

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

(21) **PI0904468-0 A2**

(22) Data de Depósito: 07/10/2009  
(43) Data da Publicação: 14/06/2011  
(RPI 2110)



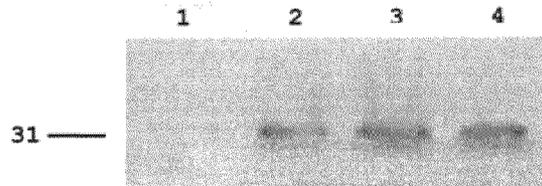
(51) *Int.Cl.:*  
A61K 39/04 2006.01  
A61K 39/10 2006.01  
A61P 35/00 2006.01  
C12N 1/21 2006.01  
C12N 15/31 2006.01

(54) Título: **IMUNOTERÁPICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE IMUNOTERÁPICO PARA MANUFATURA DE MEDICAMENTO PARA USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

(73) Titular(es): Fundação Butantã, Hospital Alemão Oswaldo Cruz

(72) Inventor(es): Daher Cezar Chade, Enrico Ferreira Martins de Andrade, Fabiola Elizabeth Villanova, Isaías Raw, Ivan Pereira Nascimento, Katia Ramos Moreira Leite, Luciana Cezar de Cerqueira Leite, Miguel Srougi, Priscila Maria de Andrade Borra, Ricardo Carneiro Borra

(57) Resumo: IMUNOTERÁPICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE IMUNOTERÁPICO PARA MANUFATURA DE MEDICAMENTO PARA USO NO TRATAMENTO DE CÂNCER. A presente invenção refere-se a um imunoterápico que compreende uma cepa de Mycobacterium bovis, Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinante que codifica ao menos um antígeno de Bordetella pertussis. A presente invenção refere-se também a composições farmacêuticas que compreendem os imunoterápicos descritos na presente invenção. A presente invenção refere-se ainda ao uso dos imunoterápicos descritos na presente invenção para a manufatura de medicamentos com ação inflamatória e ativação inespecífica do sistema imune para uso no tratamento ou prevenção de câncer.





PI0904468-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:  
**"IMUNOTERÁPICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE  
IMUNOTERÁPICO PARA MANUFATURA DE MEDICAMENTO PARA USO NO  
TRATAMENTO DE CÂNCER".**

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um imunoterápico que compreende uma cepa de *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinante que codifica ao menos um antígeno de *Bordetella pertussis*.

10 Em particular a presente invenção refere-se a um imunoterápico que compreende uma cepa de *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinante, auxotrófica para lisina ou outros amino ácidos, complementada com o gene *lysA* ou outros, e que codifica  
15 também um antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como a subunidade 1 da toxina pertussis, S1PT.

A presente invenção refere-se também a composições farmacêuticas que compreendem os imunoterápicos descritos na presente invenção.

20 A presente invenção refere-se ainda ao uso dos imunoterápicos descritos na presente invenção para a manufatura de medicamentos com ação inflamatória e ativação inespecífica do sistema imune para uso no tratamento ou prevenção de câncer.

## FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

### **Do Câncer.**

O câncer é o resultado de uma série de alterações nos genes que controlam o crescimento e o comportamento celular. Essas alterações provocam um crescimento celular desordenado e contínuo, inferindo nessas células anormais a capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes, bem como a capacidade de migrar e se alojar em outras regiões do organismo (metástase). O câncer pode surgir de qualquer tipo de célula e de qualquer tipo de tecido, não sendo uma doença única, mas um grande número de doenças caracterizadas pelo seu local de origem.

Dividindo-se rapidamente, estas células anormais tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias (acúmulo de células cancerosas). Existem centenas de formas distintas, sendo três os principais subtipos: os sarcomas, os carcinomas e os linfomas (leucemias). O câncer é a segunda maior causa de morte de adultos no mundo ocidental, e é uma das principais causas de morte por doença em crianças de 1 a 14 anos.

Atualmente existem quatro tipos principais de tratamento: cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Essas terapias são largamente utilizadas,

podendo ser usadas isoladamente ou em combinação entre si. O determinante para escolha do tratamento dependerá do local, tamanho e fase do tumor, bem como o estado de saúde global do paciente.

5           Embora a terapia atual para o câncer dependa, principalmente, do uso de cirurgia, irradiação e quimioterapia, a evolução na compreensão da biologia da transformação maligna e das diferenças no controle da proliferação da célula normal e cancerosa proporcionou a  
10 descoberta de novos alvos potenciais para o tratamento do câncer através da imunoterapia, uma vez que nem sempre é possível garantir a erradicação total das células cancerosas com a utilização de tais terapias.

Estudos imunológicos revelaram que a progressão da  
15 doença tecidual para a forma invasiva do câncer requer células que participam normalmente de processos de cicatrização e outras atividades funcionais, para serem desviadas para o local onde se está iniciando a formação de tecido pré-malígnio; essas células são mobilizadas nesse  
20 ambiente favorecendo a carcinogênese. Assim compreende-se que um tumor não é apenas um conjunto de células anormais, mas é dependente também de vários fatores como o micro ambiente tumoral que abrange células do tecido imunológico e sinais químicos que cruzam uma extensa rede de vasos

sangüíneos. Esse novo enfoque sobre o câncer reforça a necessidade de erradicar até a última célula cancerosa (Coussens LM, Werb Z. *Nature* 2002;170:964-969).

A resposta imunológica é caracterizada em Th1 ou Th2  
5 conforme o padrão de citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4+ e CD8+. A resposta Th1 está ligada à imunidade celular inata, que protege o organismo contra agentes patogênicos específicos e toxinas, além de proporcionar ação antitumoral, enquanto que a Th2 favorece a resposta  
10 humoral ou adaptativa, que é medida pela ação de anticorpos. As duas respostas interagem entre si, com efeitos inibitórios e/ou regulatório, sendo que em indivíduos acometidos por neoplasias observa-se uma modulação negativa da resposta do tipo celular (Van Kempen  
15 LC, et al. *Differentiation research in biological diversity* 2002;70:610-623).

Os conhecimentos adquiridos no campo da imunologia, em especial no que se refere à imunidade inata, forneceram importantes indícios da conexão entre inflamação e câncer,  
20 transformando completamente o entendimento da fisiopatologia neoplásica. A imunoterapia é hoje utilizada, na tentativa de curar ou modificar o crescimento tumoral através da intensificação da resposta imune do paciente, contra os antígenos tumorais (Mantovani, et al. *Nature*

2008;**454**:436-444).

**Do uso do bacilo de Calmette-Guérin (BCG) na terapia de câncer.**

Albert Calmette e Camille Guérin, no início do século  
5 passado, atenuaram uma cepa virulenta de *Mycobacterium bovis*. Esta cepa é conhecida atualmente como bacilo de Calmette-Guérin (BCG), tendo sido utilizada como vacina contra a tuberculose em cerca de 3 bilhões de indivíduos em todo o mundo.

10 Em 1976, Morales, Eidinger e Bruce foram os primeiros a relatar o sucesso da terapêutica do câncer superficial de bexiga empregando o bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Morales A, Eidinger D, Bruce AW. *The Journal of Urology* 1976;116:180-183). Desde então, essa imunoterapia na forma  
15 de infusão de BCG intravesical vem sendo utilizada para tratar e prevenir a recorrência de tumores superficiais de bexiga (Patente US 5,712,123). O bacilo de Calmette-Guérin (BCG) também tem demonstrado eficácia contra outros tipos de tumores, como por exemplo: melanomas, câncer de pulmão e  
20 leucemia (Patente US 5,712,123).

Embora o mecanismo de efeito antitumoral do BCG não esteja completamente definido, há um consenso geral que a aplicação intravesical de BCG causa reação inflamatória não específica do sistema imune. Deste modo, leva a ativação e

infiltração de células T, induzindo predominantemente, a produção de citocinas relacionadas à resposta Th1, maior responsável pelo efeito antitumoral. Há também estimulação da resposta Th2, como a liberação de citocinas IL-4, IL-5, 5 IL-6 e IL-10, o que pode estar relacionado aos efeitos colaterais locais e sistêmicos da imunoterapia intravesical com BCG (Luo Y. et al. *Clinical and experimental immunology* 2006;146:181-188).

Cerca de 90% dos tumores vesicais de bexiga são 10 carcinomas de células transicionais (CCT) que surgem no revestimento interno da bexiga chamado de urotélio. Desses, cerca de 75% dos casos apresentam recorrência, onde 45% levam a progressão para doença invasiva (Sylvester RJ. et al. *The Journal of Urology* 2005;174:86-91).

15 A terapêutica clínica do câncer vesical baseia-se, principalmente, em fenômenos antineoplásicos decorrentes da estimulação de respostas imunológicas do tipo celular e humoral. Apesar dos recentes avanços na procura por novas terapias, como o uso de Epirrubicina, Doxorubicina, 20 Gencitabina e Mitomicina C, a aplicação intravesical do BCG continua apresentando a maior eficácia na prevenção de recorrência de progressão tanto do carcinoma urotelial, quanto no carcinoma *in situ* (CIS) da bexiga. (Bohle, A. et al. *The Journal of urology* 2003;169:90-95).

O grande avanço no desenvolvimento de terapêuticas baseadas em modulação da resposta imunológica foi decorrente de pesquisas *in vivo*. Os modelos animais propiciaram estudos da fisiopatologia, da imunologia do tumor vesical e, inclusive, avaliação de efeitos colaterais frente às novas terapêuticas. O modelo ortotópico singênico utiliza células da linhagem MB-49, provenientes de tumor vesical de camundongo C57BL/6. As células MB-49 são conhecidas por induzir a produção das IL-10 e IL-4 que direcionam o sistema imune para resposta do tipo Th2, dificultando, assim, uma reação antitumoral mais efetiva. Esta importante característica, também, é encontrada em tumores vesicais de humanos, logo, o modelo animal com células MB-49 apresenta resposta imune semelhante ao humano favorecendo os estudos comparativos (Gunther, J. H. et al. *Cancer Res* 1999;**59**:2834-2837).

#### **Do BCG Recombinante.**

O BCG é a vacina mais utilizada no mundo por apresentar resposta imune duradoura e frequência muito baixa de efeitos adversos sérios. Essa e outras características tornam a BCG um excelente candidato a veículo para apresentação de antígenos heterólogos, tendo em vista uma possível vacina recombinante baseada em BCG (Patente US 6,673,353).

O mecanismo imunoterápico do BCG ficou melhor compreendido com a identificação dos genes responsáveis pelo efeito antitumoral, possibilitando a produção de organismos recombinantes capazes de estimular resposta Th1  
5 mais intensa, visando uma diminuição da dose a ser empregada e, conseqüentemente, menos efeitos colaterais.

A expressão de domínios imunogênicos de bactérias, vírus e parasitas tem sido utilizado com sucesso no BCG, gerando cepas recombinantes (rBCG), as quais produzem  
10 resposta imune não só contra o bacilo da tuberculose, mas também, contra os patógenos cujas proteínas estariam expressas nesse rBCG (Patente US 5,504,005). A adição de uma domínio imunogênico específico em uma rBCG confere a proteção imunológica específica esperada, no entanto,  
15 reações distintas das que são de conhecimento habitual ainda não foram descritas.

Também já é de conhecimento do estado da técnica a viabilidade do uso da rBCG como estratégia para a expressão de citocinas, agentes farmacológicos e agentes  
20 antitumorais, promovendo a base para uma nova estratégia de tratamento de certos tipos de câncer (Patente US 5,776,465). A utilização dessa estratégia confere a rBCG a capacidade de expressar proteínas ou polipeptídios específicos que atuam como inibidores do crescimento

celular ou como substâncias citotóxicas para células cancerosas (ex: interferon  $\alpha$  ou  $\beta$ , interleucinas 1-7 ou fator de necrose tumoral  $\alpha$  ou  $\beta$ ).

Também já foi demonstrado que vacinas rBCG são capazes de promover uma resposta imune tanto humoral quanto celular, sendo uma opção no tratamento de determinados tipos de câncer. A possibilidade de utilizar a rBCG para expressar agentes antitumorais específicos (Patente US 5,776,465) também já é conhecida como uma possível alternativa no tratamento do câncer.

#### **Do rBCG-Pertussis (rBCG-S1PT).**

*Bordetella pertussis* é uma bactéria que causa uma doença infecciosa do trato respiratório conhecida como coqueluche, pertussis ou "tosse cumprida". Uma vacina celular efetiva contra pertussis foi desenvolvida na década de 40 por Kendrick e colaboradores (Kendrick, P. L. et al. Am. J. Public health 1947;**37**:803-810). No entanto, esta vacina celular obtida a partir de células inteiras é difícil de ser padronizada e pode produzir efeitos colaterais indesejáveis e por vezes de gravidade considerável. Tais efeitos adversos levaram ao desenvolvimento das vacinas acelulares contra pertussis (Patente US 5,877,298).

A toxina pertussis é um importante fator de virulência

e é o principal determinante imunogênico utilizado nas vacinas produzidas atualmente contra a *Bordetella pertussis* (Sato, Y. & Sato, H. *Biologicals* 1999;**27**,61-69).

No Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, uma  
5 vacina de rBCG foi desenvolvida através da expressão da subunidade não-tóxica S1 da toxina pertussis (PT) de *Bordetella Pertussis* utilizando um vetor de expressão de micobactérias, sob o controle do promotor da  $\beta$ -lactamase (pBlaF\*) de *M. fortuitum*, contendo um gene de resistência a  
10 kanamicina (Nascimento IP, et al. *Infection and immunity* 2000;68:4877-4883). O BCG-Pertussis recombinante (rBCG-S1PT) possibilitaram, como esperado uma imunização neonatal contra Pertussis e uma imunização, de mesma eficácia que o BCG, contra a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*  
15 (tuberculose), e como tal, consiste numa variante do BCG tradicional.

#### OBJETIVOS DA INVENÇÃO

A vacina rBCG-S1PT desenvolvida no Instituto Butantan apresentou o efeito técnico inesperado de provocar uma  
20 resposta imune antitumoral mais intensa quando comparada com o BCG tradicional. Ou seja, a adição de um domínio imunogênico, como por exemplo, a subunidade não-tóxica S1 da toxina pertussis, que sabidamente não tem nenhuma ligação com nenhum tipo de câncer, em uma cepa de BCG,

provocou um aumento da resposta imune antitumoral de BCG.

Em vista do exposto, tem a presente invenção o objetivo de prover um imunoterápico que compreende uma cepa de *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinate que codifica ao menos um antígeno de *Bordetella pertussis*.

Em particular constitui um objetivo da presente invenção, prover um imunoterápico que compreende uma cepa de *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinate, auxotrófica para lisina ou outros amino ácidos, complementada com o gene *lysA* ou outros, e que contém outro gene que codifica um antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como, mas não limitado, à subunidade 1 da toxina pertussis, S1PT.

Constitui um outro objetivo da presente invenção prover composições farmacêuticas que compreendem os imunoterápicos descritos na presente invenção.

Constitui um outro objetivo da presente invenção o uso dos imunoterápicos descritos na presente invenção para a manufatura de medicamentos com ação inflamatória e ativação inespecífica do sistema imune para uso no tratamento ou prevenção de câncer.

#### DEFINIÇÕES

No âmbito deste pedido de patente são utilizadas por

diversas vezes abreviaturas cujas definições conforme empregues neste pedido se encontram resumidas abaixo:

- BCG refere-se ao *Mycobacterium bovis* atenuado, bacilo de Calmette-Guérin;
- 5 • BCG-lysA<sup>-</sup> refere-se ao BCG auxotrófico para lisina;
- PT refere-se à toxina pertussis de *Bordetella pertussis*; e
- S1PT refere-se à subunidade S1 da toxina pertussis de *Bordetella pertussis*.

#### 10 DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

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  
15 figuras, em combinação com a descrição detalhada da modalidade preferida aqui apresentada.

A Figura 1 mostra o nível de expressão de S1PT em ambos os vetores pNL71-S1PT e pNL71S1-lysA-kan<sup>-</sup>. Os extratos totais de BCG e rBCG (30 µg) foram analisados por  
20 Western blotting usando um anticorpo policlonal anti-PT, sendo: 1) BCG; 2) rBCG-S1PT; 3 e 4) rBCG-lysA<sup>-</sup>-S1lysA<sup>+</sup>kan<sup>-</sup>.

A Figura 2 mostra o peso médio das bexigas nos grupos que receberam implante de células tumorais MB49 e foram

tratados com imunoterápicos.

A Figura 3 mostra a expressão gênica relativa (GAPDH), quantificada por Real Time PCR, dos padrões de resposta imune dos grupos que receberam imunoterápicos após o implante intravesical tumoral.

A Figura 4 mostra a viabilidade das células tumorais MB49 em co-cultura com esplenócitos de camundongos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF.

A Figura 5 mostra a sobrevivência dos camundongos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF, após implante intravesical de células tumorais MB49.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

##### **Descrição dos imunoterápicos.**

A presente invenção refere-se à imunoterápicos que compreendem uma cepa de *Mycobacterium bovis*, bacillus Calmette Guerin (BCG), recombinante que codifica ao menos um antígeno de *Bordetella pertussis*.

Preferencialmente a cepa de *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinante é auxotrófica complementada.

Ainda mais preferencialmente a cepa de *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinante é auxotrófica para lisina e complementada com o gene *lysA*.

Preferencialmente o antígeno de *Bordetella pertussis* é

a subunidade 1 da toxina pertussis, S1PT.

O imunoterápico da presente invenção é obtido preferencialmente a partir de uma cepa de BCG, como carreador para apresentação de uma ou mais antígenos de organismos distintos, obtidos e clonados em vetor de expressão em micobactéria e inserido em BCG recombinante por meio de manipulação genética.

**Propriedades dos imunoterápicos.**

Os imunoterápicos da presente invenção apresentam o efeito técnico inesperado de provocar uma resposta imune antitumoral mais intensa quando comparado com o BCG tradicional. Ou seja, adição de um domínio imunogênico, como por exemplo a subunidade não-tóxica S1 da toxina pertussis, que sabidamente não tem nenhuma ligação com nenhum tipo de câncer, em uma cepa de BCG, provocou um aumento da resposta imune antitumoral de BCG.

Em particular os imunoterápicos da presente invenção promoveram uma diminuição do volume tumoral em modelos animais de tumor vesical.

Além disso, os imunoterápicos da presente invenção levaram a um aumento significativo da expressão de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo controle, fato este que sinaliza para uma resposta polarizada do tipo Th1. Uma vez que o TNF- $\alpha$  é relacionado como sinalizador da ação pro-inflamatória,

caracterizando a fase aguda do processo inflamatório desencadeado pelos bacilos, então os imunoterápicos da presente invenção promovem a ativação direta do sistema imune.

5 Os imunoterápicos da presente invenção levaram também a um aumento significativo de IL-10, uma interleucina considerada essencial no direcionamento da resposta imune para Th2 e/ou inibição para Th1. O IL-10, também, é importante para modulação negativa da resposta imunológica

10 de hipersensibilidade tardia (Asadullah, K., Sterry, W. and Volk, H. D. *Pharmacol Ver* 2003;**55**:241-269). Por outro lado, vários experimentos têm mostrado efeitos diversos em relação ao IL-10 sobre a resposta imune ao câncer. Dependendo do modelo experimental, o IL-10 parece favorecer

15 ou inibir a progressão do tumor. Em neoplasia gástrica, cólon, linfoma, renal há associação ao pior prognóstico. Também, IL-10 está relacionado diretamente a inibição do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos do tumor (Nadlerm, R. et al. *Clin Exp Immunol* 2003;**131**:206-216). No

20 entanto, conforme nossos resultados demonstraram que apesar do aumento de IL-10 com o uso do rBCG-S1PT houve aumento significativo da curva de sobrevivência e redução do volume tumoral, neste grupo de animais. Especula-se, então, que este aumento de IL-10 foi desencadeado na tentativa de

contrabalancear a forte resposta do TNF- $\alpha$ . Sugerimos que o IL-10 esteja participando de um mecanismo compensatório à forte resposta ao TNF- $\alpha$ , sendo um fator limitante ao processo inflamatório excessivo, impedindo seus efeitos  
5 deletérios.

Além disso, o ensaio de viabilidade celular demonstrou que os esplenócitos dos camundongos tratados com os imunoterápicos da presente invenção foram mais eficientes na destruição das células tumorais. Sugerindo que as  
10 citocinas secretadas pelo estímulo dos imunoterápicos da presente invenção com o sistema imune favoreceu uma maior produção de linfócitos BCG-ativados ou outras células efectoras.

Em resumo, a terapia com os imunoterápicos  
15 recombinantes da presente invenção demonstrou benefícios importantes e inesperados no tratamento de tumor vesical, evidenciado pela diminuição de peso da bexiga, que indiretamente se relaciona com menor massa tumoral, e aumento na sobrevivência dos camundongos, além de os  
20 esplenócitos, dos animais testados exibirem maior citotoxicidade à células MB49.

Finalmente podemos concluir que os imunoterápicos da presente invenção ao combinarem BCG e toxinas de outros patógenos, preferencialmente de *Bordetella pertussis*

gerando uma cepa de BCG recombinante, constituem um novo imunoterápico, mais potente e eficaz que o BCG convencional para o tratamento do câncer de bexiga.

**Usos dos imunoterápicos.**

5 Considerando as propriedades dos imunoterápicos da presente invenção descritas acima, constitui um outro aspecto desta invenção, o uso dos imunoterápicos descritos na presente invenção para tratar ou prevenir câncer em animais ou humanos.

10 Em particular, constitui um outro aspecto desta invenção, o uso dos imunoterápicos descritos na presente invenção para tratar ou prevenir câncer de bexiga em animais ou humanos.

Dadas as possibilidades de aplicações terapêuticas dos  
15 imunoterápicos descritos na presente invenção, constitui um outro aspecto desta invenção, o uso dos imunoterápicos descritos na presente invenção para a manufatura de medicamentos para uso no tratamento ou prevenção de câncer em animais ou humanos.

20 Em particular, constitui um outro aspecto desta invenção, o uso dos imunoterápicos descritos na presente invenção para a manufatura de medicamentos para uso no tratamento ou prevenção de câncer de bexiga em animais ou humanos.

Constitui ainda um outro objetivo da presente invenção o uso dos imunoterápicos descritos na presente invenção para a manufatura de medicamentos com ação inflamatória e ativação inespecífica do sistema imune para uso no  
5 tratamento ou prevenção câncer.

Constitui ainda um outro objetivo da presente invenção o uso dos imunoterápicos descritos na presente invenção para a manufatura de medicamentos de infusão intravesical.

Constitui também um aspecto desta invenção,  
10 composições farmacêuticas que compreendem os imunoterápicos descritos na presente invenção.

Mais especificamente constitui um outro aspecto desta invenção, composições farmacêuticas que compreendem os imunoterápicos descritos na presente invenção, e um  
15 veículo, excipiente, diluente ou solvente fisiologicamente aceitável.

Composições farmacêuticas que compreendem um ou mais imunoterápicos descritos na presente invenção, como ingrediente ativo podem ser preparadas de acordo com  
20 técnicas convencionais de combinação farmacêutica [vide *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>o</sup> Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, EUA (1990)]. Tipicamente, uma quantidade do ingrediente ativo será misturada com um excipiente farmacêuticamente aceitável. O excipiente pode

ter uma grande variedade de fórmulas dependendo da forma de preparação desejada para administração, por exemplo, intravenosa, oral ou parenteral. As composições podem conter também agentes estabilizantes, preservativos e  
5 similares.

"Composição farmacêutica" significa porções coerentes, adequadas e fisicamente discretas para administração médica. "Composição farmacêutica na forma de dosagem única" significa unidades fisicamente coerentes, discretas e  
10 apropriadas para a administração médica, cada uma contendo uma dose diária ou múltiplas ou um sub-múltiplo de uma dose diária do composto ativo na associação com um excipiente e/ou incluída dentro de uma cartela. Se a  
15 composição contém uma dose diária ou, por exemplo, a metade, um terço ou um quarto da dose diária, a composição farmacêutica será administrada uma vez ou, por exemplo, duas, três ou quatro vezes por dia, respectivamente.

O termo "sal", como usado na presente invenção, denota os sais ácidos e/ou básicos, formados com ácidos e/ou bases  
20 inorgânicas ou orgânicas, preferivelmente sais básicos. Os sais destes compostos podem ser preparados por técnicas conhecidas no estado da arte. Exemplos de sais farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitantes a, adição de sais inorgânicos e orgânicos, tais

como os hidrocloreto, sulfatos, nitratos ou fosfatos e acetatos, trifluoroacetatos, propionatos, succinatos, benzoatos, citratos, tartaratos, fumaratos, maleatos, metano sulfonatos, isotionatos, teofilina acetatos, salicilatos, respectivamente, ou similares. Sais de amônio alquil quaternário baixos, e similares também são apropriados.

Como usado na presente invenção, o emprego do termo "farmaceuticamente aceitável" significa um sólido não-tóxico, inerte, enchimento líquido semi-sólido, diluente, encapsulamento do material, formulação auxiliar de qualquer tipo, ou simplesmente um meio aquoso estéril, tal como 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 carboximetil celulose de sódio, a etil celulose e o acetato de celulose, ciclodextrina, malte, gelatina, talco; excipientes, tais como ceras da manteiga e do supositório de cacau; 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, polióis, tais como glicerínoglicol, 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 alginico; água livre de pirogênio; salina isotônica, 5 solução de Ringer; soluções tampões de álcool etílico e fosfato, assim como outras substâncias não tóxicas compatíveis usadas em formulações farmacêuticas.

Agentes umidificantes, emulsões e lubrificantes, tais como lauril sulfato de sódio e lauril estearato de 10 magnésio, assim como agentes corantes, agentes liberadores, agentes de revestimento, adoçantes, sabores artificiais e agentes aromatizantes, preservativos e antioxidantes podem também estar presentes na composição, de acordo com o julgamento do formulador. Exemplos de antioxidantes 15 farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, antioxidantes solúveis em água tais como ácido ascórbico, hidrocloreto de cisteína, bissulfeto de sódio, metabisulfeto de sódio, sulfeto de sódio, e similares; antioxidantes solúveis em óleo, tais como ascorbil 20 palmitato, butilatohidroxianisol (BHA), butilatohidroxitolueno (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol e similares; e agentes quelantes tais como o ácido cítrico, o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, o ácido fosfórico e similares.

Para a administração oral, os compostos podem ser formulados em preparações sólidas ou líquidas tais como cápsulas, pílulas, comprimidos, pastilhas, melados, pós, suspensões ou emulsões. Na preparação de composições na  
5 forma de dosagem oral, alguns dos meios farmacêuticos usuais podem ser empregados, como, por exemplo, a água, os glicóis, os óleos, os álcoois, sabores artificiais, preservativos, corantes, suspensões, e similares no caso de preparações líquidas orais (como, por exemplo, as  
10 suspensões, os elixires e as soluções); ou veículos tais como amidos, açúcares, diluentes, agentes granuladores, lubrificantes, pastas, agentes desintegrantes e similares no caso de preparações orais sólidas (como, por exemplo, os pós, as cápsulas e os comprimidos). Por causa de sua  
15 facilidade de administração, comprimidos e cápsulas representam a forma mais vantajosa de administração oral de dosagem única, em que os excipientes farmacêuticos sólidos são obviamente empregados. Se desejado, os comprimidos podem ser revestidos de açúcar ou revestidos de protetores  
20 entéricos por técnicas padrão. Os imunoterápicos descritos na presente invenção podem estar encapsulados para torná-los estáveis para passagem através do trato gastrointestinal e ao mesmo tempo permitir a passagem através da barreira hemato-encefálica como descrito no

documento de patente WO 96/11698.

Para a administração parenteral, o composto pode ser dissolvido em um veículo farmacêutico e ser administrado como uma solução ou uma suspensão. Exemplos de veículos  
5 apropriados são água, salina, soluções de dextrose, soluções de frutose, etanol ou óleos de origem animal, vegetal ou sintético. Outros veículos podem também conter outros ingredientes, por exemplo, preservativos, agentes suspensores, agentes solubilizantes, tampões e similares.  
10 Quando os compostos forem administrados intratecalmente, estes podem também ser dissolvidos no líquido cerebroespinal.

As composições farmacêuticas devem conter aproximadamente 0,0001 a 99%, preferivelmente  
15 aproximadamente 0,001 a 50%, mais preferivelmente aproximadamente 0,01 a 10% do peso de um ou mais dos imunoterápicos descritos na presente invenção para o peso total da composição. Além de um ou mais dos imunoterápicos descritos na presente invenção, as composições  
20 farmacêuticas e os medicamentos podem também conter outros compostos farmacêuticamente ativos. Quando usados em conjunto com outros compostos farmacêuticamente ativos, os imunoterápicos da presente invenção podem ser oferecidos na forma de coquetel de drogas. Um coquetel de drogas é uma

mistura de alguns compostos usados na presente invenção com uma outra droga ou agente. Nesta incorporação, um veículo comum de administração (por exemplo, pílula, comprimido, implante, bomba, solução injetável, etc.) poderá conter  
5 ambos, a composição atual em combinação com agentes potenciadores suplementares. As drogas individuais do coquetel são cada uma administrada em quantidades terapêuticamente eficazes para alcançar os efeitos desejados.

10 Uma variedade de vias de administração dos imunoterápicos e das composições farmacêuticas descritas na presente invenção está disponível. O modo particular selecionado dependerá do composto em particular selecionado, da severidade do estado da doença que está  
15 sendo tratada e a dosagem necessária para eficácia terapêutica. Os métodos da presente invenção, geralmente, podem ser praticados usando qualquer modo de administração biologicamente aceitável, i.e. qualquer modalidade que produzir níveis eficazes dos compostos ativos sem causar  
20 efeitos adversos clinicamente indesejáveis. Tais modos de administração incluem as vias oral, retal, sublingual, tópica, nasal, transdermal ou parenteral. O termo "parenteral" inclui subcutânea, intravenosa, epidural, irrigação, intramuscular, bombas de liberação, ou de

infusão.

Assim, a administração de um ou mais imunoterápicos descritos na presente invenção pode ser conseguida usando todos os meios apropriados de oferta, incluindo: (a) bomba  
5 (b) microencapsulamento (vide os documentos de patente 4,352,883; 4,353,888 e 5,084,350); (c) implantes de polímero de liberação contínua (vide o documento de patente US 4,883,666); (d) macroencapsulamento (vide os documentos de patente US 5,284,761; 5,158,881; 4,976,859 e 4,968,733 e  
10 os pedidos de patente WO92/19195 e WO95/05452); (e) enxertos celulares não capsulados no sistema nervoso central (vide os documentos de patente US 5,082,670 e 5,618,531); (f) injeção subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, ou em outro local apropriado; ou  
15 (g) administração oral em cápsula, líquido, comprimido, pílula ou formulação de liberação prolongada.

Preferencialmente as composições farmacêuticas da presente invenção são infusões para administração intravesical.

20 Um ou mais imunoterápicos descritos na presente invenção são administrados preferivelmente em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Por uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou simplesmente "uma quantidade eficaz" de um composto ativo entende-se uma quantidade

média suficiente do imunoterápico para tratar a doença desejada, mantendo uma razoável proporção risco/benefício aplicável a qualquer tratamento médico. A quantidade real administrada, a taxa e o tempo de curso de administração, 5 dependerão da natureza e da severidade das condições que estão sendo tratadas. A prescrição do tratamento, por exemplo, decisões de dosagem, duração, etc., dependem do acompanhamento da doença a ser tratada, da condição individual do paciente, da via e do método de 10 administração, e outros fatores típicos de conhecimento dos clínicos que estão dentro das responsabilidades dos clínicos gerais ou dos especialistas,

A dosagem pode ser ajustada apropriadamente para conseguir níveis desejados do imunoterápico, localmente ou 15 sistemicamente.

#### EXEMPLOS

Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos são agora apresentados como exemplos os resultados 20 dos diferentes ensaios efetuados com relação a esta invenção.

No Exemplo 1 é descrita a obtenção do imunoterápico usado na presente invenção. Nos demais Exemplos (2 a 5) são ilustradas as propriedades e o uso do imunoterápico 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  
5 invenção.

**EXEMPLO 1: Obtenção do imunoterápico rBCG-Pertussis**

Este exemplo descreve a obtenção do imunoterápico rBCG-Pertussis (rBCG-S1PT).

**a) Obtenção da cepa de BCG auxotrófica para lisina**  
10 **baseada na cepa de BCG Moreau, BCG-lysA<sup>-</sup>:** a cepa de BCG-lysA<sup>-</sup> ou BCG auxotrófica para lisina foi obtida por meio de recombinação homóloga utilizando a técnica desenvolvida no laboratório de Dr. William R. Jacobs, Jr (Albert Einstein College of Medicine-NY-USA) (Patente US 5,750,384) e  
15 colaboradores (Bardarov, S. *et al.* Microbiology 2002;**148**: 3007-3017). A recombinação homóloga foi realizada através de um plasmídeo ponte, o qual foi introduzido no BCG por transfecção. Este plasmídeo é formado por uma unidade plasmídial ligada ao genoma de um micobacteriófago que teve  
20 sequências não essenciais de seu genoma retiradas para a inserção deste plasmídeo. O plasmídeo possui um cassete de expressão do gene de sacB e um marcador de resistência a higromicina e ambos estão flanqueados pelo mesmo sítio de restrição Van I, no qual serão introduzidos duas

sequências, previamente amplificadas por PCR, uma à esquerda (LEFT) e outra à direita (RIGHT) da sequência gênica que será deletada através da recombinação homóloga. A obtenção da cepa BCG-lysA<sup>-</sup>, foi feita pela deleção de 95  
5 pares de base (pb) da sequência gênica da descarboxilase diaminopimelato lysA (DAP descarboxilase ou lysA), um gene essencial na via biosintética do aminoácido lisina (Pavelka, M. S. Jr. and Jacobs, W. R. Jr. ; J. Bacterial 1996;**178**:6496-6507). Os oligonucleotídeos utilizados para  
10 amplificar a sequência LEFT foram a SEQ ID NO 1 e a SEQ ID NO 2 e para amplificar a sequência RIGHT foram a SEQ ID NO 3 e SEQ ID NO 4, os quais geraram fragmentos de 895 pb e 864 pb, respectivamente. Após a recombinação, o gene lysA perdeu 96 pares de bases de sua sequência gênica SEQ ID NO  
15 5, tornando-se assim não funcional.

**b) Obtenção do gene S1PT mutado de *Bordetella pertussis*:** foi desenvolvida uma forma detoxicada de toxina pertussis (PT), onde alelos dos genes da PT foram manipulados geneticamente para introduzir a substituição de  
20 dois aminoácidos (Arg/9 por Lys, e Glu/129 por Gly) no sítio ativo da subunidade S1 da toxina pertussis (S1PT). Esse gene mutado (PT-9K/129G) foi introduzido no cromossomo de uma cepa de *Bordetella pertussis*. Esta cepa produz moléculas mutantes de PT que são atóxicas, mas mantém sua

imunogenicidade, e que protegem camundongos de um desafio intracerebral com uma cepa virulenta de *Bordetella pertussis* (Pizza, M. et. al. Science 1989;**246**:497-500). O gene da subunidade 1 da Toxina Pertussis mutado (PT-5 9K/129G), foi clonado no plasmídeo pUC-PT-9K/129G, e foi cedido pelo Dr. Rino Rappuoli (Novartis, Siena, Itália).

**c) Obtenção do plasmídeo ou vetor de expressão de micobactéria:** o vetor de expressão de micobactéria usado para expressão de S1PT em BCG recombinante é denominado 10 pLA71 e foi desenvolvido no laboratório das Dras. Brigitte Gicquel e Nathalie Winter (Unité de Génétique Mycobactérienne, Instituto Pasteur, Paris, França). Sequência gênica do plasmídeo pLA71 e a SEQ ID NO 6.

Este vetor de expressão é um plasmídeo ponte que 15 contém origem de replicação de *E. coli* e micobactéria, o gene aminoglicosídeo fosfotransferase, um marcador de seleção para kanamicina, e o promotor pBlaF\*, um promotor mutado da  $\beta$ -lactamase de *M. fortuitum*. O promotor pBlaF\* é seguido da seqüência sinal de exportação do gene da  $\beta$ -20 lactamase. O vetor pLA71 apresenta um inserto de 1384 pb contendo o promotor pBlaF\* mais a região codificadora de 32 aminoácidos da seqüência sinal de exportação da  $\beta$ -lactamase e 5 aminoácidos da proteína madura, fundidos ao gene da

fosfatase alcalina (phoA) (Tim, J. et al. Mol Microbiol 1994;**12**: 491-502).

**d) Construção do vetor de expressão do gene SlPT em BCG recombinante:** o vetor de expressão do gene SlPT em BCG recombinante foi construído usando métodos convencionais de biologia molecular. O gene SlPT foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pUC-9K/129G, usando os seguintes oligonucleotídeos: N-terminal SEQ ID NO 7 (5'-TAGTAG**TCTAGAG**GGTACCGGACGACGATCCTCCCGCCACC-3'), contendo os sítios de restrição Xba I (negrito) e Kpn I (sublinhado) e C-terminal SEQ ID NO 8 (5'-TAGTAG**TCTAGAG**GCGGCCGCCTAGAACGAATACGCGATGCT-3'), contendo os sítios de restrição Xba I (negrito) e Not I (sublinhado) (Bio-Synthesis, Inc., Lewisville, Tex.). O produto de PCR correspondente ao gene SlPT-9K/129G 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 Xba I e subclonado em pUC19 (New England Biolabs, Beverly, Mass) para se obter maior quantidade de DNA. O plasmídeo resultante, pUC19-SlPT-9K/129G, foi posteriormente digerido com as enzimas de restrição Kpn I e Not I e então clonado no vetor de expressão pLA71, que foi também previamente digerido com as enzimas Kpn I e Not I, gerando assim o vetor de expressão

denominado de pNL71-S1PT conforme descrito em Nascimento, I. P. et al. Infect Immun. 2000;**68**: 4877-4883.

**e) Clonagem do gene lysA no vetor pNL71-S1PT:** para a complementação da cepa BCG-lysA<sup>-</sup>, foi utilizado o gene de lysA de *Mycobacterium smegmatis*. Este gene codifica a proteína diaminopimelato carboxilase e é essencial na via biosintética do aminoácido lisina (Pavelka, M. S. Jr. and Jacobs, W. R. Jr. ; J. Bacterial 1996;**178**:6496-6507). Este gene já havia sido previamente clonado no plasmídeo pJH137 e foi, gentilmente, cedido pelo Dr. William R. Jacobs, Jr (Albert Eistein College of Medicine - NY-USA).

Sequência de lysA, incluindo a região de ligação a ribossomo (RBS) SEQ ID NO 9:

O plasmídeo pNL71-S1PT foi digerido com a enzima Not I e este sítio de restrição tornado coesivo por tratamento com a enzima Klenow. Em seguida a sequência do gene lysA contendo uma sequência RBS foi excisada do vetor pJH137 através das enzimas de restrição Cla I e Pst I e ambas as extremidades tornadas coesivas por tratamento com a enzima Klenow. O fragmento gerado por esta digestão foi então clonado no vetor pNL71S1PT no sítio Not I coesivo, gerando assim o vetor denominado pNL71S1-lysA.

Desta forma o gene lysA ficou sob o controle do mesmo promotor pblaF\*, responsável também pela expressão do gene

S1PT, caracterizando assim um sistema operon. O produto de ligação desta construção foi selecionado em *E. coli* na presença de kanamicina e o plasmídeo pNL71S1-lysA purificado. O gene de resistência a kanamicina foi retirado  
5 através da digestão de pNL71S1-lysA com Nde I, cujos sítios de restrição flanqueiam a seqüência do gene de resistência a kanamicina e o plasmídeo foi religado gerando pNL71S1-lysA-kan<sup>-</sup>.

Este plasmídeo foi então usado para transformar a cepa  
10 de *Mycobacterium smegmatis* auxotrófica para lisina (*Mycobacterium smegmatis*-lysA<sup>-</sup>) (Gentilmente cedida por Dr. William R. Jacobs, Jr). O plasmídeo pNL71S1-lysA-kan<sup>-</sup> foi então purificado a partir de *M. smegmatis*-lysA<sup>-</sup> usando um Kit comercial para purificação de DNA plasmidial (Mini-prep-PROMEGA) e este usado para transformar uma cepa  
15 auxotrófica, BCG-lysA<sup>-</sup>.

**f) Preparação de lote estoque de BCG-lysA<sup>-</sup> competente a partir do obtido na etapa a) e da cepa de rBCG-Pertussis (auxotrófico/ complementado):** para preparação de estoques  
20 de BCG-lysA<sup>-</sup> competente, uma ou mais colônias de BCG-lysA<sup>-</sup> foi cultivada em meio líquido Middlebrook 7H9 mais Tween-80 e suplementado com albumina-dextrose-catalase 10% (MB7H9/Tw/ADC) mais lisina 10% 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 pNL71S1-lysA-Kan<sup>r</sup>. Para eletroporação, uma alíquota estoque de 50-200 µl de BCG-lysA<sup>r</sup> competente foi misturada com 1-5 µg de pNL71S1-lysA-kan<sup>r</sup>, 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 5 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% (MB7H9/OADC). 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.

5 Após introdução de pNL71S1-lysA-kan<sup>-</sup> em BCG-lysA<sup>-</sup>, os transformantes foram selecionados em placas contendo meio (MB7H10/OADC) na ausência de kanamicina. As colônias de rBCG selecionadas foram então transferidas para 5 mL de meio de cultura MB7H9/Tw/ADC (sem lisina), com e sem  
10 kanamicina, para confirmar a complementação do gene de lisina e a perda de resistência a kanamicina. Todas as colônias selecionadas cresceram apenas na ausência de kanamicina, confirmando assim o seu fenótipo lysA<sup>-/+</sup>/kan<sup>-</sup>, cepa esta que passou a ser chamada de rBCG-Pertussis.

15 **g) Preparação dos lotes de rBCG-Pertussis:** Em seguida os clones desta cepa foram expandidos para 50 mL de meio líquido MB7H9/Tw/ADC ou em qualquer meio descrito para cultivo de micobactérias. Após 2-3 semanas, quando o cultivo atinge DO<sub>600</sub> 0,6-0,8, as amostras foram  
20 centrifugadas, lavadas duas vezes com H<sub>2</sub>O miliQ, resuspendidas em 1 mL de glicerol 10% e aliqüotadas em volume de 100 µl e então armazenadas a -70°C, para posterior utilização nos ensaios de imunização.

**h) Avaliação dos Lotes de rBCG-Pertussis:** a

viabilidade dos lotes de rBCG-Pertussis foi avaliada por meio de contagem do número de unidade formadora de colônia (UFC). O número de UFC foi determinado como segue: uma ou mais alíquotas do lote congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  foram  
5 descongeladas e realizadas várias diluições sucessivas ( $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$ ). Em seguida as diluições  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  foram plaqueadas em meio MB7H10/OADC e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após 3-4 semanas fez-se a contagem do número de colônias na placa.

10 Para verificação da expressão do gene SlPT, foi utilizado um imunoenensaio (Western blotting) usando um soro policlonal anti-PT, procedendo-se da seguinte maneira: uma ou mais alíquotas estoques de rBCG-pertussis foram sonicadas por 1,5 min sob gelo numa amplitude constante  
15 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  
20 contendo 30  $\mu\text{g}$  de proteínas 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 nitrocelulose com poros de 0,2  $\mu\text{m}$  (Protran), utilizando-se um sistema de transferência semi-seco. Os géis contendo rBCG-Pertussis e rBCG-pNL71-S1PT, como controle positivo, foram colados sob as membranas de nitrocelulose, 5 mergulhados 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 10 final da eletrotransferência, as membranas foram retiradas do sistema e incubadas em solução bloqueadora (PBS contendo leite 5% - PBS-L) a 4 °C, durante toda noite. Ao término do bloqueio, as membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 h com soro anti-PT diluídos em PBS-L 15 (diluição 1:1000). Após este período de incubação as membranas de nitrocelulose foram lavadas três vezes, sob leve agitação, com PBS/Tween20 0,1% (PBS-T), em intervalos de 10 min. As membranas foram então incubadas por 2 h nas mesmas condições em PBS-L contendo anticorpo anti-IgG 20 conjugado a HRP (Sigma, Chem Co, St. Luis) e novamente lavadas 3 vezes com PBS-T. A revelação foi feita por quimiluminescência usando o kit ECL (Amersham) por exposição a filme de raios-X (Figura 1).

Em resumo, na produção do imunoterápico de rBCG-

Pertussis prevalece a utilização dos mesmos métodos de cultivo da vacina BCG, resultando num produto composto por uma cepa de BCG recombinante expressando um antígeno de *Bordetella pertussis* e o gene de complementação *lysA*, ambos sob o controle do mesmo promotor, o que manterá a pressão seletiva para a manutenção da expressão heteróloga.

**EXEMPLO 2: Desenvolvimento do modelo animal de tumor vesical.**

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (*Mus musculus*, Rodentia, Mammalia), fêmeas, adultas, pesando entre 15 e 18 gramas, com 8 a 10 semanas de vida, provenientes e mantidos nas condições padrões do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Utilizou-se a linhagem de células de tumor urotelial de bexiga MB49 de camundongo C57BL/6 (doadas pelo Dr. Yi Lou - Universidade de Iowa, EUA), a qual foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mmol/L L-glutamina, 50 U/mL penicilina, e 0,05 mg/mL estreptomicina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. A suspensão celular de MB49, corada com azul de *trypan*, foi quantificada em câmara de *Neubauer* ao microscópio, e somente, suspensões com no mínimo de 90% de células viáveis foram usadas para

implantação tumoral na bexiga.

A implantação das células tumorais seguiu o método descrito por Kadhim, S. A. et al. (J Urol. 1997 Aug;**158**(2):646-52), com pequenas modificações descritas a seguir. Os camundongos foram anestesiados através da injeção intraperitoneal (I.P.) de 100 µL de uma solução composta por 1,5 mg de ketamina (Dopalen - AgribRANDS do Brasil - Paulínia / SP) e 0,1 mg de xilazina [Anasedam - AgribRANDS do Brasil - Paulínia/SP (GORSKA 2000)]. Em seguida, os animais foram submetidos à cateterização transuretral, com cateter de polietileno 24-gauge sem agulha. A seguir, procedeu-se à lesão química do epitélio vesical com 0,3 M de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), seguido de lavagem com soro fisiológico 0,9% (SF) e instilação intravesical de 0,1 mL de suspensão de células MB49 (5 x 10<sup>5</sup> células/camundongo).

Os animais foram acompanhados por quatro semanas, após este período todos foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo a sua bexiga retirada para exame macroscópico de comprovação da presença de massa tumoral. A taxa de 90% de implantação tumoral das células MB49, obtida em nosso estudo, foi compatível com os relatos apresentados na literatura, onde os valores variam de 75 a 100% (Bohle, A., Brandau, S. J Urol 2003;**170**:964-969). A análise

anátomo-patológica confirmou o diagnóstico de carcinoma urotelial infiltrativo, o que, também corroborou com a confirmação do estabelecimento deste modelo de câncer vesical. O aspecto macroscópico dos tumores foi semelhante  
5 entre os vários animais. Os animais em que não foi evidenciado tumor através da análise anátomo-patológica e/ou macroscópica foram excluídos dos experimentos subseqüentes

**EXEMPLO 3: Tratamento dos modelos animais de tumor vesical  
10 com imunoterápicos.**

Procedeu-se conforme descrito no Exemplo 2, porém após a implantação das células tumorais, iniciou-se, no dia seguinte, o tratamento com os imunoterápicos de interesse. No 1º dia, os camundongos (n=60) foram transportados e  
15 confinados no biotério nível dois de Biosegurança do Laboratório de Biotecnologia IV do Instituto Butantan, onde procedemos à instilação intravesical dos imunoterápicos.

Os animais foram divididos em três grupos (n=20):

- **Grupo BCG:** animais tratados com 0,1 mL de  
20 suspensão de BCG [ $1 \times 10^6$  cfu/camundongo suspensas em soro fisiológico (SF)];

- **Grupo rBCG-S1PT:** animais tratados com 0,1 mL de suspensão de rBCG-S1PT ( $1 \times 10^6$  cfu/camundongo suspensas em SF);

- **Grupo Controle:** animais tratados com 0,1 mL de SF.

Para tal procedimento, os animais foram novamente anestesiados e tiveram a uretra cateterizada, como descrito no Exemplo 2. Os tratamentos propostos para cada grupo foram realizados através de uma aplicação por semana, nos dias 1, 8, 15, 22, totalizando 4 aplicações. No 29º dia, os camundongos foram sacrificados e as bexigas retiradas (cistectomia), pesadas em balança analítica de precisão, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 80 °C. O baço, usado para obtenção dos esplenócitos, foi removido e mantido em placa de petri contendo meio de cultura RPMI1640 a 4 °C.

**a) Peso das Bexigas:** a avaliação dos pesos (mg) das bexigas, retiradas dos animais deste ensaio, mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com BCG e rBCG-S1PT em relação ao grupo controle (SF) (Figura 2). Utilizou-se o teste One-way Analysis of Variance ( $p < 0.01$ ) para analisar a diferença dos pesos vesicais entre os vários grupos e o teste Student-Newman-Keuls para a análise par a par, após os dados serem convertidos na escala logarítmica. A média do peso (mg) do grupo controle foi de  $230 \pm 110$  mg, do grupo BCG foi de

137±87 mg e do grupo RBCG-S1PT foi de 93±50 mg. Foi considerado um valor de  $p < 0.05$  para análise estatística significativa. Os valores foram obtidos de três experimentos realizados independentemente. Ou seja, o grupo que recebeu  
5 solução salina foi o que apresentou maiores pesos vesicais, e conseqüentemente o maior volume tumoral. Enquanto o grupo tratado com rBCG-S1PT mostrou os menores pesos vesicais, o que corresponde a um retardo maior no crescimento tumoral no grupo tratado com rBCG-S1PT em comparação com o grupo  
10 controle.

**c) Padrões de Resposta Imune Th1/Th2:** os padrões de resposta imune Th1/Th2 dos grupos tratados com SF, BCG e rBCG-S1PT foram analisados pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Inicialmente, Os  
15 fragmentos vesicais congelados em nitrogênio líquido foram processados para a extração de RNA total (RNAt) pela técnica do Trizol® de acordo com instruções do fabricante (GIBCO/BRL Life Technologies, Inc.). Em seguida, as amostras de RNAt foram purificadas em colunas de sílica  
20 RNeasy seguindo-se as recomendações do fabricante (QIAGEN). A quantidade ( $OD_{A260nm} \times 20$ ) e a pureza ( $OD_{A260nm}/OD_{A280nm}$ ) do RNA extraído foi verificada através de espectrofotometria. Em seguida, 1µg do RNAt foi convertido em DNA complementar (cDNA) através de reação de transcriptase reversa, usando-

se: a enzima *Superscript<sup>TM</sup>* III (*Life Technologies*), iniciadores oligo-dT e termociclador (MJ Research PTC-200 Thermocycler, Watertown, MA, USA). Posteriormente, os cDNA de cada uma das amostras foram amplificados usando-se  
5 iniciadores apropriados para os seguintes genes IL-2, IL-5, IL-12p40, iNOS, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10 e IL-6. Neste ensaio foi utilizada a solução *Universal PCR MasterMix* (*Applied Biosystems Inc -USA*) e o equipamento de 7500 Fast Real-Time PCR (*Applied Biosystems*), de acordo com o  
10 protocolo de quantificação baseado no *SYBR Green* (*Applied Biosystems*). Todas as reações foram realizadas em triplicatas. Os resultados de expressão dos genes analisados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo GAPDH usando iniciadores definidos por  
15 Overbergh, em 1999 (Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C (1999) Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11:305-312).

Nos grupos tratados com imunoterápicos observou-se um  
20 aumento significativo da expressão de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo controle, sendo que no grupo tratado com rBCG-S1PT esta resposta foi mais intensa. Fato este, que sinaliza para uma resposta polarizada do tipo Th1. Quando analisamos as interleucinas relacionadas ao padrão de resposta Th2,

observou-se um aumento significativo de expressão de IL-10 no grupo tratado com rBCG-S1PT (Figura 3). É importante salientar que em ensaios experimentais com a linhagem de células tumorais MB49 detectou-se que estas não produzem IL-10, logo os níveis quantificados são provenientes da resposta local da bexiga dos camundongos testados.

**c) Ensaio de viabilidade co-cultura esplenócito - célula tumoral MB49:** inicialmente, as células tumorais MB49 foram cultivadas em meio de cultura contendo RPMI 1640 (GIBCO Life Technologies), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg /ml) e 10% de soro bovino fetal, sendo mantidas em incubadora a 37 °C com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Após as células atingirem confluência foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e tiveram sua viabilidade avaliada através da coloração de azul de Trypan. Procedeu-se, então, diluição celular, com RPMI 1640, na concentração de  $1 \times 10^5$  células/ mL, seguida de semeadura em placa de cultura celular de 48 poços e incubadas por 24 horas.

Os baços que foram removidos dos camundongos tratados foram macerados e passados por peneiras com porosidade de 70 µm (*Cell strainer*-BD Falcon, Bedford, MA). Os esplenócitos, assim obtidos, de cada grupo (SF, BCG e rBCG-S1PT) foram lavados duas vezes em PBS e colocado em co-

cultura, amostras em triplicata, com as células MB49 nas proporções de 10:1 e 50:1 por 18 horas.

Quantificou-se, então a viabilidade das células MB49 utilizando-se o ensaio de citotoxicidade com *Alamar Blue*<sup>®</sup> (Biosource, Carlsbad, CA), conforme orientações do fabricante, onde metade do volume do meio da co-cultura foi substituído por novo RPMI 1640 contendo 20% de *Alamar Blue*<sup>®</sup>, e mantido em incubação por 4 horas. A seguir, o nível de redução da solução foi medido (OD<sub>570-600 nm</sub>) em leitor monocromador de microplacas da *SpectraMax 340PC* (Molecular Devices - USA).

Como controles internos do ensaio, foram utilizadas culturas de esplenócitos de cada um dos grupos em estudo, células MB49 vivas e mortas. Como parâmetro de viabilidade 0% (morte) foi adicionado o detergente triton X 100 nas células MB49 na concentração final de 1%.

A viabilidade das células MB49 foi calculada baseada na seguinte equação:  $Viabilidade = (MBSp - Sp - MB_D) / (MB_L - MB_D)$  quando  $MBSp = OD(570-600\text{ nm})$  de MB49 + poço esplenócitos co-cultura,  $MB_L = OD(570-600\text{ nm})$  do poço da MB49 viva em cultura simples,  $MB_D = OD(570-600\text{ nm})$  do poço de MB49 morta e  $Sp = OD(570-600\text{ nm})$  do poço de cultura de esplenócitos.

A análise de citotoxicidade com a linhagem celular MB49 após 18h de co-cultura com esplenócitos de camundongos tratados com doses semanais de BCG, rBCG-S1PT ou SF, durante quatro semanas, evidenciou menor viabilidade das células tumorais frente ao rBCG-S1PT, nas duas proporções testadas (1:10 e 1:50). O teste estatístico utilizado foi análise de variância ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

O ensaio de viabilidade celular demonstrou que os esplenócitos dos camundongos tratados com rBCG-S1PT foram mais eficientes na destruição das células tumorais.

#### **EXEMPLO 4: Ensaio de sobrevida**

Procedeu-se como descrito no Exemplo 3, porém, os animais não foram sacrificados e, sim, acompanhados por 60 dias e, diariamente, os mortos de cada grupo iam sendo contabilizados. A quantidade de células tumorais MB49, também diferiu neste experimento implantou-se  $1 \times 10^5$  por camundongo.

A curva de sobrevida individual dos animais com tumor vesical demonstrou diferença significativa entre o grupo tratado com rBCG-S1PT e os demais (Figura 5).

## REIVINDICAÇÕES

1. Imunoterápico **caracterizado pelo** fato de compreender uma cepa de *Mycobacterium bovis*, bacillus Calmette Guerin (BCG), recombinante que codifica ao menos  
5 um antígeno de *Bordetella pertussis*.

2. Imunoterápico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato da cepa de *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinante ser auxotrófica complementada.

10 3. Imunoterápico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado pelo** fato da cepa de *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin (BCG) recombinante ser auxotrófica para lisina, complementada com o gene *lysA*.

15 4. Imunoterápico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de o antígeno de *Bordetella pertussis* ser a subunidade 1 da toxina pertussis, S1PT.

20 5. Composição farmacêutica **caracterizada pelo** fato de compreender um agente imunoterápico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e um ou mais dentre um veículo, excipiente, diluente ou solvente fisiologicamente aceitáveis.

6. Composição farmacêutica, de acordo com a

reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de ser uma infusão.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada pelo** fato de a infusão ser  
5 para administração intravesical.

8. Uso de um imunoterápico, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de que é para a manufatura de um medicamento.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado**  
10 **pelo** fato de que é para a manufatura de um medicamento com ação inflamatória e ativação inespecífica do sistema imune.

10. Uso de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo** fato de que é para a manufatura de um medicamento para uso no tratamento ou prevenção de câncer.

15 11. Uso de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que é para a manufatura de um medicamento para uso no tratamento ou prevenção de câncer de bexiga.

20 12. Uso de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo** fato de que é para a manufatura de um medicamento de infusão intravesical.

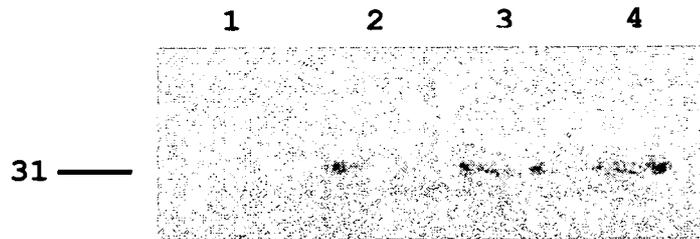
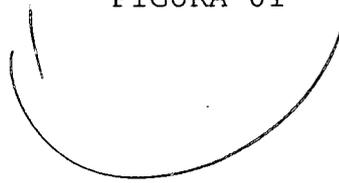


FIGURA 01



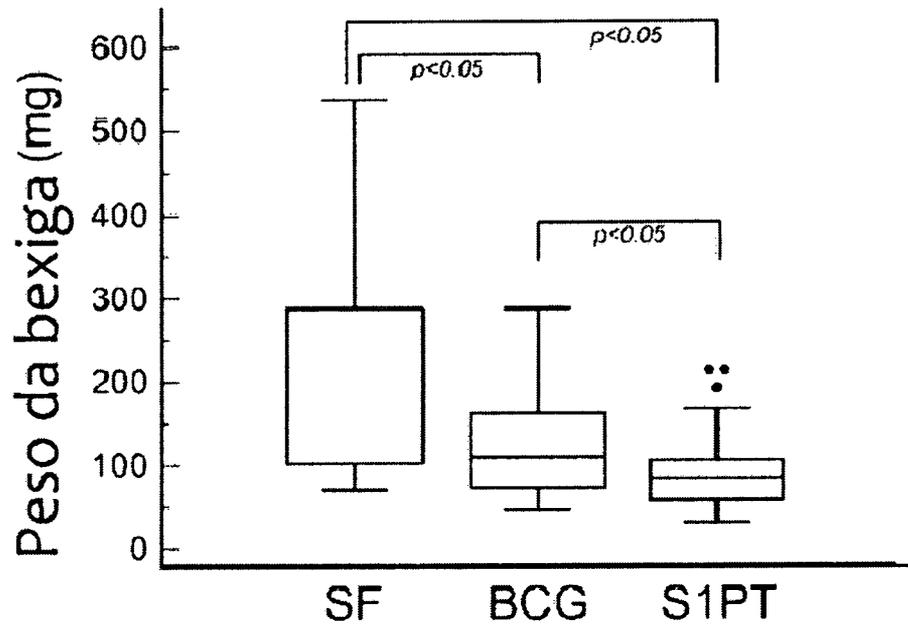


FIGURA 02

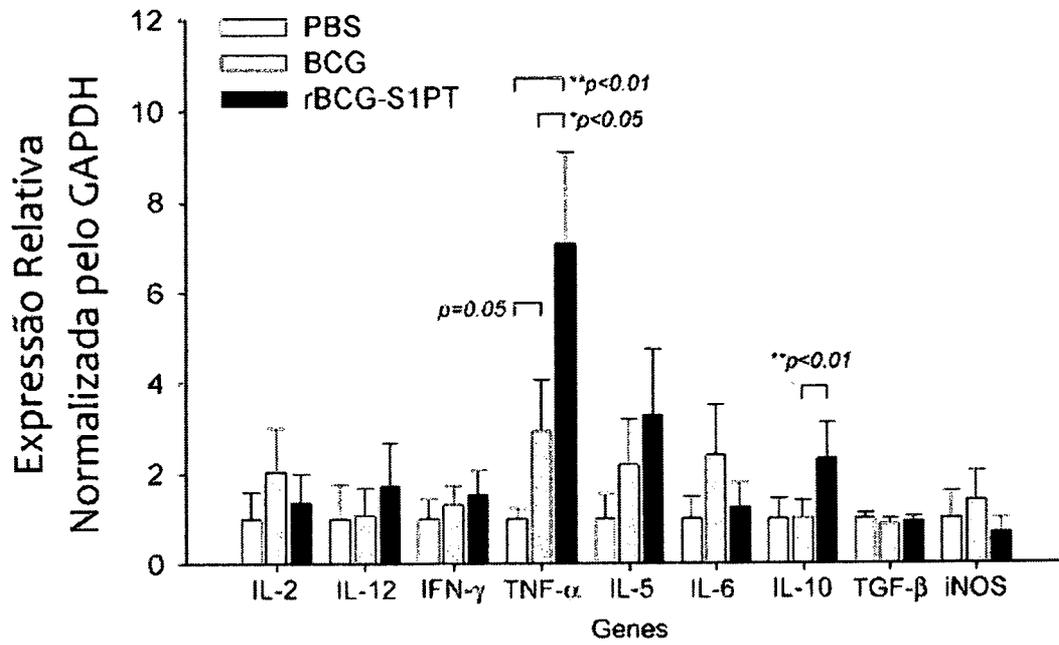


FIGURA 03

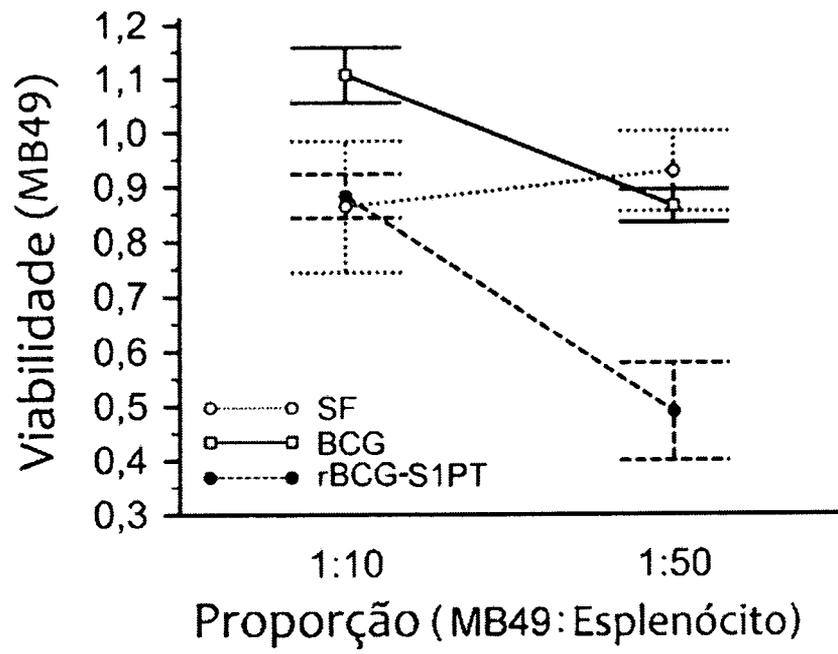


FIGURA 04

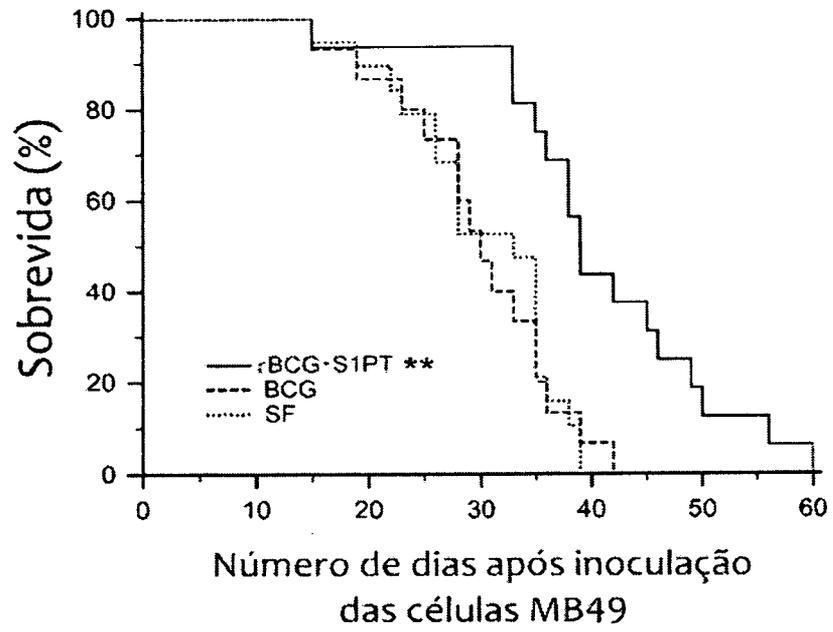


FIGURA 05

PI 0904468-0

Resumo da Patente de Invenção para: **"IMUNOTERÁPICO,  
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE IMUNOTERÁPICO PARA  
MANUFATURA DE MEDICAMENTO PARA USO NO TRATAMENTO DE  
CÂNCER"**.

5           A presente invenção refere-se a um imunoterápico que  
compreende uma cepa de *Mycobacterium bovis*, Bacillus  
Calmette Guerin (BCG) recombinante que codifica ao menos um  
antígeno de *Bordetella pertussis*.

10           A presente invenção refere-se também a composições  
farmacêuticas que compreendem os imunoterápicos descritos  
na presente invenção.

15           A presente invenção refere-se ainda ao uso dos  
imunoterápicos descritos na presente invenção para a  
manufatura de medicamentos com ação inflamatória e ativação  
inespecífica do sistema imune para uso no tratamento ou  
prevenção de câncer.