



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112014020297-4 A2



(22) Data do Depósito: 18/02/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 20/06/2017

(54) Título: CEPA DE MYCOBACTERIUM RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO

(51) Int. Cl.: C12N 1/21; A61K 39/04; A61K 39/108; A61P 31/06; C12R 1/32.

(30) Prioridade Unionista: 17/02/2012 BR BR 10 2012003790 4.

(71) Depositante(es): FUNDAÇÃO BUTANTAN.

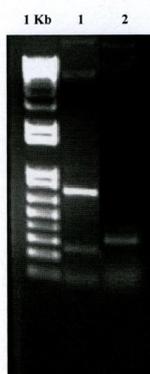
(72) Inventor(es): LUCIANA CEZAR DE CERQUEIRA LEITE; IVAN PEREIRA NASCIMENTO.

(86) Pedido PCT: PCT BR2013000049 de 18/02/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/120159 de 22/08/2013

(85) Data da Fase Nacional: 15/08/2014

(57) Resumo: CEPA DE MYCOBACTERIUM RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO. A presente invenção refere-se a cepas de Mycobacterium recombinantes que codificam a toxina termo- lábil LT de Escherichia coli mutada ou a subunidade A da toxina termo- lábil LT de Escherichia coli mutada. A presente invenção refere-se também a cepas de Mycobacterium que codificam a toxina termo- lábil LT ou a subunidade A da toxina termo- lábil LT de Escherichia coli mutadas na posição 63. Especificamente, a presente invenção refere-se a cepas de Mycobacterium que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de Escherichia coli mutadas na posição 63 de serina para lisina. A presente invenção fornece também composições imunogênicas que compreendem as cepas da presente invenção. A presente invenção prevê ainda o uso das referidas cepas e composições imunológicas na manufatura de vacina para prevenção contra tuberculose e infecções causadas por Mycobacterium tuberculosis. Por último, a presente invenção refere-se a métodos de prevenir ou tratar tuberculose em animais.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: "**CEPA DE MYCOBACTERIUM RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO.**"

[1] A presente invenção refere-se a cepas de *Mycobacterium* recombinantes que codificam a toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada.

[2] A presente invenção refere-se também a cepas de *Mycobacterium* que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutadas na posição 63.

[3] Especificamente, a presente invenção refere-se a cepas de *Mycobacterium* que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutadas na posição 63 de serina para lisina.

[4] A presente invenção fornece também composições imunogênicas que compreendem as cepas da presente invenção.

[5] A presente invenção prevê ainda o uso das referidas cepas e composições imunológicas na manufatura de vacina para prevenção contra tuberculose e infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

[6] Por último, a presente invenção refere-se a métodos de prevenir ou tratar tuberculose em animais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Das micobactérias

[7] As micobactérias compõem o gênero *Mycobacterium* da família das *Mycobacteriaceae* da ordem dos *Actinomycetales* da classe dos *Actinomycetes*. As micobactérias que compõe esse gênero possuem um formato de bastonetes ligeiramente curvos, de 1 a 10 μm de comprimento e 0,2 a 0,6 μm de diâmetro. Estas bactérias não podem ser classificadas como Gram-positivas, nem como Gram-negativas. A característica mais marcante desse bacilo é a natureza complexa de seu envelope celular, contendo uma percentagem relativamente alta de lipídios, os quais incluem as longas cadeias de ácido micólico. Esse envelope lhe confere uma forte hidrofobicidade, tornando-o resistente à lise e relativamente impermeável a antibióticos e outros agentes químicos. Os bacilos são ditos ácido-álcool resistentes, ou seja, são resistentes às descolorações por ácidos fracos após coloração com Fucsina ou corantes similares. O DNA genômico contém um alto conteúdo de guanosina/citosina, entre 58-79%, o que prejudica o uso da bactéria *Escherichia coli* como um hospedeiro genético. Estes aspectos são considerados características básicas para a identificação do bacilo como membro do gênero *Mycobacterium* [ORME, I. (1995) *Medical Intelligent Unit: Immunity to Mycobacteria*. Austin: R.G. Lands Company, p. 5; JAWETZ, E., MELNICK, J.L. & ADELBERG, E.A. (1998) *Medical Microbiology*. 21st Ed.

Appleton & Lange, Stamford, Connecticut; SHINNICK, T .M. & GOOD, R. C. (1994) Mycobacterial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect M Dis **11**: 884-901].

[8] As micobactérias foram classificadas em dois principais grupos: bactérias de crescimento lento, que possuem um tempo de geração em torno de 13 horas e que podem levar de 3 semanas a 3 meses de cultura para fornecer colônias visíveis; e as bactérias de crescimento rápido, que possuem um tempo de geração em torno de 2-5 horas. As micobactérias de crescimento lento incluem muitos dos maiores patógenos de animais e humanos, como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae*, etc, enquanto as de crescimento rápido incluem espécies não patogênicas, tais como *M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. vaccae*, etc. Quatro das cinco espécies patogênicas de micobactérias são agrupadas no complexo *M. tuberculosis* - um grupo de quatro espécies que pode causar a doença tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microft* e *M. africanum*); a quinta é a *M. leprae*, o agente causador da doença de Hansen (informalmente conhecida como lepra) [SHINNICK, T.M. & GOOD, R.C. (1994) Mycobacterial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect M Dis **11**: 884-901; ORME, I. (1995) Medical Intelligent Unit: Immunity to Mycobacteria. Austin: R.G. Lands Company, p. 5; CONNELL, N.D. (2001) Expression systems for use in *Actinomycetes* and related

organisms. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 446-449].

[9] O *M. tuberculosis* (MTB) é transmitido, sobretudo pela via respiratória e, embora possa causar doenças em diversos órgãos, a tuberculose pulmonar é a mais comum. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo e que 200 milhões irão apresentar sintomas de tuberculose, dos quais 35 milhões poderão morrer até 2020 se medidas de controle e prevenção não forem tomadas (OMS Publicação Anual, 2000).

Da profilaxia da tuberculose e do uso do bacilo de Calmette-Guérin (BCG)

[10] No início do século passado, Albert Calmette e Camille Guérin, atenuaram uma cepa virulenta de *Mycobacterium bovis*. Esta cepa é conhecida atualmente como Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), sendo a única vacina contra a tuberculose usada atualmente com sucesso, tendo já sido administrada a mais de três bilhões de indivíduos em todo o mundo.

[11] Não obstante, a sua eficácia contra a forma adulta da tuberculose tem sido motivo de controvérsia, uma vez que pode variar de 0-80%, dependendo do estudo [Andersen, P. and Doherty, T.M. (2005) The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol.* **3**: 656-662].

[12] Assim, vários esforços têm sido empreendidos no

desenvolvimento de novas vacinas, baseadas a) em proteínas recombinantes ou antígenos dominantes de MTB; b) na expressão desses mesmos antígenos em diversos vetores, tais como vetores virais, vetores bacterianos ou vetores baseados em BCG recombinante; c) em outras micobactérias que não causam tuberculose tais como *Mycobacterium smegmatis*; ou d) no próprio *M. tuberculosis* atenuado [Sweeney, K.A., Dao, D.N., Goldberg, M.F., Hsu, T., Venkataswamy, M.M., Henao-Tamayo, M., Ordway, D., Sellers, R.S., Jain, P., Chen, B., Chen, M., Kim, J., Lukose, R., Chan, J., Orme, I.M., Porcelli, S.A. and Jacobs, W.R Jr. (2011) A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med. **4**:1261-1268; Kaufmann, S.H. (2010) Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. Immunity **33**: 567-577.

[13] De um modo geral, a idéia por trás destas vacinas é buscar uma forma de mimetizar o que acontece numa situação real, ou seja, apresentar o patógeno por inteiro numa forma morta ou viva, porém, atenuada e que não provoque infecção [Kaufmann, S.H. (2010) Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. Immunity **33**: 567-577], ou usando uma outra espécie do mesmo gênero, também morta ou atenuada, como a BCG, que possui antígenos importantes em comum com o patógeno de interesse.

Outra variante dessas vacinas seria o seu uso como veículos vivos para apresentação ou expressão de antígenos heterólogos, neste caso moléculas de MTB sendo expressas em BCG ou *M. smegmatis* [Sweeney, K.A, Dao, D.N., Goldberg, M.F., Hsu, T., Venkataswamy, M.M., Henao-Tamayo, M., Ordway, D., Sellers, R.S., Jain, P., Chen, B., Chen, M., Kim, J., Lukose, R., Chan, J., Orme, I.M., Porcelli, S.A. and Jacobs, W.R Jr. (2011) A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med. **4**:1261-1268; Kaufmann, S.H. (2010) Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. Immunity **33**: 567-577].

[14] Apesar dos esforços, os resultados em modelo animal quando comparados com a vacina BCG apontam para uma redução da carga bacilar nos pulmões de somente 1,0 log, ainda assim seguindo um regime de imunização baseado em "prime-boost". Neste esquema de imunização, a primeira dose é administrada por uma das formulações mencionadas acima seguida por uma segunda dose em uma outra formulação, ou seja, são necessárias duas imunizações com formulações ou apresentações diferentes para se chegar a um resultado melhor que a vacina BCG usada atualmente, que é administrada como dose única [Sweeney, K.A, Dao, D.N., Goldberg, M.F., Hsu, T., Venkataswamy, M.M., Henao-Tamayo,

M., Ordway, D., Sellers, R.S., Jain, P., Chen, B., Chen, M., Kim, J., Lukose, R., Chan, J., Orme, I.M., Porcelli, S.A. and Jacobs, W.R Jr. (2011) A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med. **4**:1261-1268; Kaufmann, S.H. (2010) Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. Immunity **33**: 567-577].

Do BCG Recombinante

[15] O BCG é a vacina mais utilizada no mundo pois apresenta uma resposta imune duradoura e uma frequência muito baixa de efeitos adversos sérios. Essa e outras características tornam a BCG um excelente candidato a veículo para apresentação de antígenos heterólogos através de vacinas recombinantes baseadas em BCG (Patente US 6,673,353). Neste sentido, a expressão de domínios imunogênicos de bactérias, vírus e parasitas tem sido utilizado com sucesso no BCG, gerando cepas recombinantes (rBCG), as quais produzem resposta imune não só contra o bacilo da tuberculose, mas também, contra os patógenos cujas proteínas seriam expressas nesse rBCG (Patente US 5,504,005). No entanto, vale salientar que nas rBCGs descritas até a data, a adição de um domínio imunogênico heterólogo confere a proteção imunológica específica esperada contra os patógenos cujas proteínas seriam

expressas no referido rBCG. Reações distintas das que são de conhecimento habitual, isto é, em que o rBCG confere a proteção imunológica diferente daquela esperada, ainda não foram descritas.

Da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* e suas propriedades imunomoduladoras

[16] Propriedades adjuvantes têm sido atribuídas a diversas toxinas bacterianas. Por exemplo, é amplamente conhecido que as toxinas tetânica (TT), diftérica (DT), colérica (CT) e a toxina termo-lábil (LT) de *Escherichia coli* (*E. coli*), atuam como adjuvantes que direcionam a resposta imunológica para Th2 quando co-administradas com outros antígenos [Ryan, E.J. et al. (2000) Modulation of innate and acquired immune responses by *Escherichia coli* heat-labile toxin: distinct pro- and anti-inflammatory effects of the nontoxic AB complex and the enzyme activity. *J Immunol.* 165:5750-5759; Miyaji, E.N. et al. (2001) Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing CRM197, a mutant diphtheria toxin. *Infect Immun.* 69:869-874].

[17] Em particular, a toxina LT de *E. coli* está entre os mais potentes adjuvantes já descritos até o momento [Lycke, N. et al. (1992) The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is

linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur J Immunol.* 22: 2277-2281; Pizza, M. et al. (2001) Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*, 19:2534-2541].

[18] A toxina LT de *E. coli* é formada por uma única molécula de subunidade A (LTA, 27kDa), com atividade ADP ribosiltransferase, ligada a um pentâmero de subunidade B (LTB, 11,6 kDa cada) que se liga ao receptor gangliosídeo GM1 de células de mamíferos. A subunidade B de LT é uma potente molécula sinalizadora capaz de modular a resposta imunológica. O efeito imunoestimulatório de LTB parece estar relacionado com a capacidade desta de aumentar a apresentação de antígeno via o complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I) e classe II (MHC-II), entre outros fatores. Já o efeito adjuvante de LTB tem sido relacionado diretamente à atividade de ligação a GM1, através da ativação de células B e células T CD4⁺ por meio da interação dos pentâmeros de subunidade B e os receptores GM1 destas células. Além disso, LTB aumenta a apresentação de antígenos pela ativação de células dendríticas (DCs) e outras células apresentadoras de antígenos (APCs). A ligação da LTB ao gangliosídeo GM1 permite que a subunidade A, que é tóxica, entre na célula [Spangler, B.D. (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile

enterotoxin. *Microbiol Rev.* 56: 622-647].

[19] O uso da LT como adjuvante não é recomendado, em função da toxicidade da subunidade A. Já a subunidade B, por não apresentar esta toxicidade, tem sido mais frequentemente utilizada como adjuvante [de Haan, L., Verweij, W.R., Feil, I.K., Holtrop, M., Hol, W.G., Agsteribbe, E. and Wilschut, J. (1998) Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. *Immunology*, 94: 424-430].

[20] As propriedades imunomodulatórias que levam ao aumento da imunogenicidade e eficácia protetora de LT têm sido amplamente estudadas. Embora os mecanismos que levam a esse efeito não sejam bem caracterizados, alguns aspectos como o aumento de citocinas inflamatórias e produção de quimiocinas, bem como recrutamento transiente de células imunoefetoras até o sítio de inflamação têm sido estabelecidos como fatores importantes. LT pode também influenciar a maturação de células dendríticas, apresentação de antígenos e ativação de células T e promover a indução de resposta por células T citotóxica antígeno-específico em modelo animal. O uso de LT como adjuvante leva comumente a um balanço de citocinas, envolvendo a produção de uma resposta por citocinas com características tanto Th1 como Th2 e algumas classes de

anticorpos em camundongos e humanos.

[21] Esta toxina é capaz de ativar uma resposta imunológica contra outro antígeno quando apresentados simultaneamente na superfície de mucosa ou por administração oral, intra-nasal ou parenteral [Holmgren, J., Lycke, N. and Czerkinsky, C. (1993) Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine*, 11: 1179-1184].

[22] Como uma consequência dessas propriedades, LT tem sido empregada extensivamente como adjuvante em modelos animais. No entanto, apesar da ação imunomodulatória de LT, este é altamente tóxico e inapropriado para uso clínico em humanos. Assim, para evitar a toxicidade associada com o uso da toxina nativa, porém mantendo suas propriedades adjuvantes, diferentes estratégias têm sido utilizadas, incluindo o isolamento da subunidade B (não tóxica) e a construção de mutantes de LT não-tóxicos, contendo mutações sítio-dirigidas específicas. Por meio de estudos de modelagem computacional da estrutura da proteína LT, foi possível identificar alguns aminoácidos potencialmente envolvidos na atividade enzimática desta proteína que poderiam ser estudados através da troca dos mesmos por mutação sítio-dirigida [Magagnoli, C. et al., (1996) *Infect Immun.* 64: 5434-5438]. Alguns desses mutantes, tais como LTR192G (substituição de arginina para glicina na posição

192), possuem uma mutação numa região de alça que é sensível a protease, tornando esta região insensível à ação de proteases, etapa fundamental para a ativação da atividade enzimática e conseqüentemente da sua toxicidade. Outros mutantes apresentam uma mutação na região enzimaticamente ativa da subunidade A, tal como LTR72 (substituição de alanina por arginina na posição 72), a qual retém somente 1 % da atividade ADP-ribosiltransferase.

[23] Um outro mutante importante é LTK63 (substituição de serina por lisina na posição 63). Essa mutação elimina a atividade ADP-ribosiltransferase associada à toxicidade; eliminando a mesma, porém, mantém todas as outras propriedades biológicas, incluindo propriedades adjuvantes do LT nativo [Pizza, M., et al., (2001) Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*, 19:2534-2541].

[24] LTK63 tem mostrado atuar como um potente adjuvante quando administrado mucosamente ou parentalmente. De Haan e colaboradores [De Haan, L., Holtrop, M., Verweij, W.R., Agsteribbe, E. and Wilschut, J. (1999) Mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the recombinant A subunit of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Immunology*, 97: 706-7013] sugerem que adjuvantes usando LTA não tóxicos em associação com o pentâmero LTB podem ser mais potentes que adjuvantes usando a subunidade B sozinha,

uma vez que o complexo poderia estimular o sistema imunológico mais fortemente do que cada molécula individualmente. Dados que apontam para uma função importante da subunidade A enzimaticamente inativa na indução de uma resposta imune, bem como em atividades imunomoduladoras, tais como efeitos sobre o processamento e apresentação de antígeno, dão suporte a essa visão.

Da expressão de LT e suas variantes

[25] LTB e LTK63 recombinantes têm sido expressas tipicamente em *E. coli*. No entanto, outros sistemas de expressão têm sido usados. A molécula LTB foi expressa em *Mycobacterium bovis* BCG, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, bem como plantas que incluem *Oryza sativa* (arroz), *Lactuca sativa* (alface) e *Peperomia pellucid*. LTK63 tem sido expresso também em tabaco e cloroplastos, assim como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium atenuada [da Hora, V.P. et al. (2011) Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. *Vaccine*, 29: 1538-1544].

[26] No entanto, o objetivo de todos estes trabalhos, foi utilizar a molécula de LT ou uma de suas subunidades ou variantes para produzir vacinas contra *E. coli*. O uso de LT em vacinas contra tuberculose não foi descrito nem sugerido na literatura existente.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[27] Constitui um objetivo da presente invenção, fornecer cepas de *Mycobacterium* recombinantes que codificam a toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada.

[28] Em particular, constitui um objetivo da presente invenção, fornecer cepas de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG), recombinantes que codificam a toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada.

[29] Mais especificamente, constitui um objetivo da presente invenção, fornecer cepas de *Mycobacterium*, em particular *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG), que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutadas na posição 63.

[30] Mais especificamente, constitui um objetivo da presente invenção, fornecer cepas de *Mycobacterium*, em particular *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG), que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli*, mutadas na posição 63 de serina para lisina, respectivamente rBCG-LTK63 e rBCG-LTAK63.

[31] Constitui também um objetivo da presente invenção fornecer composições imunogênicas que compreendem as cepas

da presente invenção.

[32] Um outro objetivo da invenção é prover o uso das referidas cepas e composições imunológicas na manufatura de vacinas para prevenção contra tuberculose e/ou infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis* ou por outras micobactérias.

[33] Em particular, tem a presente invenção o objetivo de prover vacinas de BCG melhoradas contra tuberculose (i.e. que induzem melhor proteção que a cepa BCG convencional) que compreendem as cepas de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinantes da presente invenção.

[34] A presente invenção objetiva ainda métodos de prevenir ou tratar tuberculose em animais, mais particularmente humanos.

DEFINIÇÕES

[35] No âmbito deste pedido de patente são utilizadas por diversas vezes abreviaturas cujas definições conforme empregues neste pedido, encontram-se resumidas abaixo:

- BCG refere-se ao *Mycobacterium bovis* atenuado, Bacilo de Calmette-Guérin;
- LTK63 refere-se à toxina termo-lábil de *Escherichia coli* contendo a subunidade A modificada por mutagênese sítio-dirigida;

- LTAK63 refere-se à subunidade A da toxina termolábil de *Escherichia coli*, modificada por mutagênese sítio-dirigida;e
- rBCG-LTK63 ou rBCG-LTAK63 refere-se ao BCG recombinante expressando LTK63 ou LTAK63.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[36] As figuras a seguir fazem parte do presente relatório e estão aqui inclusas a fim de ilustrar determinados aspectos da invenção. O objeto da presente invenção pode ser melhor entendido com referência a uma ou mais dessas figuras, em combinação com a descrição detalhada da modalidade preferida aqui apresentada.

[37] A Figura 1 mostra um gel de agarose contendo os produtos de PCR que confirmam a presença do gene LTK63 no BCG recombinante (rBCG-LTK63). Os produtos de PCR foram amplificados à partir do DNA plasmidial extraído da construção rBCG-LTK63 usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar a subunidade LTA ou a unidade LTB. 1Kb plus, peso molecular; poço 1, fragmento LTA completo (~700 pb); poço 2, fragmento LTB completo (~316 pb).

[38] A Figura 2 mostra a caracterização da expressão de LTAK63 (~31,0 kDa) em BCG recombinante. Extrato de proteínas solúveis (~10 µg) de rBCG transformado com pLNIP-

LTAK63 (A), ou BCG vazio como controle negativo (B) foram usados neste imunoenensaio. Foi utilizado um soro (policlonal) feito em coelho anti-LT 1:1000).

[39] As Figuras 3 e 4 mostram a análise comparativa da resposta de anticorpos IgG1 e IgG2a induzida contra proteínas recuperadas do sobrenadante de cultivo de BCG - PDS. Camundongos BALB/c, fêmeas, com quatro semanas (18-22g), provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária - USP, foram imunizados com BCG ou rBCG-LT (Figura 3) ou com BCG ou rBCG-LTAK63 (Figura 4) e os isotipos determinados em soros isolados um dia antes do desafio contra MTB ou 90 dias após imunização. Os soros de 5 animais por grupo foram analisados individualmente por ELISA, usando anticorpos específicos anti IgG1 e IgG2a de camundongo.

[40] As Figuras 5 e 6 mostram a produção de IFN- γ por esplenócitos cultivados na presença de PDS. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com 1×10^6 UFC de BCG ou rBGC-LT (Figura 5) ou BCG ou rBCG-LTAK63 (Figura 6) e após quatro semanas ou oito semanas, respectivamente, os baços foram recuperados e preparações de células únicas foram cultivadas in vitro (2×10^6 células/poço) na presença de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de PDS. Os sobrenadantes das culturas foram recuperados após 48 h e os níveis de IFN- γ determinados por

ELISA.

[41] As Figuras 7 e 8 mostram a produção de TNF- α por esplenócitos cultivados na presença de PDS. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com 1×10^6 UFC de BCG ou rBGC-LT (Figura 7) ou BCG ou rBCG-LTAK63 (Figura 8). Após 4 semanas (Figura 7) ou oito semanas (Figura 8) os baços foram recuperados e preparações de células únicas foram cultivadas in vitro (2×10^6 células/poço) na presença de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de PDS. Os sobrenadantes das culturas foram recuperados após 24 h (Figura 7) ou 48 h (Figura 8) e os níveis de TNF- α determinados por ELISPOT (Figura 7) ou ELISA (Figura 8, respectivamente). SFU = unidades formadoras de pontos.

[42] As Figuras 9 e 10 mostram o perfil de células T CD4⁺ produtoras das citocinas INF- γ e TNF- α , respectivamente. Camundongos BALB/c fêmeas (n = 5 por grupo) foram imunizados s.c. uma única vez com 1×10^6 UFC/animal com BCG ou rBCG-LTK63. Um grupo não imunizado foi utilizado como controle negativo. Oito semanas após a imunização os baços foram recuperados e preparações de células únicas foram cultivadas in vitro (2×10^6 células/poço) na presença de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de PDS. O perfil de células T CD4⁺ produtoras das diversas citocinas foram analisadas por Citometria de Fluxo (FACs) usando anticorpos

anti-CD4, anti-INF- γ e anti-TNF- α específicos e marcados com o fluorocromo apropriado.

[43] A Figura 11 mostra o resultado dos ensaios de proteção contra um desafio intra-traqueal com a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. Camundongos BALB/c fêmeas ($n = 10$ por grupo) **A** e **B** foram imunizados s.c. uma única vez com *M. bovis* BCG ou com rBCG-LT. Um grupo não imunizado foi usado como controle negativo. Oito semanas após a imunização os animais foram desafiados pela via intra-traqueal com 1×10^5 UFC de *M. tuberculosis* H37Rv. Barras de erro representam o desvio padrão da média. A e B representam dois ensaios realizados em tempos diferentes nas mesmas condições. **C**, representa um ensaio realizado com camundongos C57BL/6 fêmeas ($n = 10$ por grupo) imunizados s.c. uma única vez com *M. bovis* BCG ou rBCG-LTA. Oito semanas após a imunização os animais foram desafiados pela via intra-traqueal com 1×10^5 UFC de *M. tuberculosis* H37Rv. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Descrição das cepas

[44] A presente invenção refere-se a cepas de *Mycobacterium* recombinantes que codificam a toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada.

[45] A presente invenção refere-se também a cepas de

Mycobacterium recombinantes que codificam a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada.

[46] Em particular a presente invenção refere-se a cepas de *Mycobacterium* que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutadas na posição 63.

[47] Mais particularmente a presente invenção refere-se a cepas de *Mycobacterium* que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutadas na posição 63 de serina para lisina, respectivamente rBCG-LTK63 e rBCG-LTAK63.

[48] As referidas mutações permitem que a toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* codificadas pelo *Mycobacterium* mantenham as propriedades adjuvantes do LT nativo, porém percam a atividade ADP-ribosiltransferase associada à toxicidade, evitando assim problemas de toxicidade no caso em humanos ou outros animais.

[49] Cepas de *Mycobacterium* que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* que apresentam outras mutações em sua seqüência que objetivem um efeito equivalente, i.e. manutenção das propriedades adjuvantes do LT nativo e diminuição ou supressão da toxicidade, estão também contempladas na presente invenção. Tais mutações podem

incluir, mas não estão limitadas às posições 72 e 192.

[50] As cepas da presente invenção são obtidas a partir de qualquer cepa do genero *Mycobacterium* como carreador para apresentação de um ou mais antígenos de organismos distintos, obtidos e clonados em vetor de expressão em micobactéria e inseridos por meio de manipulação genética.

[51] Preferencialmente as cepas de *Mycobacterium* recombinantes da presente invenção compreendem cepas do complexo de MTB, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microft* e *Mycobacterium africanum* ou de micobactérias de crescimento rápido, *Mycobacterium smegmatis*, *M. aurum*, *M. vaccae*, etc.

[52] Mais preferencialmente as cepas de *Mycobacterium* recombinantes da presente invenção compreendem cepas de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG).

Descrição das composições imunogênicas

[53] A presente invenção refere-se a composições imunogênicas que compreendem uma ou mais cepas da presente invenção e um ou mais dentre um veículo, excipiente, diluente ou solvente fisiologicamente aceitáveis.

[54] Preferencialmente as composições da presente invenção compreendem cepas de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG), que codificam a toxina termo-lábil LT mutada na posição 63 de serina para lisina, i.e., rBCG-

LTK63.

[55] Alternativamente, as composições da presente invenção compreendem preferencialmente cepas de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG), que codificam a subunidade A da toxina termo-lábil LT mutada na posição 63 de serina para lisina, i.e., rBCG-LTAK63.

[56] As composições da presente invenção podem ainda compreender uma mistura de cepas de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG), que codificam a toxina termo-lábil LT mutada na posição 63 de serina para lisina, i.e., rBCG-LTK63 e a subunidade A da toxina termo-lábil LT mutada na posição 63 de serina para lisina, i.e., rBCG-LTAK63.

[57] As composições imunogênicas da presente invenção, podem ainda compreender adicionalmente um ou mais antígenos, preferencialmente toxinas inativadas. Tais antígenos podem ser para uso na prevenção e/ou tratamento de tuberculose ou de outras doenças causadas por patógenos distintos. Os componentes inativados das composições imunogênicas sinérgicas da presente invenção podem ser obtidos por qualquer método conhecido na técnica, tais como procedimentos químicos, como o tratamento com formaldeído ou água oxigenada, ou mesmo técnicas de recombinação de DNA.

[58] De acordo com a presente invenção, adjuvantes são

moléculas, componentes, macromoléculas ou microorganismos atenuados ou mortos que potencializam a resposta às imunizações, reduzem a quantidade de antígeno necessária e direcionam o tipo de resposta imune a ser desenvolvida, além de sustentá-la por um período de tempo maior, como um imunógeno; é qualquer material ou substância que altera o tipo, a velocidade, a intensidade ou a duração da resposta imune.

[59] As composições da presente invenção podem compreender ainda excipientes, como bactericidas, bacteriostáticos, antioxidantes, conservantes, tampões, estabilizantes, ajustadores de pH, ajustadores de osmolaridade, agentes antiespuma e tensoativos; e resíduos de agentes de inativação ou fracionamento de antígenos, componentes de meios de crescimento e solventes comumente utilizados na produção de vacinas; exemplos destes tipos de componentes podem ser encontrados no *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases The Pink Book*, 11ª edição, seção "Vaccine Excipient & Media Summary" (Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. Atkinson W, Wolfe S, Hamborsky J, McIntyre L, eds. 11th ed. Washington DC: Public Health Foundation, 2009) incorporado aqui como referência.

[60] Conforme usado na presente invenção, o emprego do

termo "farmaceuticamente aceitável" significa um sólido não-tóxico, inerte, excipiente líquido semi-sólido, diluente, formulação auxiliar de qualquer tipo, ou simplesmente um meio aquoso estéril, tal como solução salina. Alguns exemplos dos materiais que podem servir como veículos farmaceuticamente aceitáveis são açúcares, tais como lactose, glicose e sacarose, os amidos, tais como amido de milho e o amido de batata, a celulose e os seus derivados, tais como a carboximetilcelulose de sódio, a etilcelulose e o acetato de celulose, ciclodextrina; óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de girasol, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de semente de soja; glicóis, tais como propilenoglicol, polióleos, tais como glicerínaglicol, sorbitol, manitol e de polietileno; ésteres, tais como o laurato etílico, oleato etílico, ágar; agentes tamponantes, tais como o hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio; ácido algínico; água livre de pirogênio; salina isotônica, solução de Ringer; soluções tampões de álcool etílico e fosfato, assim como outras substâncias não tóxicas compatíveis usadas em formulações farmacêuticas.

[61] Uma variedade de vias de administração das composições imunoterápicas e vacinas descritas na presente invenção está disponível. O modo particular selecionado dependerá do princípio ativo em particular selecionado, a

dosagem necessária para eficácia terapêutica e do paciente ao qual será administrada a composição. Os métodos da presente invenção, geralmente, podem ser praticados usando qualquer modo de administração biologicamente aceitável, i.e., qualquer modalidade que produzir níveis eficazes de resposta imune sem causar efeitos adversos clinicamente indesejáveis. Tais modos de administração incluem as vias intradérmica, oral, retal, sublingual, tópica, nasal, transdermal ou parenteral. O termo "parenteral" inclui subcutânea, intravenosa, epidural, irrigação, intramuscular, bombas de liberação, ou de infusão. Particularmente, nesta invenção as vias intradérmica, oral, parenteral e nasal são preferidas para administração das composições aqui reivindicadas.

[62] Para a administração parenteral, os princípios ativos podem igualmente ser dissolvidos em um veículo farmacêutico e administrados como uma solução, emulsão, incluindo micro e nanoemulsões, ou suspensão. Exemplos de veículos apropriados são água, salina, soluções de dextrose, soluções de frutose ou óleos de origem animal, vegetal ou sintéticos.

[63] Para a administração nasal, os princípios ativos podem ser dissolvidos em um veículo farmacêutico e administrados como uma solução, emulsão, incluindo micro e nanoemulsões, ou suspensão. Exemplos de veículos

apropriados são água e solução salina ou suspensões sólidas, como spray, lactose, frutose ou flocos de quitosana. Outros veículos podem também conter outros ingredientes, por exemplo, preservativos, agentes suspensores, agentes solubilizantes, tampões e similares.

[64] Preferencialmente as composições imunogênicas da presente invenção são para administração intradérmica, oral e parenteral.

Propriedades das cepas e das composições imunogênicas da presente invenção

[65] As cepas e as composições imunogênicas da presente invenção apresentam um efeito sinérgico inesperado sobre a resposta imunológica contra *Mycobacterium*. Os antígenos recombinantes do LTK63 ou LTAK63 apresentam o efeito técnico inesperado de induzir um efeito adjuvante contra as proteínas do próprio *Mycobacterium*.

[66] Conforme poderá ser visto nos Exemplos abaixo, as cepas e as composições imunogênicas da presente invenção apresentam o efeito técnico inesperado de provocar uma resposta imunológica anti-TB mais intensa quando comparadas a vacinas compreendendo BCG tradicional. Ou seja, a adição de um domínio imunogênico, como por exemplo a subunidade não-tóxica LTAK63 da toxina termo-lábil de *E. coli*, que sabidamente não tem nenhuma ligação com nenhum tipo de micobactéria, em uma micobactéria recombinante, em

particular BCG, provoca um aumento da resposta protetora contra tuberculose.

[67] Em particular as cepas e as composições imunogênicas da presente invenção promovem uma diminuição da carga bacilar no pulmão em modelos animais de tuberculose.

[68] Além disso, as cepas e as composições imunogênicas da presente invenção levam a um aumento significativo da expressão de IFN- γ em relação ao grupo controle, uma citocina considerada essencial na resposta contra tuberculose; este fato sinaliza para uma resposta polarizada do tipo Th1.

[69] As cepas e as composições imunogênicas da presente invenção levam também a um aumento significativo de TNF- α . Uma vez que o TNF- α é relacionado como sinalizador da ação pro-inflamatória, caracterizando a fase aguda do processo inflamatório desencadeado pelos bacilos, então as vacinas da presente invenção promovem a ativação direta do sistema imune.

[70] Finalmente podemos concluir que as cepas e as composições imunogênicas da presente invenção, ao combinar micobactérias, em particular BCG, e toxinas derivadas de outros patógenos, preferencialmente de *Escherichia coli*, gerando uma cepa de micobactéria recombinante, constituem

uma nova vacina, mais potente e eficaz que o BCG convencional para a profilaxia ou imunização para tuberculose.

Uso das cepas e das composições imunogênicas da presente invenção.

[71] Considerando as propriedades das cepas de *Mycobacterium* recombinantes e das composições imunogênicas da presente invenção, constitui outro aspecto da presente invenção o uso das composições imunogênicas para a prevenção de infecções causadas por micobactérias, em particular *Mycobacterium tuberculosis* em animais, mais particularmente humanos.

[72] Constitui um outro aspecto da presente invenção o uso de uma ou mais cepas de *Mycobacterium* recombinantes ou de uma ou mais composições imunogênicas da presente invenção na manufatura de uma vacina.

[73] Mais particularmente, constitui um aspecto da presente invenção o uso de uma ou mais cepas de *Mycobacterium* recombinantes ou de uma ou mais composições imunogênicas da presente invenção na manufatura de uma vacina para prevenção e/ou tratamento de tuberculose e/ou infecções causadas por micobactérias.

[74] Constitui ainda um outro aspecto da presente invenção métodos de prevenir ou tratar tuberculose em animais, mais particularmente humanos.

EXEMPLOS

[75] Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos, são apresentados abaixo, como exemplos, os resultados dos diferentes ensaios efetuados com relação a esta invenção.

[76] No Exemplo 1 é descrita a obtenção das vacinas da presente invenção. Nos demais Exemplos (2 a 3) são ilustradas as propriedades e o uso da vacina da presente invenção. Estes Exemplos são apresentados a título meramente ilustrativo e não devem ser de forma alguma considerados como limitativos do âmbito e do alcance da presente invenção.

EXEMPLO 1: Obtenção das vacinas rBCG-LTK63 e rBCG-LTAK63

[77] Este exemplo descreve a obtenção das vacinas rBCG-LTK63 e rBGC-LTAK63.

a) Preparação de lote estoque de BCG competente: para preparação de estoques de BCG competente, uma ou mais colônias de BCG foi cultivada em meio líquido Middlebrook 7H9 mais Tween-80 e suplementado com albumina-dextrose-catalase 10% (MB7H9/Tw/ADC) até a fase exponencial. Composição do meio Middlebrook 7H9 de acordo com o fabricante (Difco-BD): Sulfato de Amônio, Ácido L-Glutâmico, Citrato de Sódio, Piridoxina, Biotina, Di-

Fosfato de Sódio, Mono-fosfato de Potássio, Citrato de Amônio Férrico, Sulfato de Magnésio, Cloreto de Cálcio, Sulfato de Zinco e Sulfato de Cobre. Em seguida, a cultura foi sedimentada por centrifugação a 4000 rpm e lavada duas vezes com glicerol 10% a 4°C, sendo finalmente re-suspendida em 5% do volume original com glicerol 10% e armazenada à -70°C até ser transformada por eletroporação com o plasmídeo pNL12-LTK63 ou com o plasmídeo pNL12-LTAK63.

b) Construção do vetor de expressão do gene LTK63 em BCG recombinante aqui denominado de pNL12-LTK63: o vetor de expressão de micobactéria usado para expressão de LTK63 em BCG recombinante é denominado pMIP12 e foi descrito por Le Dantec [Le Dantec et al. 2001 J Bacteriol. **183**: 2157-2164]. O gene LTK63 foi gentilmente cedido pelo Dr. Rino Rappuoli (Novartis). O vetor de expressão em BCG recombinante do gene LTK63 foi construído usando métodos convencionais de biologia molecular. O gene LTK63 foi amplificado por PCR usando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: N-terminal (5'- TAGGGTACCCAAAAATATAACTTCATTTTTTTTATTTT-3'), contendo o sítio de restrição Kpn I (sublinhado) e C-terminal (5'- TAGCTGCAGCTAGTTTTTCATACTGATTGCC-3'), contendo o sítio de restrição Pst I (sublinhado). O produto de PCR correspondente ao gene LTK63 foi gerado usando as seguintes condições de PCR: 94°C por 4 minutos; 25 ciclos

de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 30 s; e 4°C final. Esse produto de PCR foi então digerido com as enzimas de restrição Kpn I e Pst I e então clonado no vetor de expressão pMIP12, que foi também previamente digerido com as mesmas enzimas Kpn I e Pst I, gerando assim o vetor de expressão denominado de pMIP12/LTK63.

Sequência gênica do plasmídeo pNP12-LTK63

GCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAG
CTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTG
TGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGA
ATTCGAGCTCGACTTAATTA ACTCCGGGTGGTCACTGAGTACATCCCGTCGGTGCGTTC
GGCATCGGTCCGGGTGTGGGTGGGTGTCCGGTCCCGCGACGAAGGACGAAGCGTCGCGG
GTGCCGCCCACTTCTTGAGCATCTGCTGTTCAAGGCCACCCCGACGCGCACGCGGTTCG
ACATCGCGCAGGCTGTCGATGCCGTCGGCGGTGAGCTGAACGCGTTCACCACGCGCGAG
CACACCTGTTACTACGCGCATGTGCTCGACTCCGACCTGGAGCTCGCGGTTCGACCTGGT
GCGCCGATGTCGTGTTGCGTGGGCGTTGTGCCACCGAGGATGTCGAAGTGGAGCGCGAC
GTCGTCTCGAGGAGATCGCCATGCGTGACGACGATCCCGAGGACAGCCTCGGGCAGCTG
GTTCTCTCGGCGATGTTCCGGCGATCACCCGGTGGGACGTCCGGTGATCGGCAGCGTTCG
AGTCGATCGAGACCATGACGCGTGACAGCTGCATTTCGTTCCACGTCCGGCGTTACACA
CCCGAACGGATGATCGTGGCGGTGGCCGGCAACGTCGACCACGACGTGTGGTGTTCGTTG
GTCCGAGAGCATTTCGGCCCCGGCTGGAGGCCGACGTTCCGCGGTGGCTCCCCGTAAG
GCTCGGGACGGGTCCGGTGGTAAGCCATCGCTGCTCGTGGTTCGACCGCGACGGGGAACAG
TCCCATGTCTCGCTGGGCGTTTCGCACGCCCGCCGGCACTGGGAGCACCGGTGGGCCCT
GTCGGTGTGTAACACCGCGCTGGGAGGCGGGCTCAGTTCTCGTCTGTTCCAACAGATTC

GCGAGTCCCGCGGCCTGGCCTACCTCGGTGTA CTGACCGTGGACCACTTCGCGACAGC
GGGGCTCTGTCGGTGTATGCGGGATGTCAGCCGGAACGTTTCGACGAAGTGGTGCGGGT
GACCACCGAAGTTTTGGAAGGTGTTGCCAGAGACGGGATCACCGCCGACGAATGCCGGA
TCGCCAAAGGCTCGTTGCGCGGTGGGCTGGT GCTCGGCCTGGAGGATTCGGGATCACGT
ATGCACCGGATCGGCCGTAGCGAGCTCAATTACGGTG_gAGCACCGGACCATCGACCACA
CGCTGGCCCAGATCGAGGCAGTCACTCTAGAAGAGGTCAACGCCGTCGCTCACCAGTTG
CTGTGCGGGACTACGGTGCCGCCGTA CTGCGTCCCTATAGTTTCGAAAAGGGCGCTGCC
ACAACAGCTTCAAATATCGCCGGCTGACCCGCTACACTGGGTCCAATGGATTAGAAGG
AGAAGTACCGATGGGATCCGGTACCAATGGCGACAGATTATACCGTGCTGACTCTAGAC
CCCCAGATGAAATAAAACGTTCCGGAGGTCTTATGCCCAGAGGGCATAATGAGTACTTC
GATAGAGGAACTCAAATGAATATTAATCTTTATGATCACGCGAGAGGAACACAAACCGG
CTTTGTCAGATATGATGACGGATATGTTTCCACTAAGCTTAGTTTGAGAAGTGCTCACT
TAGCAGGACAGTCTATATTATCAGGATATTCCTACTATATATATGTTATAGCGACA
GCACCAAATATGTTTAATGTTAATGATGTATTAGGCGTATACAGCCCTCACCCATATGA
ACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTGGAATACCATATTCCTCAGATATATGGATGGTATCGTG
TTAATTTTGGTGTGATTGATGAACGATTACATCGTAACAGGGAATATAGAGACCGGTAT
TACAGAAATCTGAATATAGCTCCGGCAGAGGATGGTTACAGATTAGCAGGTTTCCCACC
GGATCACCAAGCTTGGAGAGAAGAACCCTGGATTCATCATGCACCACAAGGTTGTGGAA
ATTCATCAAGAACAATCACAGGTGATACTTGTAATGAGGAGACCCAGAATCTGAGCACA
ATATATCTCAGGGAATATCAATCAAAGTTAAGAGGCAGATATTTTCAGACTATCAGTC
AGAGGTTGACATATATAACAGAATTCGGGATGAATTATGAGGATTAGGAGAAGTACCGG
AATTCATGAATAAAGTAAAATGTTATGTTTTATTTACGGCGTTACTATCCTCTCTATGT
GCATACGGAGCTCCCCAGTCTATTACAGA ACTATGTTTCGGAATATCGCAACACACAAAT
ATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATACGGAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAA
TGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGCAACATTT CAGGTCGAAGTCCCGGGCAGTCAA

CATATAGACTCCCAAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATA
TCTGACCGAGACCAAATTGATAAATTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAA
TTGCGGCAATCAGTATGGAAAAGTCTGCAGCATCACCATCACCATCACTAGTGAAAT
AGCGAAACACGGGATCGGGCGAGTTCGACCTTCCGTCCGTCTCGCCCTATTAATAGTGG
CATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGT
TACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAG
AGGCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTG
ATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGCAGGGGGG
GGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATAACCAGGAACGAGGA
CAGTCGCACGACGAAGTTCTTCTGGATCGCGCCCGTGCTGGAAGCACTCAACCTCGAAG
CGTGTGGTTGCGGAGCCATCTAGCAACCACACGAAACATGCGCAACGAACCGCGCAACG
AACACGCCTAGAACTGGCCCTAGATGAGCTGACTCGTATCGTTGGTAAACCTAGTTTG
ACCAGCATGTTTTAACTACGTTCCGGTGAGCTGTCAACGGGGCCTGTAACGGCACAACGA
ACCGTGCAACGAGAGTGGCCACGGATGCCACCACAGGCACTACAACGGAGTTCGCCACG
TACATCACCACAACCACCGATTCTGGCGGTGAGCTCCCCGATATTCAGCGGAAATGGCT
TGGTATCGACCAAGATTCGTAGAACCCCGTCTCGTCTGGCTGGTATTCAAACGGGGCG
AACGAAACACGCAACGAGACAGGCATGGCCCAAACCAGAAAAGTACGCTCTACCAGGAC
TTTTACCTGTCCGACCCGTTGCAACGGAACCCCCACGGAACCCCCGCGACACCCGCTC
CCCAATTGCGTTAGAACAGCGGTGGATTGTCGGCTTCGTTGTGGGCCTTTTGAGCCGCT
TCCTGTTCTGCCGCACGCTCTTTCCTCGCCGATAGCCGAGTCGCTTAACGGTGTCCAG
ATGCAGCCCGAAATGTTTGGCCGTTTGCGGCCAAGAGTGGCCCTCGTCGTCGTGATAGG
CGCGGATGCGTTCGCGGCGTGCAGCCTGCTCGGCGAGCCACTCGCTGCGTTCCTGCGCC
ACGAGCCGGACGACGTGGCGTTCGGATAGTCCGGTGATTTCGAGCGCCTTCGGCGGGCGGT
CACGCGCCGCTTTTTGCGGACAGTCGGCTGCCGGTTGTAGCCGTCGCTGTAGCCGTCGC
TCATAGCAATGCCTCCATGGCTGACGCGGACTTTGCGCGCCGCGCAACTGTGCTCGCCG

CCGTGCGCGCTGCTGCGCCCTTCCGCGAGATGGCCGACTGGCGCGCACTGAGTGTGGCC
TCGTAGACCACGATCCCGTCCGCCCAAATGCGCGACTTGGTTGTGATCCAACGCCAAAT
GCTGTTGGCGATGGCGCGGACCTCGCTGTCCGGTAGCGGTCCGGGACACACGTCGTTGC
ACGGGAATTCGGCGTTTCGCGCGTGGCACTCGGCATAGATCGCGCGGCCGAGTCCGTCC
ACGTTCCGGGTCCGCAGGTAGATCCGCATGAGGGCGGGACGATAGGCCACAACCTGAC
GGAATCGAACAGTGCGCAATTCGCCCTAGCGGCGTCCGAGCCGCTTTGTACGTGGTCT
GCTGACGCCAGCGCGGCGGTGGCATGTTTCGCGCCGAGCTCGGCCTCGATGTGGCTGAGT
GTGTAGAGATCTGAGTGGAGCCATTCGTTTCCCAGGCGATGTGGCCGGGGTTTTTGGT
CATGAGGCCTGAGTAACTGCGGTCGCCGTCGACGGCGCGCCGAAGGCCTTCGGCGCACG
CCGCCATGTATGCGAGCGGCTTACGCCGCGCGTATTCGGTGCGTGGAACAGGGGCGTTG
AGTGCCACACTGCGTGTGCGTGGCCGTTGGCGCGATTGCCACGATCGCGTTGGGCAG
CGGATGGGACCCCCGGGCGCTGAGCGCTCGGAGCGCTGCGTCTGGATGGTCTACGTCCA
CGACCAGCAGGTTTGCCAGCGCTGTTGGGTTTCGCTCGATGTACCGGCGGCCTAGGGCC
GACGCGCGGCTTTGGCGGTAGATCCCCTCGAGCAGATCGTCGCTTGCCAGCGGCCAGTA
CGGCAGCCAGAGCTGCTCAAATTCGTCCGCGACGTGGCTCACGCTTGGTAGTAGACCAC
GATTAATCACCGGTGTATGGTCCGACACGAGCTCCAAGTCAGATATTTTCGCTGAGGGGC
CACCCACAACACTGCACACTCCCCGCTCTCCCGTCGAGCCCTGGTGGTGGAACACCAGC
GACAGCCGAGCACCCCAACCACCTGTACCAACCAGGAGGAACACATGCGTCGTTTCGA
GGACGTTTCCGGGCCGCTGAGAGCCGCTGTGGCGGCCGTACACGCCGCCTTAGACCCGT
TAGACCCCTGCCGCCTGAATGCGCGGGTACGAGCCACACAGCGCCCGAACTTACGGAG
CTGGTGGGCTCACCTGGCTTTATGGCGTACGAATCGGCTGTGTGCGACCTGTTGGGCGA
GGTGAGGTACGCGTACTCACGCTGGCAAGGGCGACACAGCCGCCCCACCGAGCCCGCA
CGGCCGCGCGCGGTGTCAACAACCGGGTGAAGTCGTGCACACCAGCAGGTGTTTCGAGGCT
TGGCTCGAAGTGCAGGACATCGTGGCGAACGCCGCCCGATGAGCCGCGCCTTACGCTGG
CTGCCAGCCGTTTCGCGGGCTGGTTGGTGCAGCGCGTCGAGCGGTTAGAGGCCCTGCGGT

GTTCCACCACCGCAGGGCCTCGCCCTTTTTAAGGCTGAATTTGCTTGTCTCCGAATCCA
ACTGGCTTGTCCAAGGGTGTATCTACGCTTAATCCAAAGTTCAAACGAGGGGATTACAC
ATGACCAACTTCGATAACGTTCTCGGCTCGATCCTGAATCGCCCCATCATCCAGCCAGA
AAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTG
AACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTCGGGAAGATGCGTGATCTGATCCTT
CAACTCAGCAAAAGTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAAT
GCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCA
AATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAGCCGT
TTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTCACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTA
TCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAA
AAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGC
AAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATC
AAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAA
ATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGG
AACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTG
GAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGA
TAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATC
TCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGC
ATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAG
CCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAA
GACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGA
CAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTT
GAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTA
AGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA
AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA

AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCT
 AGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTC
 CACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCT
 GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCG
 CGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATA
 CCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
 ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA
 AGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCG
 GGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
 GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG
 ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGG
 GGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG
 ATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCT
 TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCC
 CCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAG
 CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA

c) Construção do vetor de expressão do gene LTAK63 em BCG recombinante aqui denominado de pLN12-LTAK63: o vetor de expressão em BCG recombinante do gene LTAK63 foi construído usando métodos convencionais de biologia molecular. O gene LTAK63 foi amplificado por PCR a partir do gene LTK63 usando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

N-terminal (5'-
TAGGGATCCAATGGCGACAGATTATACCGTTG-3'), contendo o sítio de restrição BamH I (sublinhado) e C-terminal (5'-

TAGGGTACCTAATTCATCCCGAATTCTGTTATA-3'), contendo o sítio de restrição Kpn I (sublinhado). O produto de PCR correspondente ao gene LTAK63 foi gerado usando as seguintes condições de PCR: 94°C por 4 minutos; 25 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 30 s; e 4°C final. Esse produto de PCR foi então digerido com as enzimas de restrição BamH I e Kpn I e então clonado no vetor de expressão pMIP12, que foi também previamente digerido com as mesmas enzimas BamH I e Kpn I, gerando assim o vetor de expressão denominado de pLNIP-LTAK63.

Sequência gênica do plasmídeo pNL12-LTAK63

GCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAG
 CTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
 GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTG
 TGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGA
 ATTCGAGCTCGACTTAATTA ACTCCGGGTGGTCACTGAGTACATCCCGTCGGTGCGTTC
 GGCATCGGTCTGGGGTGTGGGTGGGTGTCTGGCTCCCGCGACGAAGGACGAAGCGTCTCGCG
 GTGCCGCCACTTCTTGGAGCATCTGCTGTTCAAGGCCACCCGACGCGCACGCGGTCTG
 ACATCGCGCAGGCTGTTCGATGCCGTCGGCGGTGAGCTGAACGCGTTCACCACGCGCGAG
 CACACCTGTTACTACGCGCATGTGCTCGACTCCGACCTGGAGCTCGCGGTCTGACCTGGT
 GCGCCGATGTCGTGTTGCGTGGGCGTTGTGCCACCGAGGATGTCGAAGTGGAGCGCGAC
 GTCGTCCTCGAGGAGATCGCCATGCGTGACGACGATCCCGAGGACAGCCTCGGGCAGCT
 GTTCTCTCGGCGATGTTTCGGCGATCACCCGGTGGGACGTCCGGTGATCGGCAGCGTCTG
 AGTCGATCGAGACCATGACGCGTGCACAGCTGCATTCGTTCCACGTCCGGCGTTACACA
 CCCGAACGGATGATCGTGGCGGTGGCCGGCAACGTCGACCACGACGTGTGGTGTCTGTTG

GTCCGAGAGCATTTCGGCCCCGGCTGGAGGCCGACGTTCCGCGGTGGCTCCCCGTAAG
GCTCGGGACGGGTTCGGTGGTAAGCCATCGCTGCTCGTGGTCGACCGCGACGGGGAACAG
TCCCATGTCTCGCTGGGCGTTCGCACGCCCGCCGGCACTGGGAGCACCGGTGGGCCCT
GTCGGTGTGTAACACCGCGCTGGGAGGCGGGCTCAGTTCTCGTCTGTTCCAACAGATTC
GCGAGTCCCGCGGCCTGGCCTACCTCGGTGTACTCGACCGTGGACCACTTCGCGACAGC
GGGGCTCTGTCGGTGTATGCGGGATGTCAGCCGGAACGTTTCGACGAAGTGGTGCGGGT
GACCACCGAAGTTTTGGAAGGTGTTGCCAGAGACGGGATCACCGCCGACGAATGCCGGA
TCGCCAAAGGCTCGTTGCGCGGTGGGCTGGTGCTCGGCCTGGAGGATTCCGGATCACGT
ATGCACCGGATCGGCCGTAGCGAGCTCAATTACGGTGgAGCACCGGACCATCGACCACA
CGCTGGCCCAGATCGAGGCAGTCACTCTAGAAGAGGTCAACGCCGTCGCTCACCAGTTG
CTGTGCGGGACTACGGTGCCGCCGTA CTGGTCCCTATAGTTTCGAAAAGGCGCTGCC
ACAACAGCTTCAA ACTATCGCCGGCTGACCCGCTACACTGGGTCCAATGGATTAGAAGG
AGAAGTACCGATGGGATCCGGTACCAATGGCGACAGATTATACCGTGCTGACTCTAGAC
CCCCAGATGAAATAAAACGTTCCGGAGGTCTTATGCCCAGAGGGCATAATGAGTACTTC
GATAGAGGAACTCAAATGAATATTAATCTTTATGATCACGCGAGAGGAACACAAACCGG
CTTTGTCAGATATGATGACGGATATGTTTCCACTAAGCTTAGTTTGAGAAGTGCTCACT
TAGCAGGACAGTCTATATTATCAGGATATTCCACTTACTATATATATGTTATAGCGACA
GCACCAAATATGTTTAATGTTAATGATGTATTAGGCGTATACAGCCCTCACCCATATGA
ACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTGGAATACCATATTCTCAGATATATGGATGGTATCGTG
TTAATTTTGGTGTGATTGATGAACGATTACATCGTAACAGGGAATATAGAGACCGGTAT
TACAGAAATCTGAATATAGCTCCGGCAGAGGATGGTTACAGATTAGCAGGTTTCCCACC
GGATCACCAAGCTTGGAGAGAAGAACCCTGGATTCATCATGCACCACAAGGTTGTGGAA
ATTCATCAAGAACAATCACAGGTGATACTTGTAATGAGGAGACCCAGAATCTGAGCACA
ATATATCTCAGGGAATATCAATCAAAGTTAAGAGGCAGATATTTTCAGACTATCAGTC
AGAGGTTGACATATATAACAGAATTCGGGATGAATTATGACTGCAGCATCACCATCACC

ATCACTAGTGAAATAGCGAAACACGGGATCGGGCGAGTTCGACCTTCCGTCCGGTCTCGC
CCTATTAATAGTGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTGTTTTACAACGTCGTGACTGG
GAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTG
GCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG
GCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGC
ATATGCAGGGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCAT
ACCAGGAACGAGGACAGTCGCACGACGAAGTTCTTCTGGATCGCGCCCGTGCTGGAAGC
ACTCAACCTCGAAGCGTGTGGTTGCGGAGCCATCTAGCAACCACACGAAACATGCGCAA
CGAACCGCGCAACGAACAACGCCTAGAACTGGCCCTAGATGAGCTGACTCGTATCGTTG
GTAAACCTAGTTTGACCAGCATGTTTTAACTACGTTCCGGTGAGCTGTCAACGGGGCCTG
TAACGGCACAACGAACCGTGCAACGAGAGTGGCCACGGATGCCACCACAGGCACTACAA
CGGAGTTCGCCACGTACATCACCACAACCACCGATTCTGGCGGTGAGCTCCCCGATATT
CAGCGGAAATGGCTTGGTATCGACCAAGATTTCGTAGAACCCCGTCTCGTCTGGCTGGTA
TTCAAACGGGCGCAACGAAACACGCAACGAGACAGGCATGGCCCAAACCAGAAAATA
GCGTCTACCAGGACTTTTACCTGTCCGACCCGTTGCAACGGAACCCCCACGGAACCCC
CGCGACACCCGCTCCCCAATTGCGTTAGAACAGCGGTGGATTGTCCGGCTTCGTTGTGGG
CCTTTTGAGCCGCTTCCTGTTCTGCCGCACGCTCTTTCCTCGCCCGATAGCCGAGTCGC
TTAACGGTGTCCAGATGCAGCCCGAAATGTTTGGCCGTTTTCGGCCAAGAGTGGCCCTC
GTCGTGATAGGCGCGGATGCGTTCGCGGCGTGCAGCCTGCTCGGCGAGCCACTCGC
TGCGTTCCTGCGCCACGAGCCGGACGACGTGGCGTTCGGATAGTCCGGTGATTCGAGCG
CCTTCGGCGGCGGTACGCGCCGCTTTTTGCGGACAGTCGGCTGCCGGTTGTAGCCGTC
GCTGTAGCCGTCGCTCATAGCAATGCCTCCATGGCTGACGCGGACTTTGCGCGCCGCGC
AACTGTGCTCGCCGCCGTGCGCGCTGCTGCGCCCTTCCGCGAGATGGCCGACTGGCGCG
CACTGAGTGTGGCCTCGTAGACCACGATCCCGTCCGCCCAAATGCGCGACTTGGTTGTG
ATCCAACGCCAAATGCTGTTGGCGATGGCGCGGACCTCGCTGTCCGGTAGCGGTCCGGG

ACACACGTCGTTGCACGGGAATTCGGCGTTCGCGCGTGGCACTCGGCATAGATCGCGC
GGCCGAGTCCGTCCACGTTCCGGGTCGGCAGGTAGATCCGCATGAGGGCGGGACGATAG
GCCACAACCTGACGGAATCGAACAGTGCGCAATTCGCCCTAGCGGCGTCCGAGCCGC
TTTGTACGTGGTCTGCTGACGCCAGCGCGGCGGTGGCATGTTGCGCGCCGAGCTCGGCCT
CGATGTGGCTGAGTGTGTAGAGATCTGAGTGGAGCCATTCCGTTTCCCAGGCGATGTGG
CCGGGGTTTTTGGTCATGAGGCCTGAGTAACTGCGGTGCGCGTCGACGGCGCGCCGAAG
GCCTTCGGCGCACGCCGCCATGTATGCGAGCGGCTTACGCCGCGCGTATTCCGGTGCCTG
GAACAGGGGGCGTTGAGTGCCCACTGCGTGTGCGTGGCCGTTGGCGCGATTGCCACG
ATCGCGTTGGGCAGCGGATGGGACCCCCGGGCGCTGAGCGCTCGGAGCGCTGCGTCTGG
ATGGTCTACGTCCACGACCAGCAGGTTTGCCAGCGCTGTTGGGTTGCGCTCGATGTACC
GGCGGCC TAGGGCCGACGCGCGGCTTTGGCGGTAGATCCCCTCGAGCAGATCGTTCGCTT
GCCAGCGGCCAGTACGGCAGCCAGAGCTGCTCAAATTCGTGCGCGACGTGGCTCACGCT
TGGTAGTAGACCACGATTAATCACCGGTGTATGGTCCGACACGAGCTCCAAGTCAGATA
TTTCGCTGAGGGGCCACCCACAACCTGCACACTCCCCGCTCTCCCGTCGAGCCCTGGT
GGTGGAACACCAGCGACAGCCGAGCACCCCAACCACCTGTACCAACCAGGAGGAACAC
ATGCGTCGTTTCGAGGACGTTTCCGGGCCGCTGAGAGCCGCTGTGGCGGCCGTACACGC
CGCCTTAGACCCGTTAGACCCCTGCCGCTGAATGCGCGGGTACGAGCCACACAGCGC
CCGAACTTACGGAGCTGGTGGGCTCACCTGGCTTTATGGCGTACGAATCGGCTGTGTGC
GACCTGTTGGGCGAGGTGAGGTACGCGCTACTCACGCTGGCAAGGGCGACACAGCCGCC
CCACCGAGCCCGCACGGCCGCGCGGGTGTCAACAACCGGGTGAGTCGTGCACACCAGC
AGGTGTTGAGGCTTGGCTCGAAGTGCAGGACATCGTGGCGAACGCCGCCCGATGAGCC
GCGCCTTACGCTGGCTGCCAGCCGTTGCGGGGCTGGTTGGTGCAGCGCGTCGAGCGGTT
AGAGGCCCTGCGGTGTTCCACCACCGCAGGGCCTCGCCCTTTTTAAGGCTGAATTTGCT
TGTCTCCGAATCCAACCTGGCTTGTCCAAGGGTGTATCTACGCTTAATCCAAAGTTCAA
CGAGGGGATTACACATGACCAACTTCGATAACGTTCTCGGCTCGATCCTGAATCGCCCC

ATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACC
AGTTGGTGATTTTGAACCTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTCGGGAAGATGC
GTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAGTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCGTCCCGT
CAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAA
CTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATT
TTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACCGAGGCAGTTCATAGGATG
GCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAA
TTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAAT
CCGGTGAGAATGGCAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCA
TTACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGC
CTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAAT
GCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATAT
TCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATC
ATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGT
TTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGA
AACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCC
GACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATC
GCGGCCTCGAGCAAGACGTTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTG
TTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTA
ACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCCTATCATTGCAGCACT
GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGG
TAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTA
ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAAC
GTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA

GATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGC
GGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCA
GCAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC
AAGAACTCTGTAGCACCCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC
TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA
AGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACG
ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA
AGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGA
GGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTC
TGACTIONGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC
CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCT
TTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGAT
ACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA

d) Obtenção da cepa de BCG recombinante expressando LTK63, rBCG-LTK63: para preparação de rBCG-LTK63, uma alíquota estoque de 50-200 μ l de BCG competente foi misturada com 0,1-1 μ g de pNL12-LTK63, em cubetas de eletroporação de 2 mm e esta submetida a pulsações de 2,5 kV, 25 μ F e 1000 Ω , num eletroporador de pulsação (GenePulser, BioRad, Hemel Hempstead, UK). Após eletroporação, o conteúdo das cubetas foi recuperado em 2 mL de meio (MB7H9/Tw/ADC) sem antibiótico e incubado a 37°C por 20 h antes de ser semeado em meio sólido Middlebrook 7H10 (Difco), suplementado com ácido oléico-albumina-dextrose-catalase 10% (MB7H10/OADC) mais canamicina (20

µg/mL) para seleção dos transformantes. Composição aproximada do meio sólido Middlebrook 7H10 de acordo com o fabricante (Difco-BD): Sulfato de Amônio, Mono-fosfato de Potássio, Bi-Fosfato de Potássio, Citrato de Sódio, Sulfato de Magnésio, Cloreto de Cálcio, Sulfato de Zinco, Sulfato de Cobre Ácido L-Glutâmico, Citrato de Amônio Férrico, Hidroclorato de Piridoxina, Biotina, Verde de Malaquita e Agar. As colônias de rBCG selecionadas foram então transferidas para 5 mL de meio líquido de cultura MB7H9/Tw/ADC com canamicina (20 µg/mL).

e) Obtenção da cepa de BCG recombinante expressando a subunidade A LTAK63, rBCG-LTAK63: para preparação de rBCG-LTAK63, uma alíquota estoque de 50-200 µl de BCG competente foi misturada com 0,1-1 µg de pLN12-LTAK63, em cubetas de eletroporação de 2 mm e esta submetida a pulsações de 2,5 kV, 25 µF e 1000 Ω, num eletroporador de pulsação (GenePulser, BioRad, Hemel Hempstead, UK). Após eletroporação, o conteúdo das cubetas foi recuperado em 2 mL de meio (MB7H9/Tw/ADC) sem antibiótico e incubado a 37°C por 20 h antes de ser semeado em meio sólido Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com ácido oléico-albumina-dextrose-catalase 10% (MB7H10/OADC) mais canamicina (20 µg/mL) para seleção dos transformantes. Composição aproximada do meio sólido Middlebrook 7H10 de acordo com o fabricante (Difco-BD): Sulfato de Amônio, Mono-fosfato de

Potássio, Bi-Fosfato de Potássio, Citrato de Sódio, Sulfato de Magnésio, Cloreto de Cálcio, Sulfato de Zinco, Sulfato de Cobre Ácido L-Glutâmico, Citrato de Amônio Férrico, Hidroclorato de Piridoxina, Biotina, Verde de Malaquita e Agar. As colônias de rBCG selecionadas foram então transferidas para 5 mL de meio líquido de cultura MB7H9/Tw/ADC com canamicina (20 µg/mL).

f) Preparação dos lotes de rBCG-LTK63 e rBCG-LTAK63:

Em seguida, os clones destas duas cepas foram expandidos para 50 mL de meio líquido MB7H9/Tw/ADC ou em qualquer meio descrito para cultivo de micobactérias mais canamicina (20 µg/mL). Após 2-3 semanas, quando o cultivo atinge DO_{600} 0,6-0,8, as amostras foram centrifugadas, lavadas duas vezes com H₂O destilada, resuspendidas em 1 mL de glicerol 10% e aliqüotadas em volume de 50 µl e então armazenadas a -80°C, para posterior utilização nos ensaios de imunização.

g) Avaliação dos Lotes de rBCG-LTK63 e rBCG-LTAK63: a viabilidade dos lotes de rBCG-LTK63 e rBCG-LTAK63 foi avaliada por meio de contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC). O número de UFC foi determinado como segue: uma ou mais aliqüotas do lote congelado a -80°C foram descongeladas e realizadas várias diluições sucessivas (1×10^2 , 1×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6). Em seguida as diluições 1×10^5 e 1×10^6 foram plaqueadas em meio MB7H10/OADC mais kanamicina (20 µg/mL) e incubadas a 37°C.

Após 3-4 semanas fez-se a contagem do número de colônias na placa.

h) Caracterização da expressão de LTK63 em BCG recombinante

Uma vez que não foi possível determinar a expressão do gene LTK63 pelo método clássico de imunensaio, a caracterização da expressão LTK63 foi realizada de maneira indireta pela confirmação da presença do gene LTK63 no plasmídeo dentro do BCG recombinante. Essa caracterização foi realizada através de ensaio de PCR utilizando iniciadores específicos, os mesmos já descritos acima e utilizados para amplificar e clonar o gene LTK63 no vetor pMIP12 (Figura 1).

i) Caracterização da expressão LTAK63 em BCG recombinante

Para verificação da expressão do gene LTAK63, foi utilizado um imunensaio (Western blot), usando um soro policlonal anti-LT, procedendo-se da seguinte maneira: uma ou mais alíquotas estoques de rBCG-LTAK63 foram sonicadas por 1,5 min sob gelo numa amplitude constante correspondente a metade do valor máximo (Soniprep 150 MSE, UK) e centrifugadas para precipitação de sólidos. Os sobrenadantes foram recuperados e a concentração de proteínas dosada usando o kit BIO-RAD Protein Assay (Bio-Rad), utilizando albumina bovina como padrão. Amostras

contendo 10 µg de proteínas totais foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% em presença de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 120 V até o corante atingir o final do gel. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PDVF com poros de 0,45 µm (GE Healthcare), utilizando-se um sistema de transferência semi-seco. O gel contendo LT, como controle positivo, foi colado sob a membrana de PDVF, mergulhado em tampão de transferência (Tris 0,25 M, pH 8,3, glicina 0,129 M e metanol 20 %) e colocados entre cinco folhas de filtro também embebidos no mesmo tampão. O conjunto foi colocado entre duas placas e submetido a uma corrente de 120 mA por 1,5 h a temperatura ambiente. Ao final da eletrotransferência, a membrana foi retirada do sistema e incubada em solução bloqueadora (PBS contendo leite 5% - PBS-L) a 4°C, durante toda noite. Ao término do bloqueio, a membrana foi incubada a temperatura ambiente por 2 h com soro anti-LT diluído em PBS-L (diluição 1:1000). Após este período de incubação a membrana de PVDF foi lavada três vezes, sob leve agitação, com PBS/Tween20 0,1% (PBS-T), em intervalos de 10 min. A membrana foi então incubada por 2 h nas mesmas condições em PBS-L contendo anticorpo anti-IgG conjugado a HRP (Sigma, Chem Co, St. Luis) e novamente lavada 3 vezes com PBS-T. A revelação foi feita por quimiluminescência usando o kit ECL

(Amersham) por exposição em aparelho de fotodocumentação (ImageQuant LAS4000 - GE) (Figura 2).

EXEMPLO 2: Ensaio de resposta imunológica humoral e celular dos animais imunizados com rBCG-LTK63.

[78] Foram utilizados camundongos das linhagens BALB/c (*Mus musculus*, Rodentia, Mammalia), fêmeas, adultas, com 6 a 8 semanas de vida, provenientes e mantidos nas condições padrões do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

[79] Os animais foram divididos em três grupos (n=30):

- **Grupo BCG:** animais imunizados por via subcutânea (s.c.) com 0,1 mL de suspensão de BCG (1×10^6 UFC/camundongo suspensas em PBS 1X);
- **Grupo rBCG-LTK63:** animais imunizados por via subcutânea (s.c.) com 0,1 mL de suspensão de rBCG-LTK63 (1×10^6 UFC/camundongo suspensas em PBS 1X);
- **Grupo rBCG-LTKA63:** animais imunizados por via subcutânea (s.c.) com 0,1 mL de suspensão de rBCG-LTKA63 (1×10^6 UFC/camundongo suspensas em PBS 1X);
- **Grupo Controle:** animais inoculados com 0,1 mL de salina (PBS 1X).

a) Resposta humoral: para tal procedimento, os animais imunizados ou inoculados com o controle, foram sangrados pela via retro-orbital um dia antes do desafio e o soro

separado e aliquotado para posterior caracterização pelo método de ELISA. A análise da resposta humoral foi realizada comparando a concentração dos anticorpos e/ou subtipos IgG1 e IgG2a específicos contra PDS nos diferentes grupos de imunização. Para tal foi utilizada a curva padrão desses anticorpos detectados por anticorpos monoclonais específicos contra as respectivas imunoglobulinas. A análise comparativa da resposta de anticorpos IgG1 e IgG2a induzida contra proteínas de micobactérias (PDS) é importante, uma vez que pode fornecer dados sobre o perfil ou comportamento da resposta imune contra essas proteínas. Destacando que um perfil que mostra uma resposta alterada de Th1 e, portanto mais adequado para combater uma infecção por MTB, pode ser identificado através da relação IgG1/IgG2a (Figuras 3 e 4).

b) Resposta celular: a avaliação da resposta celular dos grupos Salina, BCG e rBCG-LTK63 foi feita pelos métodos de ELISA e ELISPOT. Inicialmente os baços dos camundongos imunizados como descrito acima, foram removidos 30 dias após a primeira e única imunização, macerados e passados por peneiras com porosidade de 70 μm (*Cell strainer*-BD Falcon, Bedford, MA). Os esplenócitos, assim obtidos, de cada grupo (Salina, BCG e rBCG-LTK63) foram contados em câmara de *Neubauer* e tiveram sua viabilidade avaliada através da coloração de azul de *Trypan*. Procedeu-se, então,

à diluição celular em meio RPMI completo [RPMI 1640 (GIBCO Life Technologies), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) mais 10% de soro fetal bovino], na concentração de 2×10^6 células/mL no ensaio de ELISA e 1×10^5 células/mL no ensaio de ELISPOT, seguida de semeadura em placa de cultura celular de 24 poços sob o estímulo de PDS (2 µg/mL) e incubadas por 24 horas e 48 horas, respectivamente, a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%.

[80] No grupo tratado com rBCG-LTK63 observou-se um aumento significativo nos níveis de INF-γ e TNF-α em relação ao grupo BCG. Fato este, que sinaliza para uma resposta polarizada do tipo Th1 (Figuras 4 e 5).

EXEMPLO 3: Desenvolvimento do modelo animal de desafio contra tuberculose.

[81] Foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6 ou BALB/c (*Mus musculus*, Rodentia, Mammalia), fêmeas, adultas, com 6 a 8 semanas de vida, provenientes e mantidos nas condições padrões do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

[82] Utilizou-se para os ensaios de desafio a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) 37HRv, a qual foi cultivada em meio líquido MB7H9/Tw/ADC em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A suspensão bacilar de MTB foi cultivada em meio MB7H9/Tw/ADC por duas semanas e somente suspensões com no

mínimo de 80% de bacilos viáveis foram usados para o desafio pela via intratraqueal. O cultivo bacilar foi centrifugado a 4000 rpm e lavados duas vezes com igual volume do cultivo com PBS 1X. Em seguida o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de PBS 1X e o número de bacilo estimado usando a escala de Macfarland.

[83] O desafio intratraqueal seguiu o método previamente descrito [Pelizon et al. (2010) Neonatal BCG immunization followed by DNAhsp65 boosters: highly immunogenic but not protective against tuberculosis - a paradoxical effect of the vector? Scand J Immunol. 71: 63-69]. Os camundongos foram infectados com 1×10^5 UFC de MTB viáveis ou inoculados com 100 μ L de PBS (Tampão Fosfato Salina) intratraquealmente sob anestesia (200 μ L de uma mistura de Quetamina/Xilazina)

Os animais foram acompanhados por quatro semanas. Após este período todos foram sacrificados em câmara de CO₂ e os pulmões retirados para serem processados. Um dos lóbulos de cada pulmão foi separado e macerado num volume total de 1 mL de solução de PBS 1X. Em seguida esse material foi diluído serialmente e semeado em placas de petri contendo meio sólido MB7H10/OADC. Trinta dias depois, o número de UFC foi determinado nas placas correspondentes a cada grupo de animais imunizados (Figura 6).

REIVINDICAÇÕES

1. Cepa de *Mycobacterium* recombinante **caracterizada pelo** fato de que codifica a toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada.

2. Cepa de *Mycobacterium* recombinante **caracterizada pelo** fato de que codifica a subunidade A da toxina termo-lábil LT de *Escherichia coli* mutada.

3. Cepa de *Mycobacterium* recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2 **caracterizada pelo** fato de que a toxina termo-lábil LT *Escherichia coli* é mutada na posição 63.

4. Cepa de *Mycobacterium* recombinante de acordo com a reivindicação 3 **caracterizada pelo** fato de que a mutação é uma substituição de serina por lysina.

5. Cepa de *Mycobacterium* recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 **caracterizada pelo** fato de que é selecionada do grupo consistindo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microft*, *Mycobacterium africanum*, ou *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium vaccae*, etc.

6. Cepa de *Mycobacterium* recombinante de acordo com a reivindicação 5 **caracterizada pelo** fato de que a cepa de *Mycobacterium* recombinante é uma cepa de *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG).

7. Composição imunogênica **caracterizada pelo** fato de compreender ao menos uma cepa de *Mycobacterium* recombinante conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e um ou mais dentre um veículo, excipiente, diluente ou solvente fisiologicamente aceitáveis.

8. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 7 **caracterizada pelo** fato de compreender adicionalmente um ou mais antígenos.

9. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8 **caracterizada pelo** fato de ser para administração intradérmica, oral ou parenteral.

10. Uso de uma ou mais cepas de *Mycobacterium* recombinantes conforme definidas nas reivindicações 1 a 6 ou de uma ou mais composições imunogênicas, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 7 a 9, **caracterizado pelo** fato de ser na manufatura de uma vacina.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10 **caracterizado pelo** fato de ser na manufatura de uma vacina para prevenção e/ou tratamento de doenças e/ou infecções causadas por bactérias do gênero *Mycobacterium*.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11 **caracterizado pelo** fato de ser na manufatura de uma vacina para prevenção e/ou tratamento de doenças e/ou infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis*.

13. Uso de acordo com a reivindicação 11

caracterizado pelo de ser na manufatura de uma vacina para prevenção e/ou tratamento de tuberculose.

14. Método de prevenir ou tratar doenças e/ou infecções causadas por bactérias do gênero *Mycobacterium* em animais **caracterizado por** ser administrada aos animais uma quantidade efetiva de uma ou mais cepas de *Mycobacterium* recombinantes conforme definidas nas reivindicações 1 a 6 ou de uma ou mais composições imunogênicas, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 7 a 9.

15. Método de prevenir ou tratar tuberculose em animais, **caracterizado por** ser administrada aos animais uma quantidade efetiva de uma ou mais cepas de *Mycobacterium* recombinantes conforme definidas nas reivindicações 1 a 6 ou de uma ou mais composições imunogênicas, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 7 a 9.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 ou 15, **caracterizado pelo** fato de que o animal é um mamífero.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado pelo** fato de que o mamífero é um humano.



Figura 1.

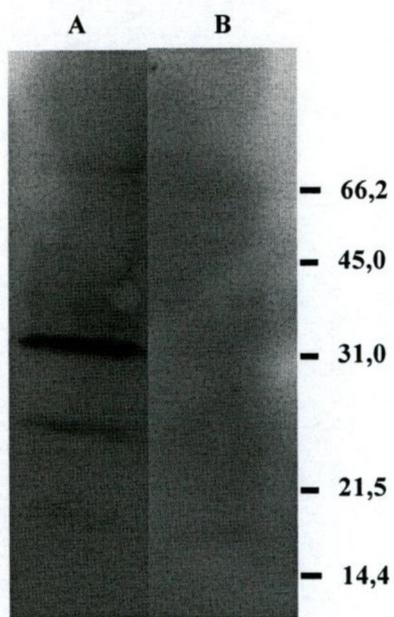


Figura 2.

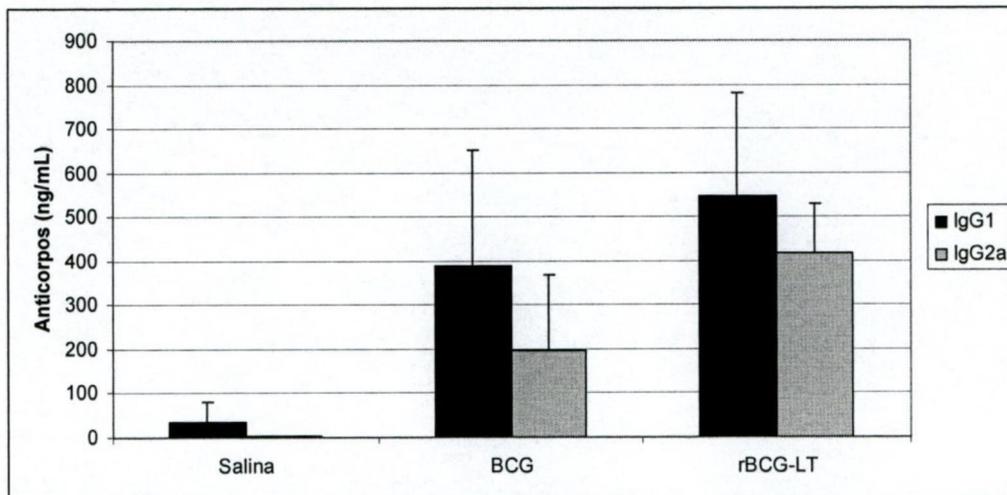


Figura 3.

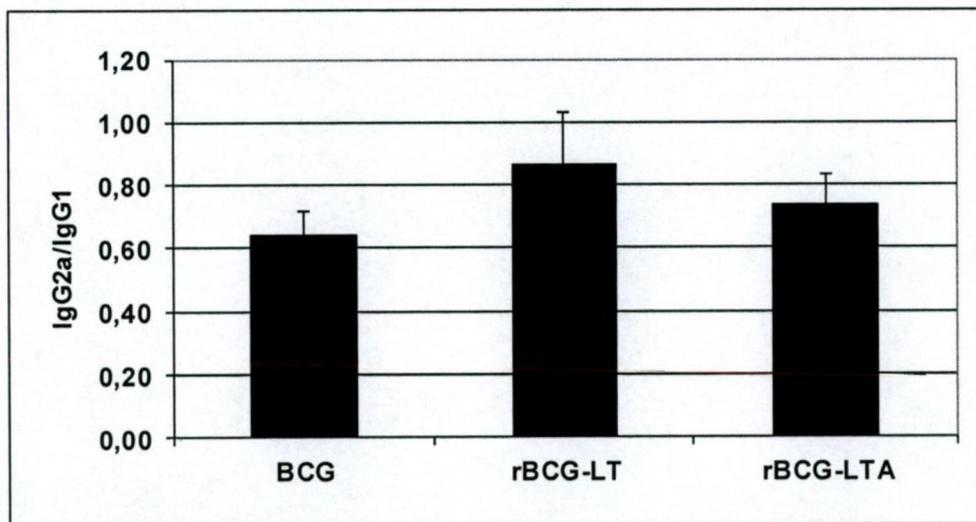


Figura 4.

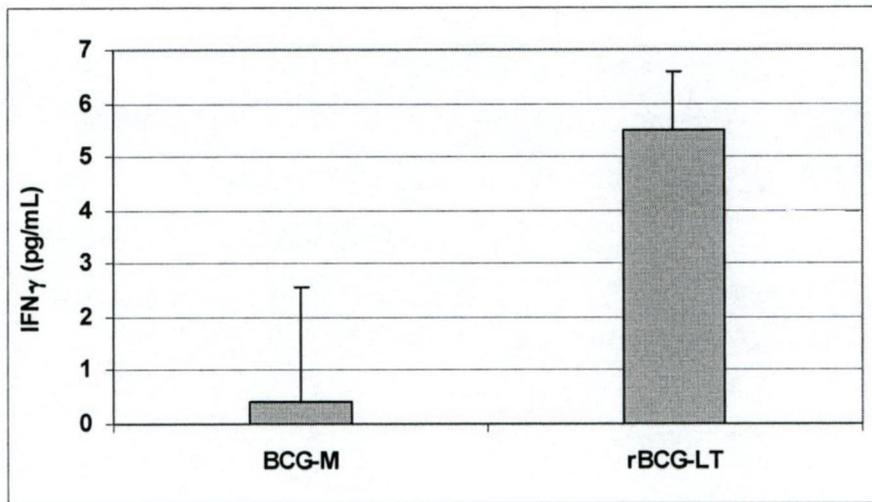


Figura 5.

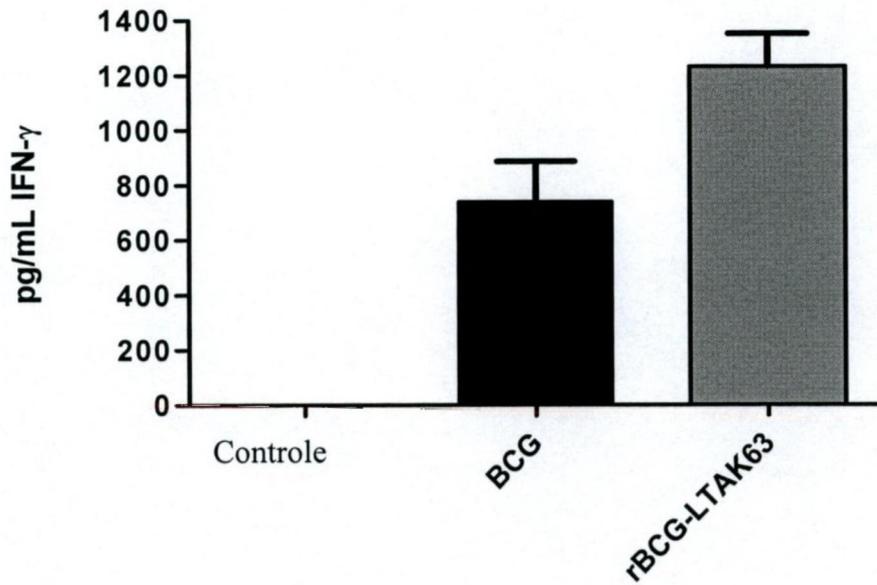


Figura 6.

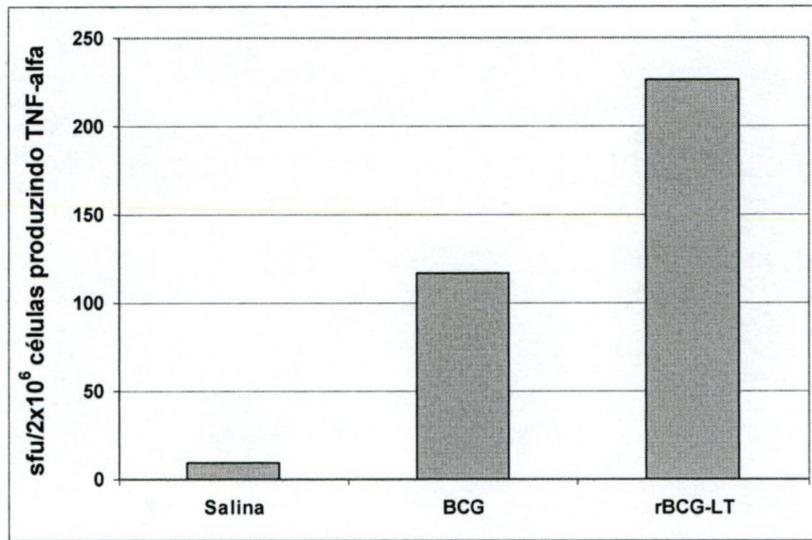


Figura 7.

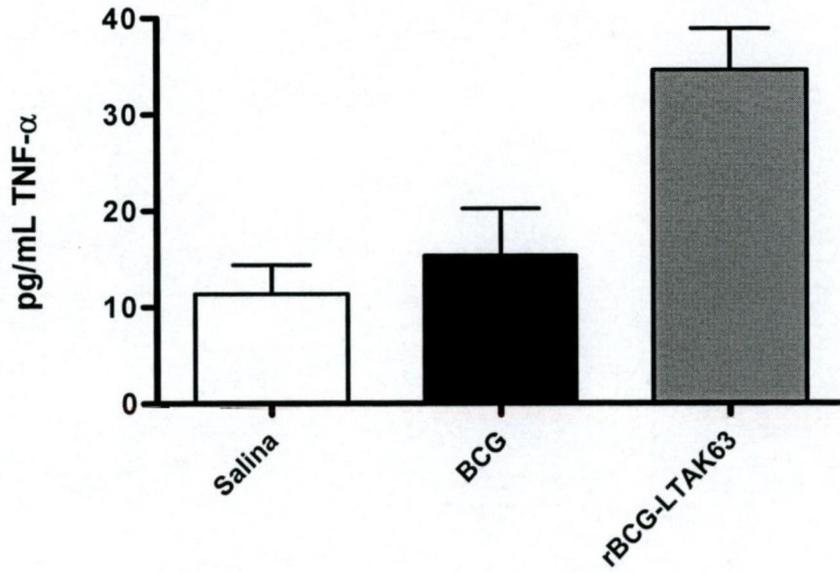


Figura 8.

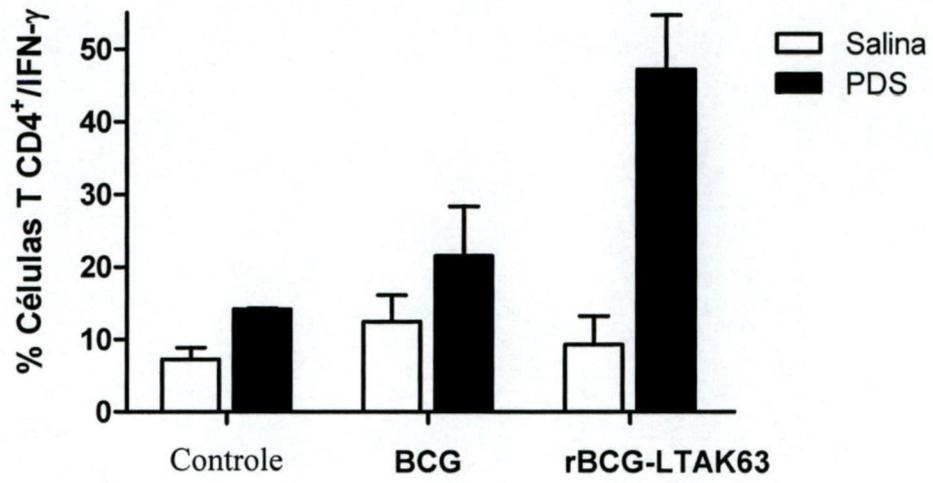


Figura 9

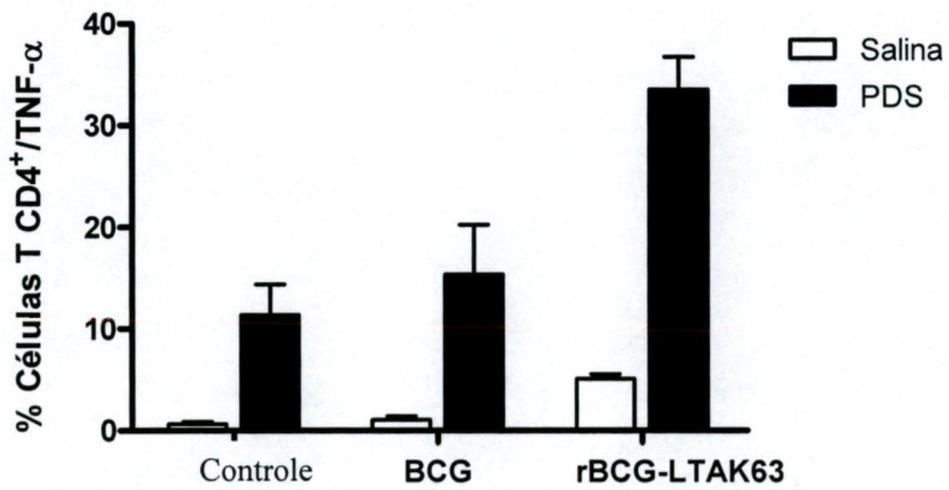


Figura 10.

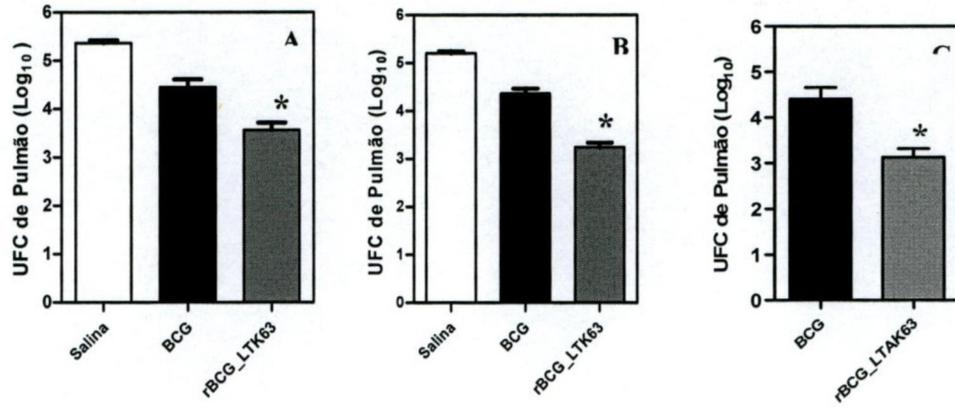


Figura 11.

Resumo da Patente de Invenção para: **"CEPA DE MYCOBACTERIUM RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA E USO."**

A presente invenção refere-se a cepas de Mycobacterium recombinantes que codificam a toxina termo-lábil LT de Escherichia coli mutada ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de Escherichia coli mutada. A presente invenção refere-se também a cepas de Mycobacterium que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de Escherichia coli mutadas na posição 63. Especificamente, a presente invenção refere-se a cepas de Mycobacterium que codificam a toxina termo-lábil LT ou a subunidade A da toxina termo-lábil LT de Escherichia coli mutadas na posição 63 de serina para lisina. A presente invenção fornece também composições imunogênicas que compreendem as cepas da presente invenção. A presente invenção prevê ainda o uso das referidas cepas e composições imunológicas na manufatura de vacina para prevenção contra tuberculose e infecções causadas por Mycobacterium tuberculosis. Por último, a presente invenção refere-se a métodos de prevenir ou tratar tuberculose em animais.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



4B5A4A6293D3EEBC

Campo 2



09F98A3D687DA253

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: PCTBR2013000049.txt
- Data de Geração do Código: 15-08-2014
- Hora de Geração do Código: 12:25:59
- Código de Controle:
 - Campo 1: 4B5A4A6293D3EEBC
 - Campo 2: 09F98A3D687DA253