



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº BR 102012024276-1

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** BR 102012024276-1

**(22) Data do Depósito:** 25/09/2012

**(43) Data da Publicação Nacional:** 05/08/2014

**(51) Classificação Internacional:** A61K 39/04; A61P 1/12; A61P 37/04; C12N 1/21; C12N 15/31; C12N 15/74; C12R 1/32; C12R 1/34.

**(54) Título:** MÉTODO E ENSAIO PRÉ-CLÍNICO PARA OBTENÇÃO DE VACINA USANDO BACILO CALMETTE-GUÉRIN (BCG) E MYCOBACTERIUM SMEGMATIS QUE EXPRESSAM OS FATORES DE VIRULÊNCIA BFFA E INTIMINA DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)

**(73) Titular:** INSTITUTO BUTANTAN, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 61821344000156. Endereço: AV. VITAL BRASIL, 1500, BUTANTÃ, SÃO PAULO, SP, BRASIL(BR), 05503900, Brasileira

**(72) Inventor:** WILMAR DIAS DA SILVA; HALYKA LUZÓRIO FRANZOTTI VASCONCELLOS; IVAN PEREIRA NASCIMENTO; KARINA SCARAMUZZI; ANDRÉ KIPNIS; JORGE M. DA COSTA FERREIRA JUNIOR; CECÍLIA M. ABE; ROXANE M. F. PIAZZA.

**Código de Controle:** 84D02161335F4729 F8E4816753F4AE26

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 25/09/2012, observadas as condições legais

**Expedida em:** 11/05/2021

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**MÉTODO E ENSAIO PRÉ-CLÍNICO PARA OBTENÇÃO DE VACINA USANDO BACILO CALMETTE-GUÉRIN (BCG) E MYCOBACTERIUM SMEGMATIS QUE EXPRESSAM OS FATORES DE VIRULÊNCIA BFP A E INTIMINA DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)**

CAMPO DE APLICAÇÃO

[0001] A presente invenção se refere ao método para obtenção de vacina usando bacilo Calmette-Guérin (BCG) (vacina contra a tuberculose) e *Mycobacterium smegmatis* (espécie bactéria álcool-ácido resistente do gênero *Mycobacterium*) expressando os fatores de virulência do gene *bfpA* e *intimina* de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). A cepa vacinal da presente invenção é empregada para ativar o sistema imunológico a produzir proteção local a desafios com cepas virulentas de EPEC. A cepa MC155 *Mycobacterium smegmatis* e a cepa Moreau de *Mycobacterium bovis* (BCG) foram cedidas pelo Instituto Butantan.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

*Escherichia coli* Enteropatogênicas

[0002] Diarreias são infecções que respondem por aproximadamente 3,3 a 6 milhões de mortes anuais de crianças. África, Ásia e América Latina são os continentes mais afetados. Cerca de 3 a 20% dos episódios de diarreia aguda em crianças menores de cinco anos tornam-se persistentes. Diarreias persistentes são os episódios diarreicos com duração igual ou superior a 14 dias. Os agentes mais frequentes nos isolados de fezes de crianças com diarreia persistente são *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *Salmonella*, *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Klebsiella* e *Cryptosporidium*.

[0003] Entre os vários patógenos que causam diarreias, *Escherichia coli*, coletivamente designadas enterovirulentas, constituem uma das causas mais comuns, particularmente nos países em desenvolvimento.

#### Descrição da bactéria

[0004] *E. coli* é a bactéria mais abundante na microbiota normal intestinal (cerca de 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias/g de fezes). A maioria dos isolados dessa bactéria não produz doença. Pelo contrário, protege contra infecções competindo com bactérias patogênicas por espaço e nutrientes no habitat intestinal. *E. coli* produz substâncias antimicrobianas, como as colicinas, que impedem a colonização do intestino por outras bactérias. A população de *E. coli* da microbiota intestinal, quando reduzida por antibióticos, é frequentemente substituída por patógenos intestinais. Cepas de *E. coli* da microbiota intestinal normal foram e têm sido usadas como modelo em tecnologia de DNA/RNA e obtenção de proteínas recombinantes. Grande parte dos conhecimentos que se tem hoje de biologia molecular foi obtida usando *E. coli* como modelo experimental.

[0005] *E. coli* é um bacilo curto que não forma esporos, Gram negativo, às vezes com fimbrias e que cresce em meios de cultura simples ou sintéticos nos quais glicerol ou glicose são as únicas fontes de nutrientes. Sua membrana celular é revestida por uma parede de estrutura complexa que contém moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) ou endotoxinas O e de componentes dos flagelos H (ver Figura 1).

[0006] Durante o crescimento *E. coli* fermenta lactose, produz indol, dá reação positiva no teste de

vermelho de metila e negativa nas reações para "urease de Voges-Proskauer, e não fermenta citrato. *E. coli* é ainda caracterizada por um esquema complexo de sorotipagem envolvendo 173 antígenos O (lipopolissacarídeos), 80 EK (capsular), e 56 H (flagelar), todos podendo ainda ser divididos em antígenos parciais (Ver Tabelas 1 e 2 a seguir). Apesar do número final de sorotipos obtidos pela mescla desses antígenos serem da ordem de 50.000 - 100.000 ou mais, o número de sorotipos patogênicos causadores de infecções gastrintestinais é bastante limitado.

[0007] Da população normal de *E. coli* emergiram as seguintes cepas patogênicas:

- *E. coli* enterotoxigênica (ETEC).
- *E. coli* enteropatogênica (EPEC).
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).
- *E. coli* enteroinvasora (EIEC).
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

[0008] Entre essas cepas destacam-se EHEC e EPEC. A cepa EHEC causa diarreia não sanguinolenta, colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (HUS); a cepa EPEC causa diarreia aquosa prevalente em crianças até 1,5-2,0 anos de idade.

[0009] A cepa EHEC produz múltiplos fatores de virulência. Os mais importantes são toxinas inibidoras de síntese de proteínas: Shiga toxinas 1 (Stx1) e 2 (Stx2).

Tabela 1- Sorogrupos Associados com enterovirulência de *Escherichia coli*

<b>Categoria</b>	<b>Sorogrupos O predominantes</b>
Enterotoxigênica (ETEC)	LT: 1, 6, 7, 8, 9, 128

	LT: +ST: 11, 15, 20, 25, 27, 60, 63, 75, 78, 80, 85, 88, 89, 99, 101, 109, 114, 139, 153. ST: 12, 78, 115, 148, 149, 152, 159, 166, 167.
Enterohemorrágica sorotipos. (EHEC)	157, 26, 103, 111, 113; (além de outros 50)
Enteroinvasiva (EIEC)	11, 28, 29, 112, 115, 124, 136, 143, 144, 147, 152, 164, 167, 173.
Enteropatogênica (EPEC)	18, 26, 44, 55, 86, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128, 142, 145, 157, 158
Enteraggregativa (EaggEC)	3, 15, 44, 51, 77, 78, 86, 91, 92, 111, 113, 126, 141, 146.
Difusamente aderente (DAEC)	75, 15, 126.

Tabela 2 - Aspectos Clínicos das Infecções por Escherichia coli Patogências

<b>Tipo de E. coli*</b>	<b>Epidemiologia</b>	<b>Período de incubação</b>	<b>Diarreia</b>	<b>Sintomas adicionais</b>	<b>Sequelas</b>
ETEC	Crianças > adultos viajantes internacionais	10-72 hr	Diarreia aquosa	Náusea, cólica abdominal ± febre baixa	Interrupção do regime alimentar → redução do crescimento

					nto linear
EPEC	Crianças nos países em desenvolvimento	Muito curto: 9-12 hr	Aguda; persiste aquosa	Teste positivo para lactoferri- n nas fezes, vômitos, febre, desidratação	Índice de mortalidade: 25% - 70%
EaggEC	Crianças nos países em desenvolvimento	20-48 hr	Persiste aquosa	Febre em 12% dos casos; fezes sanguinolentas em cerca de $\frac{1}{3}$ dos pacientes	Pode interferir no crescimento
EHEC	Todas as idades/Predominância nos Estados Unidos, Canadá,	12-60 hr	Diarreia aguda sanguinolenta (progrid e para	Leucócitos e lactoferri- na nas fezes em cerca de	Progressão para HUS/TTP em 2%-8% dos casos;

	Europa e no Cone Sul da América do Sul.		colite hemorrágica em cerca de 38% - 61%); as vezes não ocorre diarreia sanguinolenta	30%-40% dos casos; febre em 0%-32%; moderada leucocitos e	raramente ocorrem óbitos; complicações ocorrem nas idades extremas
EIEC	Todas idades/concentra-se nos países em desenvolvimento; surtos em países industrializados.	Muito curto 10-18 hr	Diarreia aquosa seguida de disenteria.	Leucócitos e lactoferrina nas fezes; purulência, sangue, muco, podem ser vistos nas fezes; cólicas abdominais muito fortes	Hipoglicemia, especialmente nos mal nutridos.

	Possível patógeno principalmente em crianças mais velhas	Desconhecido	Aguda em três estudos; persistente em 1; não associada em muitos outros estudos	Desconhecido	Desconhecido
--	--	--------------	---	--------------	--------------

[0010] A caracterização das cepas patogênicas baseia-se em determinações sorológicas de um grande número de diferentes combinações, como já referido, de sorogrupos O e de H. A heterogeneidade antigênica das cepas patogênicas se expressa na diversidade, distribuição, e associação dos fenótipos observados nos estudos epidemiológicos realizados em diferentes regiões do globo. Estudos recentes de tipagem molecular pelos métodos de análises RAPD "randomly amplified polymorphic DNA" usando sondas bem definidas, e PFGE "pulsed-field gel electrophoresis" mostraram que a diversidade entre as cepas é maior do que a revelada nas análises fenotípicas.

[0011] Sorogrupos O dependem da heterogeneidade do LPS cuja estrutura geral está representada esquematicamente na Figura 2. IPS é um lipídeo complexo, lipídeo A, constituído de unidades do dissacarídeo  $\beta$ -1,6-glucosamina unidas por ligações fosfodiésteres. Os grupos aminos são substituídos por unidades de ácido  $\beta$ -hidroximirístico,

enquanto os demais grupos OH livres são substituídos por ácidos graxos de cadeia longa.

[0012] LPS ativa macrófagos e induz a liberação das seguintes citocinas destas células:

[0013] IL-1. Ativa o endotélio vascular e linfócitos; induz destruição de tecidos e aumento do acesso de células no local em que é liberada; induz produção de IL-6. Efeito sistêmico: febre;

[0014] IL-8. Induz quimiotaxia para leucócitos; aumenta o acesso de células efetoras no local em que é produzida; ativa os leucócitos polimorfonucleares e a ligação por  $\beta$ 2-integrinas;

[0015] TNF- $\alpha$  - Ativa o endotélio vascular e aumenta permeabilidade vascular responsáveis por aumento na entrada de IgG, componentes do sistema complemento e de células no local em que é liberado; potencializa o fluido de drenagem para os gânglios linfáticos. Dessas ações resultam os efeitos sistêmicos: febre, mobilização de metabólitos e choque;

[0016] IL-6. Ativa os linfócitos e aumenta a produção de anticorpos. Efeitos sistêmicos: induz febre e produção de proteínas de fase aguda;

[0017] IL-12. Ativa as células NK; induz a diferenciação de

[0018] células T CD4 para células TH1.

[0019] Nas bactérias EHEC a virulência se expressa de duas maneiras: produção de toxinas e habilidade para colonizar o intestino. EPEC não produz toxinas.

[0020] A colonização da mucosa intestinal por EPEC e EHEC relaciona-se com a produção de uma lesão na mucosa

intestinal observada por microscopia eletrônica denominada "attaching and effacement lesion" ("AE", lesão por adesão e destruição) (Ver Figura 3 - Reproduzido de: Rothbaum R, McAdams Ay, Giannella R, et al: "A clinicopathologic study of enterocyte-adherent Escherichia coli: A cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterology", v. 83, p. 441, 1982).

[0021] "AE" acontece em seguida ao contato com essas bactérias e se caracteriza por destruição localizada da bordadura em escova das microvilosidades dos enterócitos, seguida de adesão íntima das bactérias à membrana dessas células. No sítio de adesão da bactéria, a membrana do enterócito forma uma estrutura semelhante a pedestal. Análises pela microscopia de fluorescência usando anticorpos monoespecíficos anti-componentes do citoesqueleto marcados com compostos fluorescentes revelaram que na área da superfície da célula hospedeira correspondente à adesão das bactérias há acúmulo de actina polimerizada,  $\alpha$ -actitina, talina e ezrina. Tanto em EHEC como em EPEC, as proteínas que medeiam essa adesão são codificadas por genes dispostos no cromossomo em uma "ilha de patogenicidade", denominada locus of enterocyte effacement (LEE). Em seguida ao contato íntimo entre bactéria e célula hospedeira os genes desse locus são ativados e a bactéria passa a secretar as correspondentes proteínas: EspA (em EHEC) ou BfpA (em EPEC), EspB e EspD. A seguir, a bactéria constrói um aparelho de exportação que inclui um tubo feito de multímeros, de EspA; esta organela serve de conduto entre a bactéria e a célula hospedeira. Através desse conduto a bactéria transfere EspB

para a superfície da célula hospedeira. EspB está provavelmente envolvida na formação de poros na membrana da célula hospedeira. Depois da transferência, EspB passa a ser encontrada tanto na membrana como no citosol da célula hospedeira. As proteínas EspB e EspD, como parte constituinte do aparelho de condução, associam-se na formação de poros na membrana da célula hospedeira. A organela construída de EspA é usada para transferir moléculas do receptor para intimina (Tir) e inseri-las na membrana da célula hospedeira. Da ligação entre moléculas de intimina da superfície da bactéria e receptores Tir inseridos pela própria bactéria na superfície da célula hospedeira, resultam eventos no citoesqueleto que promovem "AE". A Figura 4 mostra, esquematicamente, a estrutura do aparelho de secreção resultante da associação das proteínas EspA, EspB e EspD. A Figura 4 é reproduzida de: Rothbaum R, McAdams AJ, Giannella R, et al: "A clinicopathologic study of enterocyte-adherent Escherichia coli: A cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterology", v. 83, p. 44, 1982.

[0022] Mecanismos de Defesa

[0023] As mucosas que revestem os tratos respiratórios, digestivo e gênito-urinário, a conjuntiva, o ouvido interno e os ductos das glândulas exócrinas possuem dispositivos eficientes que removem e degradam material estranho. Possuem, também, um vasto e especializado sistema imune local especializado na proteção local contra insultos externos, tanto inertes (poeiras) como vivos (agentes infecciosos), denominado genericamente MALT "mucosa-associated lymphoid tissue". No ser humano normal cerca de

80% do sistema imune estaria localizado no MALT. Este compartimento do sistema imune exerce três grandes funções gerais:

[0024] (a) protege as mucosas contra a colonização e invasão por patógenos potencialmente infecciosos;

[0025] (b) previne a ingestão de antígenos não degradados oriundos de alimentos ou de microrganismos comensais; e

[0026] (c) previne a indução de resposta imune positiva contra microrganismos comensais e de alimentos que penetrem a mucosa.

[0027] MALT, ao contrário do sistema imune geral, convive com grande quantidade de substâncias estranhas: seleciona contra o que deve desenvolver resposta imune positiva (efetora) ou a favor de que deve desenvolver uma resposta imune negativa (tolerância). Quando MALT produz resposta imune ativa contra antígenos potencialmente não patogênicos, ocorrem reações inflamatórias, como a doença celíaca (resposta inflamatória crônica do trato superior do intestino delgado a uma reação de hipersensibilidade imunológica decorrente da resposta imune local à proteína de glúten de cereais  $\alpha$ -gliadina. Estabelece após a introdução de alimentos sólidos na dieta e é caracterizada por atrofia das vilosidades intestinais, deficiência na absorção de alimentos seguida de desnutrição. Persiste enquanto não se remove as fontes de glúten da dieta) e a doença de Crohn (Doença inflamatória crônica do intestino. Embora comumente restrita à porção terminal do íleo e ao colo, nas formas graves pode afetar todo o trato gastrintestinal. A doença de

Crohn se caracteriza por reação inflamatória intramural, estenose do lume intestinal e formação de granulomas. Acredita-se que seja resultante de uma reação de hipersensibilidade celular dependente de linfócitos T estimulados pelo contato com antígenos de bactérias comensais).

[0028] Como esse sistema não discrimina substâncias provenientes de microrganismos patogênicos das provenientes de comensais apatogênicos ou de alimentos, admite-se que reconheça peptídeos de uns e de outros. A conduta futura no direcionamento da resposta dependeria de mecanismos dispostos ao longo das cadeias de reações moleculares e celulares ainda mal conhecidas.

#### Células imunes do MALT

[0029] De acordo com a localização da mucosa e do estado funcional encontram-se na MALT em diferentes proporções, os seguintes tipos celulares: a) células apresentadoras de antígenos, CAA, convencionais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos e, não convencionais como certas células epiteliais; b) linfócitos T exibindo TCR tanto  $\alpha/\beta$  como  $\gamma/\delta$ ; e, c) linfócitos B.

[0030] Linfócitos T são requeridos na indução da resposta imune das mucosas para desenvolver inflamação, tolerância, auxílio específico para produção de linfócitos T citotóxicos (CTL) ou IgA secretora (S-IgA). O comprometimento de linfócitos B, mudança de classe ( $\mu \rightarrow \alpha$ ) e interações linfócitos T e B que resultam na produção de S-IgA constituem fenômenos centrais na resposta imune das mucosas.

[0031] Linfócitos T reguladores classificam-se em três grupos: (a) linfócitos T virgens CD4+ ou CDB+; (b) linfócitos T ativados (efetores); e, (c) linfócitos T de memória.

[0032] A ativação de linfócitos auxiliares virgens CD4+ (TH) resulta no desenvolvimento de pelo menos duas populações de linfócitos efetores fenotípica e funcionalmente diferentes: TH1 e TH2.

[0033] Linfócitos TH1 produzem as citocinas IEN- $\gamma$ , IL-2 e linfotoxina, que são comumente associadas à respostas imunes mediadas por células dirigidas para patógenos intracelulares, nas hipersensibilidades do tipo retardado e em certas doenças autoimunes como encefalite experimental e diabetes tipo-1.

[0034] Linfócitos TH2, produzem as citocinas IL-4, JIL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que são cruciais no controle de infecções por patógenos extracelulares como nas infecções por helmintos. Produção das citocinas clássicas de TH2 como IL-4 e IL-13 é também observada nas doenças atópicas e alérgicas e usualmente são acompanhadas com produção de IgG1 e IgE e ativação de eosinófilos e mastócitos.

[0035] Os receptores para quimiocinas CCR5 e CXCR3 têm sido encontrados em linfócitos TH1, enquanto receptores para as quimiocinas CCR4, CXCR4 e CCR8, além dos receptores co-estimuladores T1 e o receptor indizível ICOS têm sido detectados em linfócitos TH2.

[0036] Linfócitos T CD4+ precursores de células auxiliares normalmente reconhecem peptídeos associados a produtos classe II de CPH e expressam TCR  $\alpha/\beta$ , CD3+, CD4+,

CD8-. Precursores de linfócitos TCL expressam TCR  $\alpha/\beta$ , e usualmente reconhecem peptídeos associados a produtos classe I de MHC na célula alvo e exibem fenótipo CD3+, CD4-, e CD8+. Na mucosa intestinal o tecido linfóide assume estrutura e disposição características. Esse tecido coletivamente designado GALT "gut-associated lymphoid tissue" distribui-se, anatomicamente, de maneira estratégica a interagir com os antígenos originados do conteúdo intestinal.

#### Anatomia de GALT

[0037] A mucosa intestinal é revestida, na face luminal, por epitélio colunar simples contendo cílios que formam a "bordadura em escova", ou seja, a superfície luminal das células epiteliais do intestino (enterócitos) é finamente pregueada em microvilosidades à maneira de uma escova. As microvilosidades são recobertas de muco e de glicoproteínas. Tal conformação estrutural aumenta apreciavelmente a superfície de absorção de água, nutrientes e de outros produtos. Essas microvilosidades contêm muitas das enzimas digestivas e sistemas de transporte que participam no metabolismo e na ingestão de material digestivo.

[0038] Esses epitélios apoiam-se em um tecido conjuntivo frouxo contendo fibras colágenas, fibroblastos/fibrócitos, mastócitos além das células imunes em trânsito. Fibras e células encontram-se imersas na substância fundamental amorfa, abundante, contendo glicoproteínas e substâncias absorvidas no lume intestinal, em trânsito para os vasos sanguíneos ou linfáticos. Há, ainda, substâncias extravasadas desses vasos para serem

expelidas no lume intestinal. A mucosa forma expansões digitiformes, as vilosidades intestinais, com criptas entre duas vilosidades adjacentes.

[0039] GALT pode ser dividido em dois sítios efetores: linfócitos difusamente espalhados no epitélio e na lâmina própria e linfócitos organizados em estruturas bem definidas como as placas de Peyer e os gânglios linfáticos mesentéricos (GLMs), além de folículos linfóides pequenos distribuídos ao acaso pela lâmina própria.

#### Placas de Pevyer

[0040] São agregados macroscópicos de tecido linfóide encontrados na submucosa ao longo do intestino delgado. No camundongo, o desenvolvimento das placas de Peyer e do tecido linfóide periférico são processos distintos. O tecido linfóide das placas de Peyver é induzido por linfotóxina- $\alpha 1\beta 2$ , (LT- $\alpha 1\beta 2$ ) produzida por progenitores de linfócitos CD3- CD4+ recirculantes em resposta à produção local de IL-7. A entrada de progenitores de linfócitos CD3- CD4+ nos esboços de placas de Peyer em desenvolvimento requer a expressão de receptores para quimiocina CXCR5. LT- $\alpha 1\beta 2$  ativa seletivamente a subunidade heterodimérica do fator nuclear (NF)-KB, através da ativação mediada pela sinalização de receptores de linfotóxina- $\beta$  (LT $\beta$ R) que se expressa pela proteína VCAM-1 "vascular-cell adhesion molecule 1" em células mesenquimais. Placas de Peyer maduras consistem de coleções de folículos linfóides grandes contendo linfócitos B intercaladas com áreas ricas em linfócitos T. As áreas de tecido linfóide são separadas do lume intestinal por uma camada de epitélio colunar simples

conhecida como FAE "follicle-associated epithelium". Logo abaixo do epitélio encontra-se uma área mais difusa conhecida como SED. FAE possui níveis baixos de enzimas; a "bordadura em escova" é menos pronunciada e é infiltrada com células dendríticas, linfócitos T e B, e macrófagos. Chama atenção a presença nessas áreas de enterócitos morfológicamente diferentes, sem microvilosidades e cobertura de muco inserida irregularmente no epitélio. Essas células, conhecidas como "células M", diferenciam-se a partir de enterócitos sob a influência da citocina LT- $\alpha$ 1 $\beta$ 2 produzida principalmente por linfócitos B. As células M podem se ligar a patógenos como Salmonella, Shigella, Yersinia, retrovírus, e em outros antígenos particulados.

#### GLMs - Gânglios Linfáticos Mais Volumosos do Corpo.

O processo de desenvolvimento dessas estruturas é diferente dos gânglios linfáticos periféricos e das placas de Peyer. A ausência de TNF, TNFR, LT- $\alpha$ 1 $\beta$ 2 e LT- $\beta$ R não afeta substancialmente o desenvolvimento ontogenético dos GLMs. A acumulação de linfócitos nos GLMs requer LIGHT, outro ligante de LT- $\beta$ R, L-selectina, e  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrina. Como esta molécula de adesão direciona a entrada de linfócitos tanto nos tecido linfóides periféricos como nos de mucosas, os GLMs se comportam como encruzilhada no trânsito de linfócitos em seu processo de recirculação.

#### Indução de resposta imune na mucosa intestinal

[0041] As células M ingerem antígenos complexos do lume intestinal e, como não possuem produtos classe II de MHC, transfere-os intactos para células apresentadoras de antígenos profissionais (CAA). Entre as CAA destacam-se

células dendríticas de diferentes subpopulações. As CAA recebem e processam as moléculas de antígeno que receberam das células M. Dirigem-se para as áreas de tecido linfóide e apresenta aos linfócitos T ou B peptídeos do antígeno que receberam associados a produtos classe II de MHC. Nas placas de Peyer linfócitos B comprometidos com esses antígenos depois de expressarem moléculas monoméricas de IgM promovem "classe switching" IgM→S-IgA. Vários fatores locais, incluindo TGF- $\beta$ , IL-10 além de sinais emitidos pelas células dendríticas e pelos linfócitos T influenciam esta mudança de classe.

[0042] Linfócitos primados nas placas de Peyer migram através dos vasos linfáticos locais para os GLMs onde sofrem diferenciação adicional e onde passam a residir por um certo tempo. Depois de certo tempo, desalojam-se, dirigem-se para a ducto torácico, daí para corrente sanguínea para, finalmente, estacionarem-se na mucosa.

[0043] Os linfócitos, depois de primados pelo antígeno no GALT, deixam de expressar L-selectina e passam a expressar moléculas de  $\alpha 4\beta 7$  integrina. Isto direciona a emigração dos linfócitos da corrente circulatória sanguínea para interagir com o ligante para  $\alpha 4\beta 7$  integrina, adesina MAD-CAM1 "mucosal addressin cell-adhesion molecule", expressa nas células endoteliais dos vasos das mucosas. Paralelamente, linfócitos T oriundos no intestino, passam a expressar receptores para a quimiocina CCR9. Esses linfócitos adquirem então a propriedade de responder à estimulação pela quimiocina CCL25, designada TECK "thymus-expressed chemokine". Esse padrão de adesão, molécula de

adesão versus receptor para quimiocina, é distinto do exibido por linfócitos T primados nos órgãos linfóides periféricos. Como na população de linfócitos primados nos órgãos linfóides periféricos a integrina é  $\alpha 4\beta 7$ , denominada VLA4, "very late antigen 4" e o receptor para quimiocina CCR4, não podem migrar para as mucosas.

[0044] Os linfócitos que entram na mucosa redistribuem-se em compartimentos distintos. Linfócitos B já comprometidos com diferenciação para plasmócitos produtores de S-IgA permanecem na lâmina própria. Linfócitos T CD4+ conquanto também permaneçam na lâmina própria, distribuem-se uniformemente nas unidades vilosidades-críptas. Cerca de 60% dos linfócitos T CD8+ assentam-se epitélio enquanto o restante se difunde na lâmina própria.

[0045] As funções dos linfócitos T da lâmina própria são mal conhecidas. Como muitas dessas células expressam fenótipo de linfócitos de memória, admite-se que já tenham entrado em contato com antígeno.

[0046] Linfócitos T CD4+ da lâmina própria são particularmente importantes na regulação da imunidade local. Em geral não respondem aos sinais de estimulação provenientes de receptores de linfócitos T (TCR). Entretanto, em seres humanos, respondem à estimulação quando CD2 é usado como molécula acessória. Produzem grandes quantidades de citocinas, entre elas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10. Funcionam ainda como células reguladoras na manutenção da tolerância para antígenos da dieta e de patógenos comensais.

[0047] Linfócitos T CD8+ da lâmina exercem funções efectoras; alguns exibem potente ação citotóxica, isto é, são

CTLs; outros funcionam como células "helper" para linfócitos B e plasmócitos na produção de S-IgA.

S-IgA - Principal classe de imunoglobulinas nas secreções.

[0048] A síntese de sua peça J e subsequente ligação com a cadeia polimérica de IgA ocorre no plasmócito. As células epiteliais sintetizam um componente que age como receptor de superfície para facilitar o transporte da molécula de IgA sintetizada através do epitélio. A resistência da molécula de S-IgA às enzimas proteolíticas torna essa imunoglobulina adequada na defesa das mucosas. S-IgA promove a "exclusão imune" de bactérias e vírus patogênicos, além de toxinas e outras moléculas, função facilitada pela afinidade da molécula de S-IgA para o muco. S-IgA neutraliza diretamente vírus e serve de mediador em reações de citotoxicidade mediadas por células e anticorpo.

ANÁLISE DO ESTADO DA TÉCNICA

[0049] Breve pesquisa em bancos de dados referente ao assunto permitiu observar a preocupação em se obter vacinas relacionadas às doenças diarreicas. O documento n. WO 2007/089205 (2007 - SBL VACCIN AB) se refere à vacina oral contra a cólera e diarreia causada por ETEC - Escherichia coli enterotoxigênica que consiste de quatro cepas do Vibrio cholerae, inativadas por calor ou formalina, e uma subunidade B recombinante da toxina da cólera (rCTB). A formulação da vacina está baseada na quantidade de bactérias presentes de cada cepa, bem como no conteúdo de rCTB. Para evitar a degradação da rCTB no ambiente ácido do estômago, a vacina é misturada com uma solução tampão de bicarbonato de sódio antes de ser ingerida.

[0050] O documento WO 2010/005868 (2010 - South Dakota State University) se refere a uma vacina contra a *Escherichia coli* enterotoxigénica. A vacina pode incluir uma estirpe de *Escherichia coli*. A estirpe de *Escherichia coli* K88 pode produzir fímbrias e uma proteína de fusão incluindo uma enterotoxina LT mutante associado com uma enterotoxina STb. Um método de exemplo para a produção de uma vacina para suínos diarreia pós-desmame pode incluir o fornecimento de uma primeira estirpe de *Escherichia coli*. A estirpe pode incluir o gene eltAB eo gene estb. O método pode também incluir a amplificação do gene eltAB, a mutação do gene eltAB, gerando uma fusão genética do gene mutante com o eltAB gene estb, e transformando uma segunda estirpe de *Escherichia coli*, com a fusão genética.

#### BREVE DESCRIÇÃO DO INVENTO

[0051] Diferentemente do proposto até o momento, a presente invenção se propõe ao desenvolvimento de vacina usando bacilo Calmette-Guérin (BCG) (vacina contra a tuberculose) e *Mycobacterium smegmatis* (espécie bactéria álcool-ácido resistente do gênero *Mycobacterium*) expressando os fatores de virulência do gene BfpA e Intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). A cepa vacinal da presente invenção é empregada para ativar o sistema imunológico a produzir proteção local a desafios com cepas virulentas de EPEC.

[0052] A motivação do desenvolvimento da presente vacina tem, como principais justificativas:

- a) Crianças que se recuperam de diarreias causadas por EPEC não se re-infectam, mas quando se re-infectam apresentam manifestações brandas; |
- b) Não há vacina anti-EPEC;
- c) Antibióticos não são recomendados para tratamento de diarreias: subvertem a microbiota intestinal facilitando a proliferação de bactérias patogênicas e pode induzir resistência, condição que dificultaria o tratamento posterior de eventuais infecções sistêmicas mais graves como endotoxemias causadas pela mesma bactéria responsável pela diarreia. Antibióticos são caros, às vezes inacessíveis para populações de baixa renda; e
- d) BCG foi selecionado como vetor dos fatores de virulência de EPEC pelas seguintes razões: BCG exibe patogenicidade relativamente baixa, não possui LPS, componente desencadeador de choque endotoxêmico, possui atividade constitutiva de adjuvante imunológico, pode ser administrado tanto por via parenteral como oral e pode ser cultivado e quantificado por métodos simples já estabelecidos.

#### DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0053] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de desenhos, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou seu funcionamento:

[0054] A figura 1 representa o esquema geral da superfície externa de E. coli;

[0055] A figura 2 representa a estrutura esquemática da molécula de lípídeo A;

[0056] A figura 3A mostra, de forma esquemática, a patogênese do attaching and effacement lesion em enterócitos. (1) Interação entre EPEC epitélio mediada por pilus formadores de feixes; (2) Evento de transdução de sinal que leva ao aumento intracelular de íons de Ca<sup>++</sup> e destruição das microvilosidades; (3) O produto bacteriano, Intimina,

[0057] medeia adesão íntima entre epitélio e bactéria com reorganização do citoesqueleto; (4) Bactérias aderentes no pedestal penetram a célula dentro de vacúolos e se situam na região perinuclear;

[0058] A Figura 3B representa a microscopia eletrônica da attaching and effacement lesion "B" bacteria e "P" formação do pedestal;

[0059] A Figura 4 é a representação esquemática do aparelho de secreção que EPEC constrói para aderir às células epiteliais;

[0060] A Figura 5 representa os Mecanismos de Secreção nos Enterócitos; e

[0061] A Figura 6 é uma imagem ilustrativa reproduzida de Rothbaum R, McAdans AJ, Giannella R, et al: A clinicopathologic study of enterocyte-adherent Escherichia coli: A cause of proterctediarrhea in infants. Gastroenterology, v. 83, p. 441, 1982.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0062] A presente invenção tem por objetivo principal a produção de BCGs recombinantes que expressam fatores de virulência de Escherichia coli Enteropatogênica

(EPEC), mais especificamente, BCGs recombinantes que induzam resposta imune específica para epítomos presentes na proteína recombinante BfpA e a proteína Intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).

[0063] Para tanto, o método emprega, basicamente, as seguintes etapas:

Etapa 1- Purificar a proteína BfpA de SEQ ID NO:1 e a proteína Intimina de SEQ ID NO:2 de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) para a produção de anticorpos anti-BfpA e anti-Intimina em coelhos;

Etapa 2 - Isolar e clonar os genes *bfpA* de SEQ ID NO:7 e *intimina* de SEQ ID NO:8 no plasmídeo de expressão (pMIP12) em *M. smegmetis* e *M. bovis*, e obter e selecionar cepas de BCG que contenham um dos vetores recombinantes pMH12-*bfpA* e pMH12-*intimina*.

Etapa 3 - Amplificar a sequência do gene que codifica *bfpA* e *intimina* e sequencia-los;

Etapa 4 - Verificar se as cepas de rBCGs contendo o gene *bfpA* de SEQ ID NO:9 e o gene *intimina* de SEQ ID NO:10 sintetizam a proteína recombinante BfpA de SEQ ID NO:11 e a proteína recombinante Intimina de SEQ ID NO:12;

Etapa 5 - Desenvolver protocolos para investigar o potencial imunogênico das cepas e usando produção de anticorpos como referencial; e

Etapa 6 - Desenvolver protocolos teste, *in vivo*, de imunoproteção usando cepas EPEC típica e atípica como agente infeccioso nos modelos de diarreia e choque endotoxêmico.

[0064] As etapas do método ora desenvolvido, serão melhores descritas, empregando, para tanto, descrições

*pormenorizadas das etapas que permitiram obter e confirmar os resultados alcançados, quais sejam:*

Etapa 1- Purificar a proteína BfpA e a proteína Intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) para a produção de anticorpos anti-BfpA e anti-Intimina em coelhos e Etapa 2 - Isolar e clonar os genes *bfpA* e *intimina* no plasmídeo de expressão (pMIP12) em *M. smegmetis* e *M. bovis*, e obter e selecionar cepas de BCG que contenham um dos vetores recombinantes pMH12-*bfpA* ou pMH12-*intimina*;

(a) Vetores multifuncionais (*shuttle vectors*) *E. coli* /micobactéria como o pMIP12 são plasmídeos pontes.

(b) O plasmídeo pMIP12 possui uma sequência de Shine-Dalgarno micobacteriana forte que permite ao gene inserido ser de elevado poder de expressão. Este plasmídeo possui, ainda, sítios de origem de replicação para *E. coli* e para Micobactérias, o gene de resistência para kanamicina e o promotor do gene da beta-lactamase (pBlaF) de *Mycobacterium fortuitum* com seu códon ATG de iniciação.

(c) Método PCR - (Polymerase Chain Reaction) - é a técnica que permite a ampliação do DNA ou RNA in vitro, utilizando uma reação enzimática catalisada pela enzima polymerase:

(d) O gene *bfpA* e o gene *intimina* são amplificados a partir de *Escherichia coli* enteropatogênica utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores. Os genes *bfpA* e *intimina* (*eae*) foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA genômico do protótipo EPEC E2348/69 foi usado como um molde, e os oligonucleotídeos iniciadores construídos foram os seguintes:

- *bfpA* iniciador senso (FP) 5'-TAG GGA TCC CTG TCT TTG ATT GAA TCT GCA ATG GTG CTT-3' de SEQ ID NO:3; e

- iniciador antisense (RP) 5'-TAG GGT ACC TTA CTT CAT AAA ATA TGT AAC TTT ATT GGT-3' de SEQ ID NO:4;

- *intimina* FP 5'-TAG GGA TCC GGG ATC GAT TAC C-3' de SEQ ID NO:5; e

- RP 5'-TAG GGT ACC TTT ATC AGC CTT AAT CTC A-3' de SEQ ID NO:6.

[0065] As regiões sublinhadas indicam os locais KpnI e BamHI.

[0066] Os fragmentos são separados em gel de agarose 1,0 % e purificados por um kit para a purificação e concentração de produtos de PCR ou fragmentos de DNA que variam em tamanho de 50 bp a 10 kb. Este kit pode ser usado para purificar DNA de volumes de reação de até 100 µl ou fatias de gel de agarose de até 900 mg.

(f) Bactérias e condições de cultura - todas as etapas de clonagem são executadas em *E. coli* DH5α, transformadas pelo método padrão de CaCl<sub>2</sub>, e cultivadas em Luria-Bertani (LB) contendo, quando necessário, ampicilina 100 µg/mL ou kanamicina 20 µg/mL.

(g) Clonagem dos genes *bfpA* e *intimina* no vetor pGEM-T easy - os produtos de PCR purificados serão inserido no vetor pGEM-T easy (Promega) seguindo as orientações do fabricante, transformados em *E. coli* DH5α e plaqueados em meio LB contendo ampicilina, IPTIG e X-gal para seleção dos clones recombinantes (brancos). A confirmação das clonagens é feita após extração do DNA plasmidial de colônias brancas e

digestão com a enzima de restrição para visualizar a liberação do inserto.

(h) Construção dos vetores de expressão – Os genes *bfpA* e *intimina* são excisados do plasmídeo pGemT Easy -*bfpA* e do plasmídeo pGemT Easy -*intimina* previamente digeridos com as endonucleases de restrição, sendo os fragmentos liberados das digestões purificados por um kit para a purificação e concentração de produtos de PCR ou fragmentos de DNA que variam em tamanho de 50 bp a 10 kb. Este kit pode ser usado para purificar DNA de volumes de reação de até 100 µl ou fatias de gel de agarose de até 900 mg..

(i) Após purificação, esses fragmentos serão clonados, a partir desses mesmos sítios de restrição, no vetor de expressão de expressão pMIP12 previamente digerido com enzimas de restrição. Os oligonucleotídeos foram desenhados para que a inserção dos fragmentos em pMIP12 permitisse que a fase de leitura fosse mantida para a produção das proteínas de fusão. As construções obtidas são, então, denominadas pMH12-*bfpA* e pMH12-*intimina*.

[0067] Resumidamente, os produtos de PCR amplificados de *BfpA* e *intimina* (eae) foram purificados e subclonados no vetor pGEM-T Easy (Promega, EUA). Ambos os genes foram digeridos com BamHI e KpnI e subclonados no vetor micobacteriano pMIP12 (gentilmente cedido por Brigitte Gicquel, Pasteur Institute, France). Os plasmídeos resultantes foram identificados como pMH12-*bfpA* e pMH12-*intimina*. Os plasmídeos foram validados por análises sucessivas com endonucleases de restrição e sequenciação de

DNA utilizando o iniciador 5'-TTC AAA CTA TCG CCG GCT GA-3' de SEQ ID NO:13.

(j) Os plasmídeos resultantes dessas clonagens são usados para a transformação da cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ . As colônias possivelmente positivas serão selecionadas em meio LB contendo kanamicina. Mini preparações plasmidiais a partir das colônias selecionadas são analisadas por restrição com as enzimas de restrição em busca de plasmídeos que carregam separadamente os insertos *bfpA* e *intimina*.

(k) Validação dos Clones pela PCR – Os DNAs plasmidiais são analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. As amostras contendo DNAs plasmidiais são, então, submetidas ao experimento de validação dos clones. O objetivo deste experimento é confirmar a presença dos insertos nos DNAs plasmidiais bacteriano.

(l) Análise dos Produtos da PCR - Amostras das misturas de reação (25 $\mu$ l) pré-coradas com brometo de etídio são depositadas nas canaletas de gel de agarose a 1,5%. Após adição de 10 $\mu$ l do tampão de amostra 6X concentrado contendo de bromoferol (25%) e glicerol 30% em água, a eletroforese é realizada a 120V em tampão de corrida TAE (0,04M tris-Acetato; 0,001M EDTA). É utilizado o marcador 1kb Ladder (Promega, EUA). Os produtos da PCR são, então, analisados em transiluminador UV e o gel fotodocumentado no aparelho de foto-documentação, tal como aparelho Image Master® VDS (Amersham Pharmacia, EUA).

(m) Desenho dos Oligonucleotídeos Específicos - Após pesquisa (NCBI- Sequence Viewer) da sequência dos plasmídeos pLA71, pLA73 e pMIP12, oligonucleotídeos específicos que

parearem com sítios no gene da beta-lactamase (*blaF* gene) são desenhados através do Programa "Oligo Tech", version 1,00, Copyright© 1995.

[0068] Para a realização da Etapa 3, qual seja, "amplificar a sequência do gene que codifica *BfpA* e *Intimina* e sequenciá-los", empregam-se os seguintes passos:

a) Sequenciamento - cada plasmídeo contendo o gene *bfpA* ou *intimina* é sequenciado na direção 5'-3', utilizando um primer em tubo individual. Ao término do programa, cada produto de reação é lavado com isopropanol e etanol para remoção dos dideoxynucleotídeos não incorporados aos fragmentos obtidos. Em cada tubo de sequenciamento são adicionados 40 µL de isopropanol 65%. Após incubação de trinta minutos, os tubos são centrifugados por 25 minutos a 12.000 rpm (26 °C) e os sobrenadantes são descartados. São adicionados 200 µL de etanol 60% aos tubos e procede-se à centrifugação de 5 minutos a, preferencialmente, 12.000 rpm (26 °C). Os sobrenadantes são, também, descartados e os tubos são secos no termociclador a 95 °C. Ao término deste procedimento, os tubos são armazenados ao abrigo da luz.

b) É adicionada Formamida, 10 µL por tubo; os tubos são colocados numa placa para sequenciamento que é levada ao termociclador para desnaturar durante 1 minuto a 96 °C, logo após colocada em banho de gelo para ocorrer um choque térmico. A placa é levada ao sequenciador automático, cujos dados são armazenados e analisados por programa específico, atualmente o programa DNA Sequencing Analysis 5,2 Patch2-BUTANTAN (3130 Genetic Analyzer).

[0069] Na Etapa 4 do presente método é verificado se as cepas de rBCGs contendo o gene *bfpA* e o gene *intimina* sintetizam a proteína recombinante BfpA e a proteína recombinante Intimina e, para tanto, adota-se a seguinte sequência:

(a) Para a obtenção da "Competência", ou seja, a interação biológica entre os organismos ou espécies em que a capacidade de adequação de um é reduzida devido à presença de outros, Bacilos de *M. bovis* (BCG) são cultivados em garrafas de 500 mL contendo 100 mL de meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Oxford, UK) contendo albumina-dextrose-catalase (ADC) 10% mais Tween80 0,05% (MB7H9) ou meio sólido Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com ácido oléico-albumina-dextrose-catalase (OADC) 10% (MB7H10), contendo ou não kanamicina (20 µg/mL) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO com agitação periódica até a D.O. 0,5 a 600 nm. A cultura é, então, centrifugada, lavada duas vezes com água ultrapura do tipo I a 4° C e ressuspendidas em 10% de glicerol. O estoque de BCG competente é mantido a - 80°C;

(b) Transformação e Seleção - microbactérias BCG competentes são transformadas com os plasmídeos de expressão por eletroporação. Para eletroporação, uma alíquota estoque de 50-200 µL de BCG competente é misturada com 1-10 Lg de DNA plasmidial em cubeta de eletroporação de 2 mm e está submetida à pulsações de 2,5 kV, 25 µF e 1000 Ω, num eletroporador de pulsação (atualmente BioRad, Hemel Hempstead, UK). Após eletroporação, o conteúdo das cubetas é recuperado em 5 mL de meio MB7H9, sem antibiótico, e

incubado a 37 °C por 20 h antes de ser semeado sobre MB7H10 contendo kanamicina (20 µg/mL). Após incubação e de 20 a 30 dias a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, as colônias transformadas são selecionadas. Para extração de proteínas ou preparação do recombinante vacinal, as colônias isoladas de BCG serão crescidas em garrafas de 200 mL contendo 50 mL de meio Middle brook 7H9 suplementado com albumina de soro bovino 10 % ou Middle brook 7H10 suplementado com ODC, mais kanamicina 40 µg/mL e incubadas a 37° C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, até a saturação (20-30 dias);

(c) Extração de Proteínas - é procedida a partir dos 50 mL de meio de cultura descrito acima. 5 mL são destinados à extração de proteínas e os outros 45 ml para a preparação da vacina. Para a extração de proteínas os 5 mL são centrifugados a 4 000 rpm por 10', lavado (1x) com 5 mL de PBS, centrifugados novamente e as bactérias re-suspensas em 500 µL de PBS estéril contendo inibidores de proteases como DTT, PMSF, Aproptin, Leupeptin e Pepstatin (0.5 µL de cada). Em seguida as amostras são congeladas a -20 °C para posterior sonicação. A sonicação, 18 ciclos com 10 segundos cada, com intervalos de 10 segundos, as amostras são centrifugadas para precipitação de sólidos, e os sobrenadantes recuperados para quantificação de proteína. Os extratos protéicos são, então, aplicados em SDS-PAGE (gel de poliacrilamida mais duodecil sulfato de sódio);

(d) Preparação da Vacina - compreende que os 45 mL restantes do meio de cultura descrito no item "c" anterior sejam centrifugados a 4 000 rpm por 10 minutos; o precipitado

é lavado (2x) com 5 mL de água ultrapura do tipo I estéril, centrifugado novamente e as bactérias re-suspensas em 1 mL de uma solução de glicerol a 10% em água, estéril. As amostras são alíquotadas em 50 µL e conservadas a -70°C para, então, serem usadas como vacinas nos camundongos.

[0070] A Etapa 5 do presente método resume-se em desenvolver protocolos para investigar o potencial imunogênico das cepas e usando produção de anticorpos como referencial. Estes protocolos utilizam os seguintes testes/métodos:

(a) Quantificação de Proteínas - a quantificação de todas as amostras de vacina é feita através do método do Ácido Bicinconínico, utilizando BSA (Bovine Serum Albumin) para gerar a curva padrão de análise.

(b) Determinação do Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) - Feita a quantificação e antes de se injetar as vacinas nos camundongos, determina-se O Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) que será aplicada nos animais. Amostras das vacinas são diluídas  $10^5$  e  $10^6$  vezes e plaqueadas em 7H10 mais kanamicina 20 µg/mL. Ao final de 21 dias o número de colônias presentes nas placas deve ser contado, determinando-se então o volume de vacina necessário para se introduzir  $10^6$  UFC de rBCG em cada animal.

(c) Análise por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) - Amostras das vacinas são submetidas à análise por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). Os géis de SDS-PAGE são feitos em sistema descontínuo (Bio Rad Mini Protean II, USA), constituído de gel separador com

12% de acrilamida (1,5 mL de Tris-HCl 3M pH 8.8; 2,4 mL de Acrilamida/bisacrilamida 30%; 20 uL de SDS a 10%; 45 µL de APS a 10%; 5 µL de TEMED; 2 mL de água destilada) e o gel de empilhamento com 4% de acrilamida (1,5 mL de Tris-HCl pH 6.8; 400 µL de Acrilamida/Bisacrilamida; 30 µL SDS a 10%; 30 µL de APS a 10%; 6 µL de TEMED; 1,049 mL de água destilada) em tampão de corrida Tris-Glicina (Tris-base 1,5%; Glicina 7,2%; SDS 0.5%: pH 8,3) segundo a metodologia descrita por LAEMMLI (Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. v. 227, p 5259-5680, 1970.). A corrente elétrica utilizada será de 80 V até as amostras cruzarem o gel de empilhamento, em seguida, ajustada para 120 V até o fim da corrida. Amostras de extratos de rBCG (30 µg/poço) serão aplicadas paralelamente.

(d) Aplicação do método *Western Blot* - Amostras das vacinas submetidas à análise por SDS-PAGE, conforme anteriormente descrito, são submetidas ao método *Western Blot*. Para tanto, o gel é carregado com 30 µg de cada lisado de rBCG. Em seguida, as proteínas contidas no gel são transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio Rad, USA) utilizando o sistema Bio Rad Mini Transblot II sob voltagem constante de 10 V por um período de 2h em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,5%;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,2%). Após a transferência, a membrana é corada com Ponceau S (Sigma Chemical Co, EUA) (Ponseau S 1g; ác. acético 1 mL;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada 100 mL), lavada com água destilada e bloqueada com 50 mL de leite desnatado (leite Molico a 5% em PBS-T) overnight a 4 °C. Em seguida, a membrana é incubada com anticorpo anti-BfpA ou anti-Intimina de coelho (IgG), e incubados durante 1,5 hora

a temperatura ambiente. A membrana é lavada 5 vezes com PBS-T (NaCl 0,8%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15%; KCl 0,2%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%; 0,5% Tween) por 5 min cada lavagem. É incubada com Anticorpo anti-IgG arcado com peroxidase (Southern Biotechnologies, EUA), diluído 1:3000 e 1:1000, respectivamente, durante 1,5h a temperatura ambiente. A membrana é, novamente, lavada 5 vezes com PBS-T (NaCl 0,8%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,15%; KCl 0,2%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%; 0,5% tween) por 5 min. Após as lavagens, a membrana é revelada com solução 3,3-Diaminobenzidina (DAB) (4,9 mL H<sub>2</sub>O; 0,1 mL Tris 2M pH 7,5; 0,3 mL Imidazol 0,1 mL, 5 mg DAB, 0,05 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a reação é interrompida com adição de água destilada, logo após a visualização das bandas.

[0071] Para o desenvolvimento da Etapa 6, em específico, são realizados protocolos teste, *in vivo*, de imunoproteção usando cepas EPEC típica e atípica como agente infeccioso nos modelos de diarreia e choque endotoxêmico, de acordo com os seguintes passos:

(i) Animais - Foram utilizados camundongos Swiss albinos, DBA2, isogênicos do sexo feminino com cerca de quatro semanas de vida, pesando entre 18 e 22 g fornecidos pelo Biotério de Central do Instituto Butantan. Todos os animais foram mantidos em ambiente com renovação de ar, alimentação e água, obedecendo às normas éticas para uso de animais de experimentação. Os camundongos usados no subprojeto foram mantidos e manuseados conforme as normas éticas, internacionais que regulam o uso de animais tanto em experimentação como na produção e controle de imunobiológicos (*International Animal Welfare*

*Recommendations"* e pelo "*Committee Members, International Society on Toxinology"* (1992);

(ii) Esquema de Imunização - Os camundongos Swiss e DBA, foram divididos em grupos de acordo com a rBCG que foram imunizados. Todos os grupos foram imunizados quatro vezes (Sendo os *boosters* 7, 35 e 49 dias após a primeira imunização) injetando-se, por via intraperitoneal (i.p.) ou via oral (v.o.), 200 µL de uma solução salina estéril contendo  $1 \times 10^6$  UFC/camundongo de BCG ou rBCG ; foi usado um grupo como controle, que foi imunizado com a vacina BCG;

(iii) Coleta de Sangue - Amostras de sangue foram colhidas por capilaridade do plexo retro-orbital do olho direito antes do início da imunização e 24 dias, 43 dias e 57 dias após a primeira imunização. Após coagulação em temperatura ambiente, as amostras ficarão a 4 °C *overnight*. As amostras serão centrifugadas a 1000 g por 10 minutos a temperatura ambiente, e os soros separados, aliquotados e armazenados a -20°C;

(iv) Aplicação do Método de ELISA - As análises de indução de anticorpos específicos contra BfpA e Intimina nos soros dos animais imunizados foram feitas pelo método de ELISA. Numa placa de 96 poços (Nalgene Nunc International, Rochester, N. Y.) foi adsorvida a proteína, BfpA ou Intimina ou extrato de BCG, (30 µg /mL) diluída em 50 µl de tampão Carbonato-bicarbonato, pH 9,6 e incubada a 4 °C por toda noite. Após a adsorção do antígeno, as placas foram lavadas duas vezes com PBS-T e bloqueadas com gelatina 1% (150 µL/poço) diluída em PBS por uma hora, a temperatura ambiente. Após o bloqueio e três novas lavagens com PBS-T, foram

acrescentados os anticorpos (50 µL/poço) diluídos em PBS-T, começando com uma diluição inicial de 1:2 seguindo de diluições (fator 5) até o limite de 1:250. Como controle, foi utilizado IgG de camundongos imunizados com BCG, IgG anti-BfpA E IgG anti-Intimina. A incubação das placas foram feitas a 37 °C por 45 min. Após três lavagens com PBS-T, foi adicionado o anticorpo conjugado anti-IgG de camundongo (Southern Biotechnologies, EUA) marcado com peroxidase diluído 1:2000 (50 µL/poço) em PBS-T e nova incubação foi realizada a 37 °C por 45 min. Esta reação foi revelada pela adição do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ortofenildiamina - OPD (Sigma Chemical Co, EUA) diluídos em tampão (5,75 mL H<sub>2</sub>O dest.; 3,25 mL ác. cítrico 0,1 M; 3,5 mL fosfato de sódio 0,2 M; 5 mg OPD; 0,005 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi interrompida adicionando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N (50 µL/poço) e lida em comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro de placas (Tittertek Multiskan).

(v) Detecção de Anticorpos Anti-BfpA e Anti-Intimina por *Western Blotting* - Amostras das proteínas BfpA e Intimina purificadas foram submetidas a SDS-PAGE com gel contendo 12% de acrilamida. A cada canaleta foram aplicados 15 µg da proteína purificada. Ao término da corrida, o gel foi submetido à etapa de eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio Rad). O gel, a membrana de nitrocelulose e outros componentes do sistema de eletrotransferência foram imersos em tampão de transferência previamente resfriados a 4 °C. Em seguida, o gel foi montado segundo orientações do fabricante Bio-Rad- Mini TRansfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). Este sistema foi submetido à corrente de 80 V/400 mA por 120 minutos.

Terminada a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada por vermelho de Ponceau a 0,1% (Ponceau S Solution- Sigma Chemical Co., St Louis, USA) para verificar se houve sucesso na transferência, e descorada com água destilada. A seguir, a membrana foi imersa em uma solução bloqueadora (PBS com 0,1% de Tween20 e 5% de leite em pó desnatado) *overnight* a 4 °C. Após este período, as membranas foram incubadas por 1,5h a temperatura ambiente, sob agitação constante, com um pool dos soros das quatro imunizações de cada camundongo diluídos (1:100) em solução de PBS-T 0,1% com 5 % de leite em pó desnatado. Na etapa seguinte as membranas foram lavadas 5 vezes com PBS-T 0,1% por 5 minutos cada lavagem, e incubadas com o segundo anticorpo Anti- IgM e IgG de camundongo conjugado a peroxidase diluído 1:2000 em PBS-T 0,1% durante 1,5h a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foram realizadas mais 5 lavagens com PBS-T 0,1% e a reação foi revelada com uma solução contendo substrato enzimático mais a substância cromógena 3,3'diabenobenzidina (DAB- Sigma Co. St. Louis, EUA). Assim que as bandas tornaram-se claramente visíveis, a reação foi interrompida pela adição de água.

[0072] O resultado de todo o método e desenvolvimento consistentes descrito nas etapas supra descritas apontou uma vacina BCG recombinante estável contendo os genes *bfpA* e *intimina* de EPEC. Esta se mostrou imunogênica quando administrada intraperitonealmente ou oralmente a camundongos.

[0073] Obtiveram-se cepas de BCG recombinantes estáveis e capazes de expressar os produtos dos genes *bfpA*

e intimina significativos. Essas cepas são produtoras de proteína recombinante BfpA e Intimina estáveis em condições fisiológicas, biologicamente ativas e imunogênicas e que, quando administradas por via oral ou intraperitoneal em camundongos, induzam imunidade protetora local a desafios com cepas virulentas de EPEC.

[0074] Como complemento do método de desenvolvimento e ensaio pré-clínico, ora pleiteado, e pelo fato dos requerentes identificarem isótipos de imunoglobulinas anti-BfpA e anti-Intimina nas fezes de camundongos imunizados com BCG que expressa a proteína recombinante BfpA ou Intimina, produto do gene bfpA transferido de E. coli EAF (+) observou-se que, como os BCGs recombinantes desenvolvidos tinham o objetivo de protótipar vacina anti-EPEC, sua capacidade imunogênica para induzir IgA precisou ser avaliada, ou seja, foi necessário demonstrar que BCG que expressa a proteína recombinante BfpA e Intimina, produto dos genes bfpA ou intimina transferido de E. coli EAF (+), quando injetado por via intraperitoneal induz produção de anticorpos anti-BfpA e anti-Intimina. Os títulos anticorpos, quantificados por ELISA, apareceram no soro três semanas depois da "primo-imunização" e aumentaram com os "boosters". Esses anticorpos reconheceram, por "Western blot", BfpA e Intimina recombinantes.

[0075] Para cumprir esta etapa de demonstração, utilizou-se um método conhecido na patente PI 0503817-0 (Cristalia), adotando-se as seguintes etapas:

(1) Esquema de Imunização e Identificação de imunoglobulinas excretadas nas fezes: Grupos de camundongos

"Swiss outbred" foram imunizados via oral com uma solução contendo  $1 \times 10^6$  UFC/camundongo de rBCG-pMH12-bfpA ou rBCG-pMH12-intimina ou BCG vazio;

(II) Coleta das fezes: Para coleta das fezes após a imunização, os animais dos diferentes grupos experimentais foram colocados em gaiolas sem maravalha por 30 minutos. Os pellets fecais foram ressuspensos em PBS contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF – Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, JIN, EUA) e 1% de soro albumina bovina (BSA – Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, EUA) na proporção de um grama de fezes para 5 mL da solução. Após repouso de 15 minutos em gelo, foram agitados vigorosamente em agitador *vórtex* e depois de mais 15 minutos em repouso, as amostras foram novamente agitadas e centrifugadas a 22000 x g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram removidos, distribuídos em alíquotas e estocados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de produção de anticorpos por ELISA;

(III) Determinação dos títulos de anticorpos IgA e IgG anti-BfpA e anti-Intimina por ELISA.

[0076] Os títulos de anticorpos séricos (IgG total, IgG1, IgG2a e IgA) e IgA secretada nas fezes anti-BfpA ou anti-Intimina foram determinados pelo teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (ENGVALL e PERLMAN, 1971). As dosagens foram realizadas em microplacas de 96 poços com propriedade de alta ligação Maxisorp (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, EUA) sensibilizadas com 1  $\mu\text{g/ml}$  dos antígenos diluídos em tampão Carbonato-Bicarbonato pH 9,6 (0,05 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 0,05 M  $\text{NaHCO}_3$ ) por 16 horas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após este período inicial de incubação, as placas foram

lavadas 3 vezes com tampão PBS contendo Tween a 0,053 (PBS-T). Após a lavagem, as placas foram bloqueadas com 0,5% de gelatina em PBS-T por 2 horas a 37 °C. As amostras foram distribuídas e diluídas em série no diluente PBS-T/Gelatina 0,958, incubadas durante 1 hora a 37 °C para dosagem de IgG e seus isótipos e por 18 horas para IgA sérica e secretada. As placas foram lavadas e 100 µL dos anticorpos anti-IgG (diluídos 1: 2000), anti-IgGL, anti-IgG2a (diluídos 1: 1000) ou anti-IgA (diluído 1: 500) marcados com peroxidase (Promega Co., Madison, Wi, EUA) foram adicionados e as placas incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguiram-se lavagem 3 vezes em PBS-T e 100 µL do tampão substrato (20 mg OPD diluído em 40 mL tampão Citrato-Fosfato pH 5,0 – 0,1 M ácido cítrico; fosfato de sódio bifásico 0,2 M/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%) foi adicionado; as placas foram mantidas no escuro até a reação ser revelada. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de ácido cítrico a 0,2 M. A leitura foi feita em λ 450 nm utilizando-se leitor de ELISA (Multiskan – Labsystems, Helsinki, Finlândia). Os títulos foram calculados desprezando-se 20% do valor da absorbância da diluição de saturação e expressos em log<sub>2</sub>.

#### **Referências:**

[0077] ANDRADE, J.A.B.; MOREIRA, C.; FAGUNDES-NETO, U. Diarréia Persistente. J. Pediatr., p. 119-126, 2000. Supl. 2, Artigo de Revisão.

[0078] BERN, C.; MARTINES, J.; DE SOYSA, IT et al. The magnitude of the global problem of acute diarrheal disease: A ten year up data. Bull World Health Organ, v. 70, p. 705, 1992.

[0079] SNYDER, J.D.; MERSON, M.H. The magnitude of the global problem of acute diarrheal disease: A review of active surveillance data. *Bull World Health Organ*, v. 60, p.604, 1962.

[0080] WARREN, K.S. Tropical medicine or tropical health: The Health Clark Lectures, 1988. *Ver. Infect. Dis.*, v. 12, p. 142, 1990.

[0081] BLAKE, P.A.; RAMOS, S.; MACDONALD, K.L. et al. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal disease in urban Brazilians infants. *J. Infect. Dis.*, v. 167, p. 627, 1995.

[0082] GOMES, T.A.; BLAKE, P.A.; TRABULSI, L.R. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse and aggregative adherence to Hela cells in infants with diarrhea and matched controls. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, p.266, 1989.

[0083] ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.*, v. 38, p.699, 1992. Review.

[0084] DUPON, H.L.; FORMAL, S.B.; HORNICK, R.B. et al. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.*, v. 285, p. 1, 1971.

[0085] CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A. et al. Association of *Escherichia coli* Hep -2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. *Lancet.*, v. 337, p.262, 1991.

[0086] DONNENBERG, M.S.s KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Imun.*, v. 60, p. 3953, 1992. Mini Review.

[0087] ROTHBAUM, R.; McADANS, A.J.; GIANNELLA, R. et al. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent Escherichia coli: A cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterology*, v. 83, p. 441, 1982.

[0088] McDANIEL, T.K.; KAPER, J.B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacement phenotype on E. coli K-12. *Mol. Microbiol.*, v. 23, p. 399, 1997.

[0089] KAPER, J.B. EPEC delivers the goods (Comments viewpoint). *Trends in Microbiol.*, v. 6, p. 169, 1998.

[0090] ELLIOTT, S.J.; O'CONNELL, C.B.; KOUTSOURIS, A. et al. A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic Escherichia coli to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 2211, 2002.

[0091] GISNERO-ORDONEZ, J.; DALL'AGNOL, M.; TRABULSI, L.R.; GIRON, J.A. Expression of the bundle-forming pilus by enteropathogenic Escherichia coli strains of heterologous serotypes. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 2291, 2002.

[0092] GIRON, J.A.; TORRES, A.G.; FRER, E.; KAPER, J.B. The fimbriae of enteropathogenic Escherichia coli mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.*, v. 44, p. 361, 2002.

[0093] KELLER, R.; ORDONEZ, J.G.; OLIVEIRA, R.R.; TRABULSI, L.R.; BALDWIN, T.J.; KNUTTON, S. Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic Escherichia.

[0094] MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. of Immunol.*, v. 83, p. 331, 2003.

[0095] FARIA, A.M.C.; WEINER, H.L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv. Immunol.*, v. 73, p. 153, 1999.

[0096] MABIUS, R.E. Organogenesis of lymphoid tissue. *Nat. Rev. of Immunol.*, v. 3, p. 292, 2005.

[0097] HONDA, K. et al. Molecular basis for hematopoietic /mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J. Exp. Med.*, v.193, p. 621, 2001.

[0098] KERNEIS, S.; BOGDANOVA, A.; KRAEHENBUHL, J.P.; PRINGAULT, E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science*, v. 277, p.949, 1997.

[0099] WAGNER, N. et al. L-selectin and  $\beta$ -integrin synergistically mediate lymphocyte migration to mesenteric lymph nodes. *Eur. J. Immunol.*, p. 28, p.3832, 1996.

[0100] CAMPBELL, D.J.; BUTCHER, E.C. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4 T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J. Exp. Med.*, v. 195, p. 155, 2002.

[0101] KHOO, U.Y.; PROCTOR, I.E.; MACPHERSON, A.J. CD4+ T cell down-regulation in human intestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens. *J. Immunol.*, v. 158, p. 3626, 1997.

[0102] MCINTYRE, T.M.; STROBER, W. In: Mucosal Immunology, 2nd edition (OGRA, P.L. et al.), p. 329-356 (Academic Press, San Diego, 1999).

[0103] READ, S.; POWRIE, F. CD4<sup>o</sup> regulatory T cells. Curr.

[0104] Opin. Immunol., v. 13, p. 644, 2001. |

[0105] ALLEY, C.D.; MESTECKY, J. The mucosal immune system. In: BIRDAND, G.; CALVERT, J.E. B lymphocytes in human disease. Oxford University Press, p. 222-254, 1988.

[0106] ALLANSMITH, M.R.; McCLELLAN, B.H.; BUTTERWORTE, M.; MALONEY, J.R. The development of immunoglobulin levels in man. J. Pediatr., v. 72, p. 276, 1966.

[0107] MELLANDER, L.; CARLSSON, B.; HANSON, L.A. Appearance of secretory IgM and IgA antibodies in saliva during early infancy and childhood. JJ. Pediatr., v. 104, p.564, 1964.

[0108] BRANDTZAEG, P. The role of J chain and secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in man. Scand. J. Immunol., v. 22, p. 111, 1989.

[0109] MESTECHLY, J.; LUE, C.; RUSSELL, M.W. Selective transport of IgA: cellular and molecular aspects. Gastroenterol. Clin. North. Amer., v. 20, p. 441, 1991.

[0110] BUTCHER, E.C.; PICKER, L.J. Lymphocyte homing and homeostasis. Science, v. 272, p. 60, 1996.

[0111] WEINBERG, A.D.; ENGLISH, M.; SWAIN, S.L. Distinct regulation of lymphokine production is found in

fresh versus in vitro primed murine helper T cells. *J. Immunol.*, v. 144, p. 1800, 1990.

[0112] POWERS, G.D.; ABBAS, A.K.; MILLER, R.A. Frequences of IL-2 and IL-4 -secreting T cells in naive and antigen-stimulated lymphocyte populations. *J. Immunol.*, v.140, p. 3352, 1966.

[0113] DAYNES, R.A.; ARANEO, B.A.; DOWELL, T.A.; HUANG, K.; DIDLEY, D. Regulation of murine lymphokine production in vivo . III. The lymphoid tissue microenviroment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J. Exp. Med.*, v. 171, p.979, 1990.

[0114] HSIEH, C.A.; MACTONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K.M. Development of Th1i CD4+ T cells through JIL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, v. 260, p. 547, 1995.

[0115] TRINCHIERI, G. Interleukine-12: A proinflammatory cytkine with immunoregulatory functions that bridge innata nad antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 13, p. 251, 1995.

[0116] COFFMANN, R.l.; VARKILA, K.; SCOTT, P.; CHATELAIN, R. Role of cytokines in the differentiation of CD4+ T-cells subsets in vivo. *Immunol. Rev.*, v. 123, p. 189, 1991.

[0117] MOSSMANN, T.R.; COFFMANN, R.L. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different unctional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 145, 1989.

[0118] SCOOLEY, K.A.; COFFMANN, R.L.; MOSSMANN, T.R.; PAUL, W.E. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 8, p. 303, 1990.

[0119] MCGHEE, J.R.; MESTECKY, J.; ELSON, C.O.; KIJONO, H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J. Clin. Immunol.*, v. 9, p.175, 1989.

[0120] TIMM, J.; LIM, E.M.; GICQUEL, B. Escherichia coli-mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusions to lacZ: the pJEM series. *J. Bacteriol.*, v. 21, p. 6749-6753, 1994.

[0121] MURRAY, A. et al. Expression of Escherichia coli beta-galactosidase in Mycobacterium bovis BCG using an expression system isolated from Mycobacterium paratuberculosis which induced humoral and cellular immune responses. *Mol. Microbiol.*, v.22, p; 3331-3342, 1992.

[0122] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, v. 227, p 5259-5680, 1970.

[0123] VASCONCELLOS, H.L.F.; NASCIMENTO, I.P.; LEITE, L.C.C.; KIPNIS, A.; DIAS DA SILVA, W. Development of live recombinant Bacillus Calmette Guérin (BCG) carrying Escherichia coli bfpA virulence gene and its expression of immunogenic BfpA recombinant protein. *Vaccine.*

[0124] ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, v. 8, p. 871-874, 1971.

### REIVINDICAÇÕES

1. Método e ensaio pré-clínico para obtenção de vacina usando bacilo Calmette-Guérin (BCG) e *Mycobacterium smegmatis* que expressam os fatores de virulência BfPA e intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) **caracterizado pelo** fato de o método produzir cepas de BCGs recombinantes que expressem fatores de virulência de *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), mais especificamente, BCGs recombinantes que induzem resposta imune específica para epítomos presentes na proteína recombinante BfpA e a proteína Intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC); em que o método emprega as seguintes etapas:

Etapa 1- Purificar a proteína BfpA de SEQ ID NO:1 e a proteína Intimina de SEQ ID NO:2 de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) *in vitro* através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR), em que o gene *bfpA* e o gene *intimina* são amplificados a partir de EPEC utilizando-se os iniciadores de SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO:4, e SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO:6, respectivamente, em que os fragmentos obtidos são separados em gel de agarose 1,0% e purificados através de um kit para a purificação e concentração de produtos de PCR ou fragmentos de DNA que variam em tamanho de 50 bp a 10 kb;

Etapa 2 - Isolar e clonar os genes *bfpA* de SEQ ID NO:7 e intimina de SEQ ID NO:8 no plasmídeo de expressão (pMIP12) em *M. smegmatis* e *M. bovis* utilizando os iniciadores de SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO:4, e SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO:6, respectivamente, e obter e selecionar cepas de BCG que

contenham um dos vetores recombinantes pMH12-*bfpA* ou pMH12-*intimina*;

Etapa 3 - Amplificar e sequenciar os genes que codificam as proteínas *bfpA* e *intimina*, em que cada plasmídeo contendo o gene *bfpA* ou *intimina* é sequenciado na direção 5'-3', utilizando o referido iniciador em tubo individual e ao término do programa, cada produto de reação é lavado com 40 µL de isopropanol 65% para incubação de 30 minutos seguido de centrifugação por 25 minutos a 12.000 rpm a 26 °C, em que posteriormente são adicionados 200 µL de etanol 60% aos tubos e procede à centrifugação de 5 minutos a, preferencialmente, 12.000 rpm a 26 °C, em que posteriormente 10 µL de formamida é adicionada por tubo, sendo os tubos colocados numa placa para sequenciamento que é levada ao termociclador durante 1 minuto a 96°C, seguido de banho de gelo, para posterior inserção da placa no sequenciador automático;

Etapa 4 - Verificar se as cepas de rBCGs contendo o gene *bfpA* de SEQ ID NO:9 e o gene *intimina* de SEQ ID NO:10 sintetizam a proteína recombinante BfpA de SEQ ID NO:11 e a proteína recombinante Intimina de SEQ ID NO:12, em que a verificação é realizada respectivamente através da seguinte sequência:

(a) obtenção da "competência", em que BCG são cultivados em garrafas de 500 mL contendo 100 mL de meio líquido contendo albumina-dextrose-catalase (ADC), 10% mais polissorbato 80 0,05% (MB7H9) ou meio sólido suplementado com ácido oleico-albumina-dextrose-catalase (OADC) 10% (MB7H10), contendo ou não kanamicina (20 µg/mL) a 37°C em

atmosfera até D.O. 0,5 a 600 nm, em que a cultura é centrifugada, lavada com água ultrapura tipo I a 4°C e ressuspendidas em 10% de glicerol, sendo que o estoque de BCG competente é mantido a -80°C;

(b) transformação e seleção, em que uma alíquota estoque de 50-200 µL de BCG competente obtida no item "a" é misturada com 1-10 µg de DNA plasmidial em cubeta de eletroporação de 2 mm e esta submetida à pulsações de 2,5 kV, 25 µF e 1000 Ω em um eletroporador de pulsação, em que após a eletroporação, o conteúdo das cubetas é recuperado e, 5 mL de meio MB7H9, sem antibiótico, é incubado a 37°C por 20h antes de ser semeado sobre MB7H10 contendo kanamicina (20 µg/mL), em que as colônias transformadas são selecionadas após incubação de 20 a 30 dias a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>;

(c) extração de proteínas, em que as colônias isoladas de BCG obtidas no item "b" são crescidas em garrafas de 200 mL contendo 50 mL de meio MB7H9 suplementado com albumina de soro bovino 10% ou meio MB7H10 suplementado com ODC, mais kanamicina 40 µg, seguindo de incubação a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 20-30 dias até a saturação, em que 5 mL do referido meio são centrifugados a 4.000 rpm por 10 s, lavado com 5 mL de PBS, centrifugados novamente e as bactérias ressuspendidas em 500 µL de PBS estéril contendo 0,5 µL de inibidores de proteases, tais como ditioneitol (DTT), fenilmetilsulfonilflúor (PMFS), aproptin, leupeptin e pepstatin, seguido do congelamento das amostras a -20°C, com posterior sonificação de 18 ciclos com 10 segundos cada, com intervalos de 10 s, em que as amostras

são centrifugadas para quantificação de proteína nos sobrenadantes recuperados, e os extratos proteicos são posteriormente aplicados em gel de poliacrilamida mais duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE); e

(d) preparação da vacina, em que compreende os 45 mL restantes do referido meio de cultura descrito no item "c", em que o precipitado é lavado com 5 mL de água ultrapura tipo I estéril, centrifugado novamente e as bactérias ressuspensas em 1 mL de uma solução de glicerol a 10% água, estéril, sendo que as amostras são aliqüotadas em 50 µL e conservadas a -70°C para preparação da vacina; e

Etapa 5 - Desenvolver protocolos para investigar o potencial imunogênico das cepas e usando produção de anticorpos como referencial, em que os referidos protocolos utilizam respectivamente os seguintes testes/métodos:

(a) quantificação de proteínas, em que a quantificação das amostras de vacina é feita através do método do Ácido Bicinconínico utilizando albumina de soro bovino (BSA)

(b) determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC), em que amostras das vacinas são diluídas  $10^5$  e  $10^6$  vezes e plaqueadas em 7H10 mais kanamicina 20 µg/mL, em que ao final de 21 dias o número de colônias presentes nas placas são contados, determinando o volume de vacina necessário para uso;

(c) análise por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em que os géis de SDS-PAGE são feitos em sistema descontínuo constituído de gel separador com 12% de acrilamida e gel de

empilhamento com 4% de acrilamida em tampão de corrida Tris-Glicina, em que é utilizada uma corrente elétrica de 80V até as amostras de vacina cruzarem o gel de empilhamento, seguido do ajuste da corrente elétrica para 120V até o fim da corrida, em que 30 µg/poço de amostras de extratos de rBCG são aplicadas paralelamente; e

(d) aplicação do método *Western Blot*, em que o gel é carregado com 30 µg de cada lisado de rBCG, com posterior transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de nitrocelulose sob voltagem constante de 10 V por um período de 2h em tampão fosfato, em que posteriormente a membrana é corada com Ponceau S, lavada com água destilada e bloqueada com 50 mL de leite desnatado durante a noite a 4 °C, em que em seguida a membrana é incubada com anticorpo anti-BfpA ou anti-Intimina de coelho (IgG), e incubados durante 1,5 hora a temperatura ambiente, seguido da lavagem da membrana com PBS-T por 5 vezes de 5 minutos cada lavagem, em que é incubada com anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase diluído 1:3000 e 1:1000, respectivamente, durante 1,5h a temperatura ambiente, em que posteriormente a membrana é novamente lavada, e após as lavagens a membrana é revelada com solução 3,3-diaminobenzidina (DAB), sendo a reação interrompida através da adição de destilada, após a visualização das bandas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de a vacina usar bacilo Calmette-Guérin (BCG) e *Mycobacterium smegmatis* expressando os fatores de virulência do gene BfpA e intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).

FIG.1

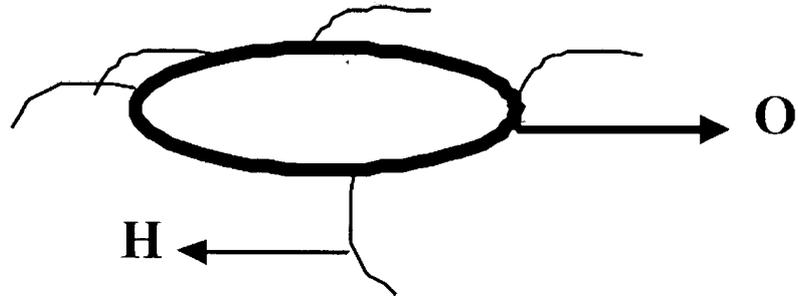
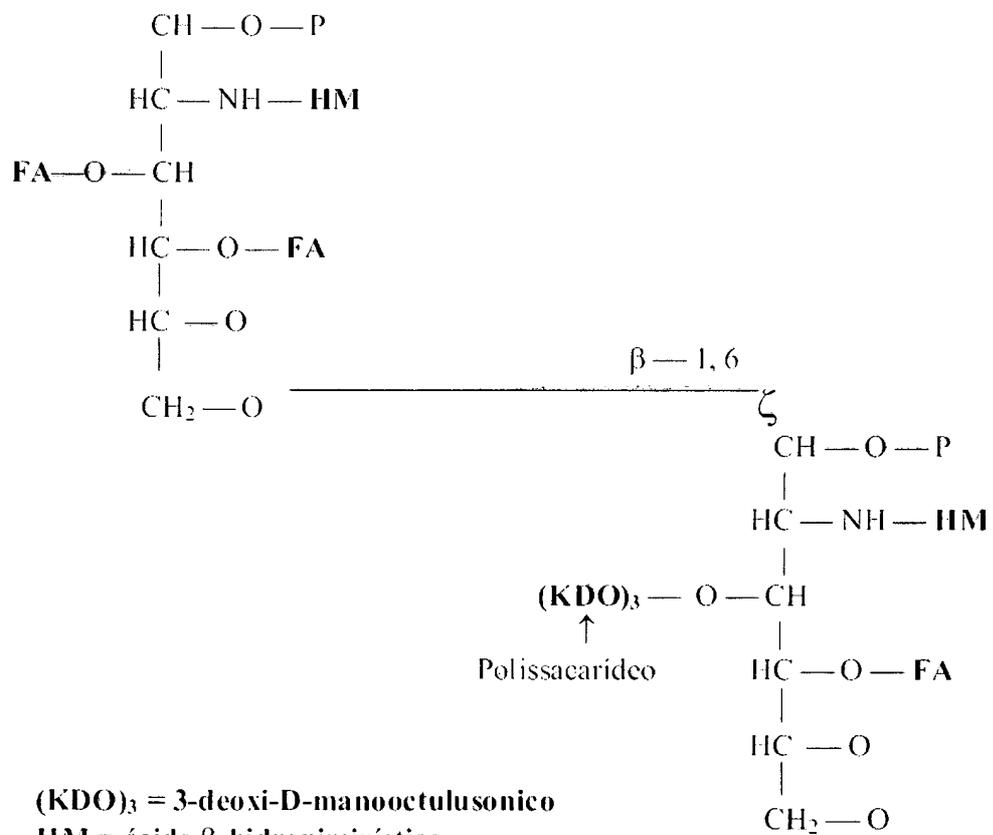


FIG.2



↑  
Polissacarídeo

(KDO)<sub>3</sub> = 3-deoxi-D-manoctulose  
 HM = ácido β-hidroximíristico  
 FA = outros ácidos graxos de cadeia longa



FIG.4

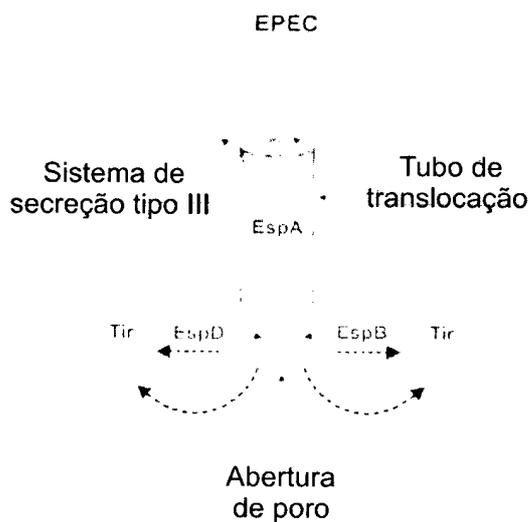


FIG.5

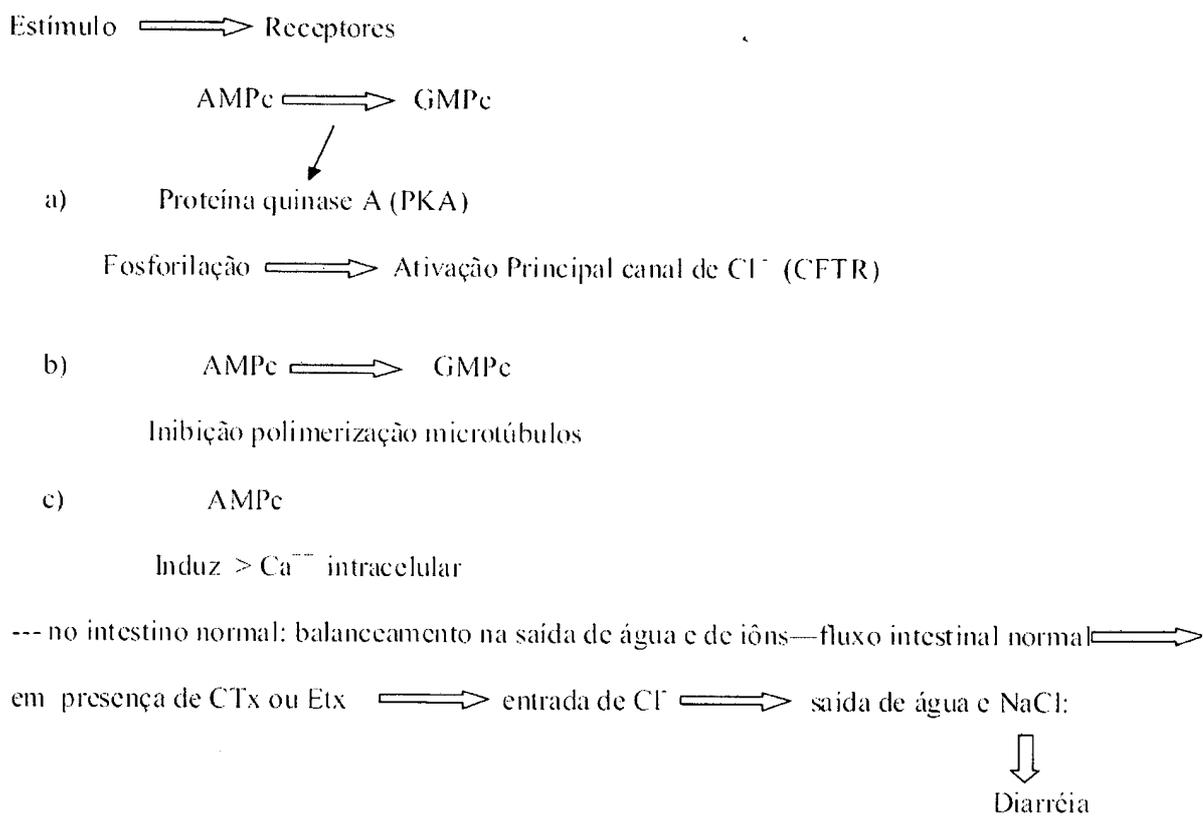
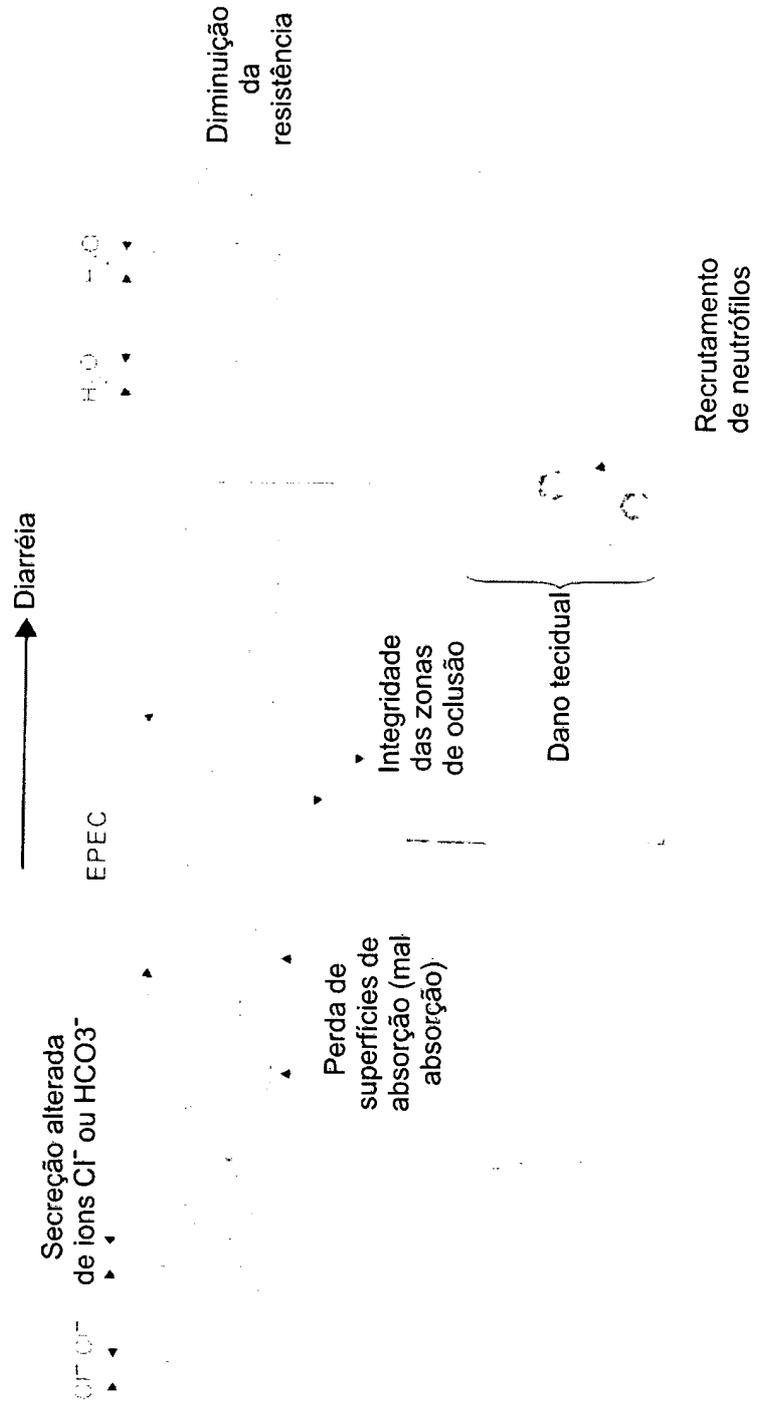


FIG.6



Diarréia

EPEC

Secreção alterada de ions  $Cl^-$  ou  $HCO_3^-$

Perda de superficies de absorção (mal absorção)

Diminuição da resistência

Integridade das zonas de oclusão

Dano tecidual

Recrutamento de neutrófilos