 200 mM. A eluição da proteína foi efectuada usando 46 ml de um gradiente linear de imidazol 0-40 mM, seguindo-se 10 ml de um segundo gradiente de imidazol 40-100 mM (taxa de fluxo 0,5 ml/min). A eluição prosseguiu então com 25 ml de imidazol 100 mM.

As fracções foram analisadas por SDS-PAGE, e as fracções que continham NAP foram reunidas num pool e dialisadas contra tampão PBS (pH 7-7,5).

A NAP foi purificada a partir de *E. coli* pelo mesmo processo, com a diferença de que o procedimento de salting-out usou uma saturação de 80%.

Pureza

A partir de 1 litro de cultura, os resultados das purificações foram:

Bactéria	NAP (mg)	Pureza (SDS-PAGE)
<i>B. subtilis</i>	10	90%
<i>E. coli</i>	30	95%

Uma indicação da pureza, através de coloração por azul de Coomassie, é apresentada na Figura 8. O material proveniente de *E. coli* parece ser ligeiramente mais puro. É estimado um rendimento de 80% por análise densitométrica.

Salting-out

A NAP parece manter-se solúvel mesmo utilizando concentrações muito elevadas de sulfato de amónio. Tal como mostra a Figura 7, a NAP permanece solúvel mesmo com uma saturação de 80%. A carreira 4 do gel mostra que o processo de salting-out só por si confere um elevado grau de purificação.

Estrutura multimérica

A capacidade evidenciada pela NAP purificada de se estruturar numa forma multimérica foi investigada recorrendo a cromatografia de exclusão por dimensões (não redutora, não desnaturante). A NAP foi carregada sobre uma coluna de Sefarose 12 HR 10/30 equilibrada com tampão (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,8) e eluída a um fluxo de 0,5 ml/min. Independentemente da fonte de NAP, a proteína foi eluída num único pico possuindo o mesmo tempo de retenção que a álcool desidrogenase de levedura (PM 150 kDa), indicando uma estrutura decaamérica [6].

Sequência N-terminal

A sequenciação N-terminal da NAP purificada foi efectuada usando um sequenciador de proteínas Beckmann LF 3000 equipado com análise on-line por RP-HPLC dos aminoácidos PTH. Os 10 aminoácidos sequenciados eram idênticos aos deduzidos a partir da sequência genética apresentada na Figura 1.

Comparação com a proteína nativa

Recolheram-se células CCUG de *H. pylori* da superfície de placas de agar de sangue, sendo estas células lavadas em PBS gelado e ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2,5 mM, lisozima 0,3 mg/ml, pH 7,8). A suspensão celular foi incubada a 37°C durante 20 minutos, sonicada e centrifugada a 20000 g durante 40 minutos. O sobrenadante (proteínas solúveis) foi armazenado a -20°C até próxima utilização.

O tempo de retenção em cromatografia de filtração em gel da NAP purificada a partir de *E. coli* ou de *B. subtilis* foi idêntico ao do extracto de proteínas solúveis de *H. pylori*.

Deverá ter-se em conta que a descrição do invento acima apresentada é meramente exemplificativa e que se poderão introduzir diversas modificações sem que se abandone o âmbito do invento.

Referências

1. Telford JL, Covacci A, Rappuoli R, Ghiara P (1997) Immunobiology of Helicobacter pylori infection. Curr Opin Immunol 9:498-503.
2. Telford JL, Covacci A, Ghiara P, Montecucco C, Rappuoli R (1994) Unravelling the pathogenic role of Helicobacter pylori in peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. TIBTECH 12:420-426.
3. Evans DJ, Evans DG, Lampert HC, Nakano H (1995) Identification of four new prokaryotic bacterioferritins, from

Helicobacter pylori, *Anabaena variabilis*, *Bacillus subtilis* and *Treponema pallidum* by analysis of gene sequences. *Gene* 153:123-127.

4. WO96/0127 & WO96/01273 especialmente SEQ ID NO:6; ver também WO97/25429.

5. Marchetti M, Aricò B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P (1995) Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267:1655-1658.

6. Evans DJ, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, Granger DN, Kviety PR (1995) Characterization of a *Helicobacter pylori* Neutrophil-Activating Protein. *Infect Immun* 63(b):2213-2220.

7. Teneberg S, Miller-Podraza H, Lampert HC, Evans DJ, Evans DG, Danielsson D, Karlsson K-A (1997) Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 272:19067-19071.

8. Tomb J-F et al. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539-547.

9. Sulkowski E (1985) Purification of proteins by IMAC. *TIBTECH* 3:1-7.

10. Um derivado de pSM214 - Bellini et al., *J.Biotechnol*, 18:177-192 - no qual o gene Amp foi substituído por um local múltiplo de clonagem.

11. Nielsen & Andersen (1992) *Gut* 33:738-742.

Lisboa, 28 de Maio de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Um processo para o enriquecimento da presença da NAP de *H. pylori* numa mistura de proteínas, caracterizado por compreender os passos de salting-out e de cromatografia de quelatos metálicos, sendo a concentração final de sal, no passo de salting-out, de, pelo menos, 50% de saturação.

2. Um processo, de acordo com a Reivindicação N.º.1, caracterizado por o dito metal ser o níquel.

3. Um processo, de acordo com qualquer das Reivindicações precedentes, caracterizado por a dita NAP ser produzida por um hospedeiro recombinante, e possuindo, a dita NAP, a mesma sequência que a NAP que ocorre naturalmente em *H. pylori*.

4. Um processo para a preparação de um agente para diagnóstico ou terapêutica, caracterizado por compreender: (i) o enriquecimento da NAP de *H. pylori* através do processo, de acordo com qualquer das Reivindicações precedentes; e (ii) a formulação da NAP enriquecida de modo a fornecer o agente.

5. O processo, de acordo com a Reivindicação N.º.4, caracterizado por o agente ser uma composição imunogénica ou vacina.

6. O processo, de acordo com a Reivindicação N.º.4, caracterizado por o passo (ii) envolver a formulação da NAP num tampão fisiologicamente aceitável.

7. O processo, de acordo com a Reivindicação N.º.5, caracterizado por o passo (ii) envolver a adição de um adjuvante.

8. O processo, de acordo com a Reivindicação N.º.4, caracterizado por o passo (ii) envolver a adição de um marcador detectável para a NAP.

Lisboa, 28 de Maio de 2009

FIG. 1

Promotor SacI RBS

ttttatgtataatagattcataaatttgagagctctagaggggtattaataATGAAAACA
MetLysThr

TTTGAAATTTTAAGACATTTGCCAAGCGGATCCGATCGTGTGTTTATGAAAGTGCATAAC
PheGluIleLeuArgHisLeuGlnAlaAspAlaIleValLeuPheMetLysValHisAsn

TTCCATTGGAATGTGAAAGGCACCGATTTTTC AATGTCATAAAGCCACTGAAGAAATT
PheHisTrpAsnValLysGlyThrAspPhePheAsnValHisLysAlaThrGluGluIle

TATGAAGAGTTTGC GGACATGTTTGATGATCTCGCTGAAAGGATCGTTCAATTAGGACAC
TyrGluGluPheAlaAspMetPheAspAspLeuAlaGluArgIleValGlnLeuGlyHis

CACCCCTTAGTGACTTTATCTGAAGCACTCAAACTCACTCGGTGAAAGAAAGAACTAAA
HisProLeuValThrLeuSerGluAlaLeuLysLeuThrArgValLysGluGluThrLys

ACGAGCTTCCACTCTAAAGACATCTTTAAAGAATACTTAGGCGATTACAAACACCTAGAA
 ThrSerPheHisSerLysAspIlePheLysGluIleLeuGlyAspTyrLysHisLeuGlu

AAAGAAATTAAAGAGCTTCTAACACTGCTGAAAAGAAGCGGATAAAGTCACCCGTAACCT
 LysGluPheLysGluLeuSerAsnThrAlaGluLysGluGlyAspLysValThrValThr

TATGCGACGATCAATTGGCCAAGTTGCAAAATCCATTTGGATGCTAGAAGCTCATTTG
 TyrAlaAspAspGlnLeuAlaLysLeuGlnLysSerIleTrpMetLeuGluAlaHisLeu

GCTtaaagctt
 AlaEnd HindIII

FIG. 1 (CONTD.)

SEQ ID 1	1	ATGAAAACA	TTTGA	ATTTAAAG	ACATTTGG	CAAGCGG	GATGCC	GATCG	GTGT	TTAT	PGAAA																
EVANS	1	ATGAAAACA	TTTGA	ATTTAA	ACATTTGG	CAAGCGG	GATGCC	GATCG	GTGT	TTAT	PGAAA																
GENOMA	1	ATGAAAACA	TTTGA	ATTTAA	ACATTTGG	CAAGCGG	GATGCC	GATCG	GTGT	TTAT	PGAAA																
SEQ ID 1	61	GTGCATA	AAC	TTCCAT	TTGGA	ATGTGA	AAAGG	CACC	GA	TTTT	TTCAAT	GTGCA	FAA	AGCC	ACT												
EVANS	61	GTGCATA	AAC	TTTCA	TTGGA	ATGTGA	AAAGG	CACC	GA	TTTT	TTCAAT	GTGCA	FAA	AGCC	ACT												
GENOMA	61	GTGCATA	AAC	TTTCA	TTGGA	ATGTGA	AAAGG	CACC	GA	TTTT	TTCAAT	GTGCA	FAA	AGCC	ACT												
SEQ ID 1	121	GAA	GAAA	TTT	TATGA	AGAG	TTTTG	CGG	AC	ATG	TGAT	CTC	GG	CT	GAA	AGG	AT	CG	TT	CAA							
EVANS	121	GAA	GAAA	TTT	TATGA	AGAG	TTTTG	CGG	AC	ATG	TGAT	CTC	GG	CT	GAA	AGG	AT	CG	TT	CAA							
GENOMA	121	GAA	GAAA	TTT	TATGA	AGAG	TTTTG	CGG	AC	ATG	TGAT	CTC	GG	CT	GAA	AGG	AT	CG	TT	CAA							
SEQ ID 1	181	TTAGG	AC	AC	CC	CT	TAG	TG	ACT	TTA	CTG	AA	GC	ACT	CA	AA	ACT	CA	CT	CA	CT	CA	AA	GA			
EVANS	181	TTAGG	AC	AC	CC	CT	TAG	TG	ACT	TTA	CTG	AA	GC	ACT	CA	AA	ACT	CA	CT	CA	CT	CA	AA	GA			
GENOMA	181	TTAGG	AC	AC	CC	CT	TAG	TG	ACT	TTA	CTG	AA	GC	ACT	CA	AA	ACT	CA	CT	CA	CT	CA	AA	GA			
SEQ ID 1	241	GAA	ACT	AAA	AC	GAG	CTT	CC	ACT	CTA	AA	GACA	TCT	TT	AAA	GAAA	TT	CT	AG	CC	GA	TT	AC	AAA			
EVANS	241	GAA	ACT	AAA	AC	GAG	CTT	CC	ACT	CTA	AA	GACA	TCT	TT	AAA	GAAA	TT	CT	AG	CC	GA	TT	AC	AAA			
GENOMA	241	GAA	ACT	AAA	AC	GAG	CTT	CC	ACT	CTA	AA	GACA	TCT	TT	AAA	GAAA	TT	CT	AG	CC	GA	TT	AC	AAA			
SEQ ID 1	301	CAC	CTA	GAA	AA	AGAA	TTT	AA	GAG	CTT	CTA	AA	CA	CT	G	TA	AA	AG	AA	AG	AA	AG	AA	AG	GC		
EVANS	301	CAC	CTA	GAA	AA	AGAA	TTT	AA	GAG	CTT	CTA	AA	CA	CT	G	TA	AA	AG	AA	AG	AA	AG	AA	AG	GC		
GENOMA	301	CAC	CTA	GAA	AA	AGAA	TTT	AA	GAG	CTT	CTA	AA	CA	CT	G	TA	AA	AG	AA	AG	AA	AG	AA	AG	GC		
SEQ ID 1	361	ACC	GTA	ACT	TAT	GCG	GAC	CG	AT	CA	AT	TGG	CCA	AG	TTG	CA	AAA	AA	AT	CC	AT	TT	GG	AT	GC	TAG	AA
EVANS	361	ACC	GTA	ACT	TAT	GCG	GAC	CG	AT	CA	AT	TGG	CCA	AG	TTG	CA	AAA	AA	AT	CC	AT	TT	GG	AT	GC	TAG	AA
GENOMA	361	ACC	GTA	ACT	TAT	GCG	GAC	CG	AT	CA	AT	TGG	CCA	AG	TTG	CA	AAA	AA	AT	CC	AT	TT	GG	AT	GC	TAG	AA
SEQ ID 1	421	GCT	CA	TTT	GG	CT	TAA																				
EVANS	421	GCT	CA	TTT	GG	CT	TAA																				
GENOMA	421	GCT	CA	TTT	GG	CT	TAA																				

FIG. 2

FIG. 3

SEQ ID 2	1	MKTFEILRHHLQADAIVLFMKVHNPFHWNVVKGTDFFNVHKATEEIIYEEFADMFDDLAERI VQ
EVANS	1	MKTFEILKHHLQADAIVLFMKVHNPFHWNVVKGTDFFNVHKATEEIIYEEFADMFDDLAERI VQ
GENOMA	1	MKTFEILKHHLQADAIVLFMKVHNPFHWNVVKGTDFFNVHKATEEIIYEEFADMFDDLAERI VQ
SEQ ID 2	61	LGHHPLVTLSEALKLTRVKEETKTSFHSKDIKFKEILGDKYKHHLEKEFKELSN TAEKEGDKV
EVANS	61	LGHHPLVTLSEALKLTRVKEETKTSFHSKDIKFKEILGDKYKHHLEKEFKELSN TAEKEGDKV
GENOMA	61	LGHHPLVTLSEALKLTRVKEETKTSFHSKDIKFKEILEDKYKHHLEKEFKELSN TAEKEGDKV
SEQ ID 2	121	TVTYADDQLAKLQKSIWMLQAHLA *
EVANS	121	TVTYADDQLAKLQKSIWMLQAHLA *
GENOMA	121	TVTYADDQLAKLQKSIWMLQAHLA *

FIG. 4(A)

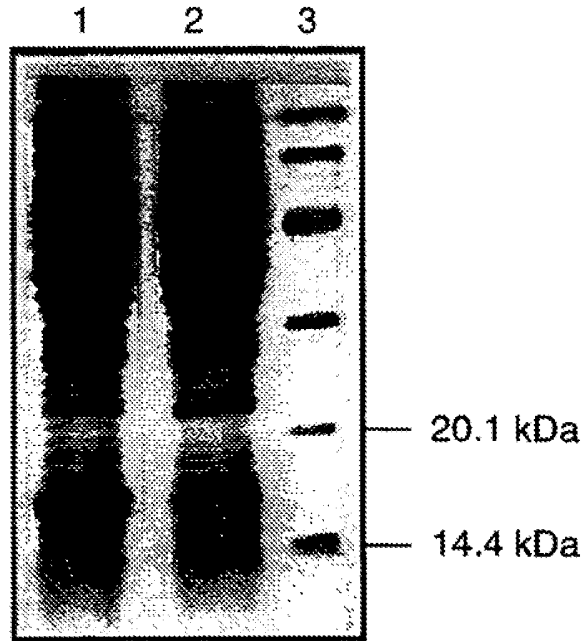


FIG. 4(B)

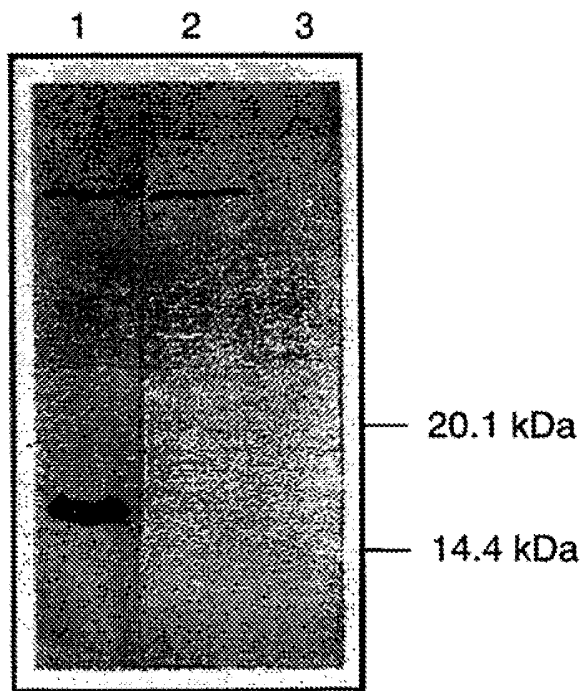


FIG. 5(A)

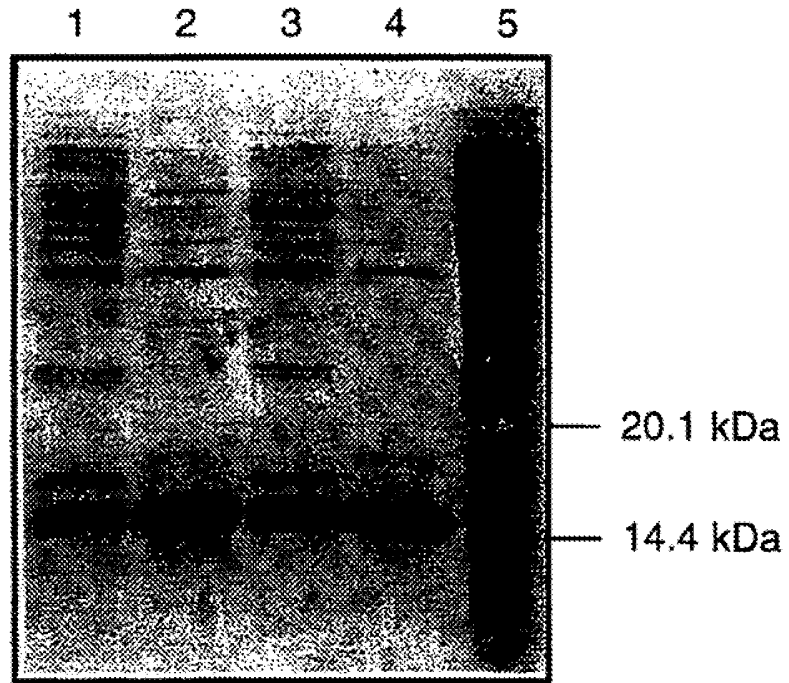


FIG. 5(B)

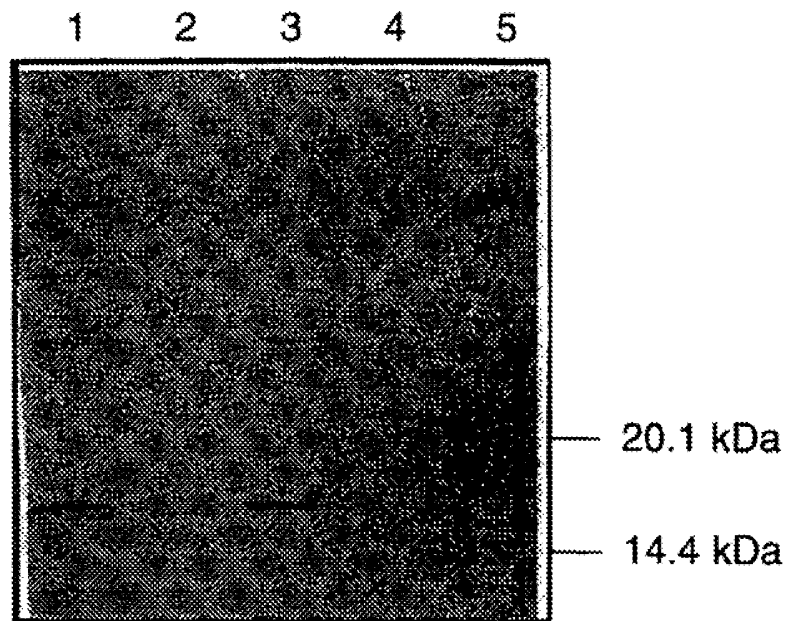


FIG. 6(A)

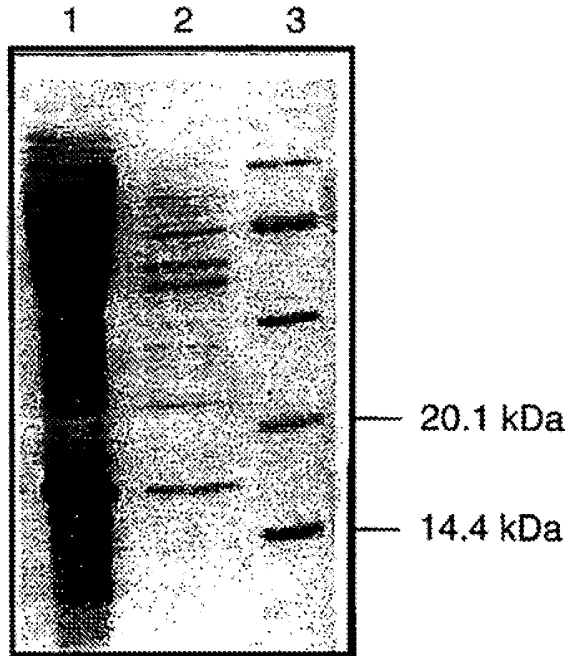


FIG. 6(B)

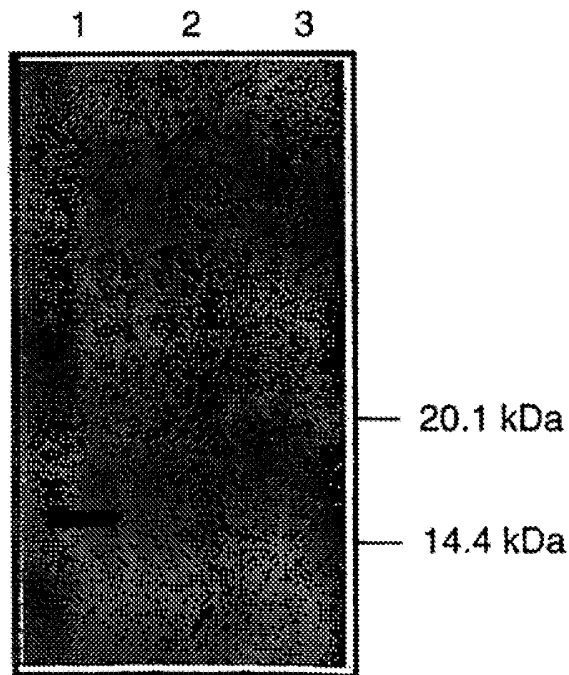


FIG. 7

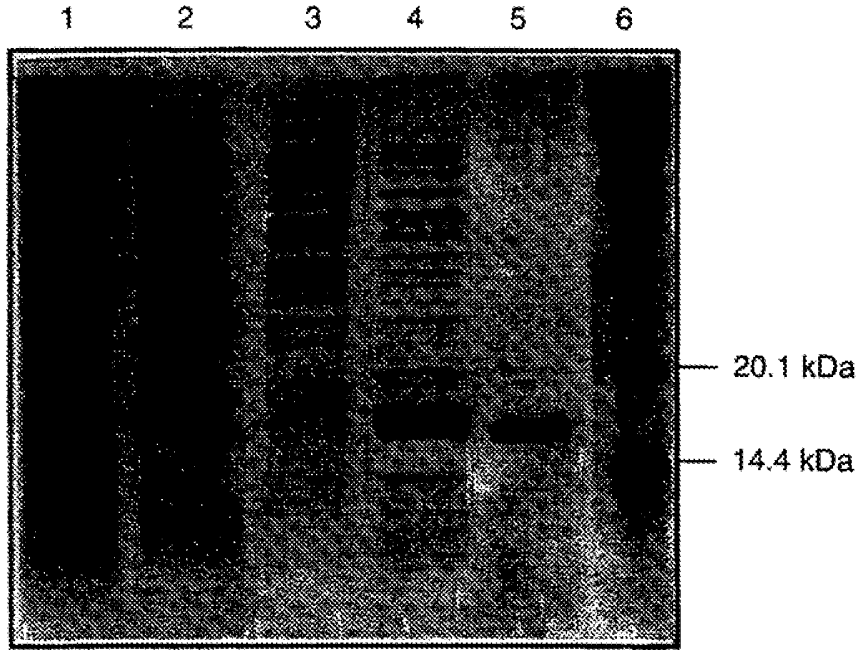
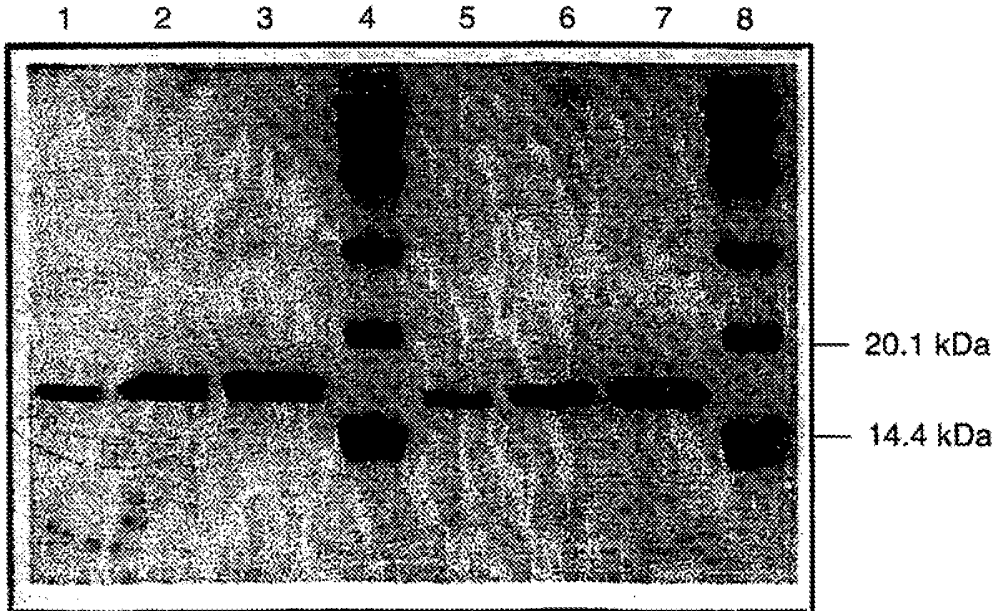


FIG. 8



RESUMO

O invento refere-se a um processo para o enriquecimento da presença de NAP de *H. pylori* numa mistura de proteínas, compreendendo o passo de salting-out das outras proteínas. Verificou-se que a NAP permanece solúvel a concentrações de sulfato de amónio de 80% e superiores. O processo compreende preferencialmente o passo adicional de cromatografia de quelatos metálicos. A combinação dos passos de salting-out e de cromatografia de quelatos metálicos resulta numa NAP muito pura. A NAP possui preferencialmente a mesma sequência que a NAP de ocorrência natural em *H. pylori* e é isenta de sequências que tipicamente estão associadas à produção de proteínas recombinantes. Os processos e a NAP do invento podem ser usados em produtos e processos para diagnóstico e terapêutica.