



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

(21) PI 1103672-9 A2



* B R P I 1 1 0 3 6 7 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 10/03/2011

(43) Data da Publicação: 11/06/2013
(RPI 2214)

(51) Int.Cl.:

C12N 15/31

C07K 14/315

C12N 15/75

A61K 39/09

A61P 1/02

A61P 9/00

(54) Título: SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA OS AMINOÁCIDOS 39 A 512 DA PROTEÍNA P1 DO S. MUTANS, PROTEÍNA RECOMBINANTE E SEUS USOS NA PREVENÇÃO E CONTROLE DA CÁRIE DENTAL

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

(72) Inventor(es): LUÍS CARLOS DE SOUZA FERREIRA, MILENE TAVARES BATISTA, RAFAEL CIRO MARQUES CAVALCANTE, RENATA DAMÁSIO DE SOUZA, RITA DE CÁSSIA CAFÉ FERREIRA, WILSON BARROS LUIZ

(57) Resumo: SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA OS AMINOÁCIDOS 39 A 512 DA PROTEÍNA P1 DO S. MUTANS, PROTEÍNA RECOMBINANTE E SEUS USOS NA PREVENÇÃO E CONTROLE DA CÁRIE DENTAL. A presente invenção provê uma sequência de ácidos nucleicos (SEQ. de ID. Nº. 1) e correspondente sequência de aminoácidos da proteína imunogênica P1₃₉₋₅₁₂ (SEQ. de ID. Nº. 2) derivada da proteína P1 de Streptococcus mutans (S. mutans), compreendendo os aminoácidos 39 ao 512 da proteína nativa, expressa em linhagens recombinantes de Bacillus subtilis e formulações farmacêuticas, preferencialmente vacinas, voltadas para o controle da cárie humana. Adicionalmente, o presente pedido de patente destina-se ao uso de formulações farmacêuticas das sequências de ácidos nucleicos e/ou proteínas e/ou anticorpos específicos derivados da P1₃₉₋₅₁₂ para o controle profilático ou terapêutico da cárie e outras doenças associadas ao S. mutans.

SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEÍCO RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA
OS AMINOÁCIDOS 39 A 512 DA PROTEÍNA P1 DO *S. MUTANS*,
PROTEÍNA RECOMBINANTE E SEUS USOS NA PREVENÇÃO E CONTROLE
DA CÁRIE DENTAL

5 Campo da Invenção:

A presente invenção provê uma sequência de ácidos nucleicos (SEQ. de ID. No. 1) e correspondente sequência de aminoácidos da proteína imunogênica P1₃₉₋₅₁₂ (SEQ. de ID. No. 2) derivada da proteína P1 de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), compreendendo os aminoácidos 39 ao 512 da proteína nativa, expressa em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis*, e formulações farmacêuticas, preferencialmente vacinas, voltadas para o controle da cárie humana.

Adicionalmente, o presente pedido de patente destina-se ao uso de formulações farmacêuticas das sequências de ácidos nucleicos e/ou proteínas e/ou anticorpos específicos derivados da P1₃₉₋₅₁₂ para o controle profilático ou terapêutico da cárie e outras doenças associadas ao *S. mutans*.

20 Fundamentos da técnica:

O *S. mutans* é um dos principais agentes etiológicos da cárie dental, uma das doenças infecto-contagiosas humanas mais comuns entre os seres humanos (Russell et al., 2000).

Já é de conhecimento que a aderência do *S. mutans* ao dente envolve dois processos, um sacarose-dependente e outro sacarose-independente, sendo este último derivado da formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre a bactéria e a película dental (Gibbons et al., 1984 e Gibbons et al., 1986). O *S. mutans* também interage com outros microrganismos orais, incluindo colonizadores

primários, tais como o *Streptococcus gordonii* (Jenkinson & Lamont, 2005 e Nobbs et al., 2009).

O complexo processo multifatorial de aderência do *S. mutans* envolve o maior antígeno de superfície de *S. mutans*, uma proteína de peso molecular de aproximadamente 185 kDa denominada proteína P1, originalmente identificada como Antígeno I/II (Russell & Lehner, 1978).

A família da proteína P1 é expressa por quase todos os estreptococos orais e genes ortólogos têm sido também identificados em *S. pyogenes* e *S. Agalactiae* (Zhang et al., 2006).

A P1 está também relacionada ao fenômeno da agregação bacteriana mediada pela saliva, possivelmente por meio de um mecanismo não imune de eliminação do patógeno, o qual é abolido em cepas de *S. mutans* nocautes na proteína P1 (Lee et al., 1989 e Koga et al., 1990).

A proteína P1 tem-se mostrado um alvo promissor na imunidade protetora natural em humanos e tem sido estudada como um potencial antígeno protetor em estudos de imunização ativa de primatas não-humanos e murinos (Lehner et al., 1981; Michalek et al., 2001; Smith et al., 2008 e Shivakumar et al., 2009). Além disso, a imunização passiva com anticorpos monoclonais contra a P1 pode conferir uma proteção parcial contra a colonização de *S. mutans* em macacos (Lehner et al., 1985) e humanos (Ma et al., 1987).

A sequência primária da P1 de *S. mutans* apresenta características distintas: a porção N-terminal codifica para o peptídeo sinal (resíduos de aminoácido 1 a 38) e uma região rica em alanina (região A, que corresponde aos resíduos de aminoácidos 186-464). Recentemente, a proteína

P1 teve sua estrutura resolvida e demonstrou-se que a região A apresenta uma periodicidade de sete resíduos, que adota uma estrutura em alfa-hélice estendida (Larson et al., 2010).

5 A região central apresenta um segmento rico em prolina (P-região, correspondente aos resíduos de aminoácidos 840-963). Entre as regiões A e P, localiza-se um segmento comumente referido como região variável ou V, na qual reside a maior parte da diferença de sequência da proteína
10 P1 de cepas de *S. mutans* (Brady et al., 1991).

As regiões A e P interagem e contribuem para a formação de epítomos descontínuos (Dolleweerd van et al., 2004; Rhodin et al., 2004; Seifert et al., 2004 e McArthur et al., 2007). Na porção C-terminal, há o motivo LPXTG e
15 uma cauda citoplasmática (Pancholi e Fischetti, 1989 e Thon-That et al., 2004).

A região A tem sido associada à interação de *S. mutans* com componentes salivares, incluindo aglutininas salivares (SAG), tais como a proteína gp340 (Prakobphol et al.,
20 2000). Devido a estas interações, a região A é por vezes referida como região de ligação de saliva ou SBR (aminoácidos 186 a 464) (Nakai et al., 1993; Hajishengallis et al., 1995 e Hajishengallis et al., 1998). Esse segmento da P1 inibe competitivamente a aderência do *S. mutans* em
25 SAG imobilizado e agregação na presença de SAG livre (Crowley et al., 1993), porém, determinantes diferentes podem estar associados aos dois processos (Brady et al., 1992).

A região A também é antigênica e abrange epítomos para
30 células B e para células T (Takahashi et al., 1991, Kelly

et al., 1995 e Senpuku e col., 1996). Anticorpos contra esse segmento da P1 são capazes de bloquear a agregação de *S. mutans* e reduzir o desenvolvimento de cárie dental (Takahashi et al., 1991; Koga, 1992; Munro et al., 1993, 5 Huang et al., 2001; Michalek et al., 2001b e Tsuha et al., 2004).

O princípio de imunização contra a cárie dental foi inicialmente descrito por Bowen e colaboradores em 1969, e pesquisas posteriores confirmaram que a geração de 10 anticorpos, em especial do tipo IgA na saliva e IgG no fluido crevicular, pode levar ao controle da cárie dental (Oli et al., 2004; Rhodin et al., 2004 e Tsuha et al., 2004). Desde então, foram propostas várias estratégias vacinais anti-cárie que envolveram vacinas de subunidades, 15 vacinas conjugadas, sistemas vivos de entrega e, mais recentemente, vacinas de DNA (Shivakumar et al., 2009). No entanto, nenhuma proteção completa contra a formação da cárie foi observada em testes clínicos.

Além disso, algumas estratégias vacinais, 20 particularmente aquelas baseadas em vacinas de subunidades, as quais empregam apenas frações acelulares expressas em linhagens bacterianas recombinantes (*Escherichia coli*), não obtiveram sucesso devido à geração de respostas imunes insatisfatórias ou inadequadas, o que sugere que a natureza 25 do antígeno usado não reproduz a conformação da proteína nativa expressa pelo patógeno.

Desta forma, o emprego de proteínas recombinantes que melhor representam a conformação da proteína nativa ou o uso de sistemas de expressão que permitam a expressão de 30 proteínas recombinantes mais compatíveis com o emprego

vacinal representam passos importantes para que estratégias imunoproláticas ou terapêuticas efetivas contra a cárie dental sejam desenvolvidas.

Estudos prévios demonstraram o desenvolvimento de vacinas anti-cárie baseadas na região N-terminal de P1 expressa em *E. coli* (Okahashi et al., 1993, Crowley et al., 1993; Hajishengallis et al., 1995; Toida et al., 1997 e Matsumoto-Nakano et al., 2008). Normalmente, a proteína P1 recombinante expressa em linhagens de *E. coli* apresenta-se na forma de uma proteína de fusão ligada covalentemente a proteínas de alto peso molecular de modo a permitir a sua secreção para o periplasma bacteriano, reduzir a degradação proteolítica ou simplificar o processo de purificação.

Proteínas híbridas expressas em bactérias podem perder importantes determinantes imunológicos característicos da proteína nativa, logo, a geração de peptídeos não fusionados derivados da P1 empregando um sistema de expressão alternativo pode resultar em antígenos vacinais mais promissores e contribuir para o desenvolvimento de produtos e processos voltados para bloqueio da colonização pelo *S. mutans* e, conseqüentemente, a promover o controle da cárie dental.

Baixo custo e alto rendimento são as duas razões importantes que justificam o uso de cepas de *E. coli* como sistemas bacterianos de expressão de proteínas heterólogas. No entanto, muitos problemas estão associados à expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* como, por exemplo, o baixo rendimento, a geração de proteínas insolúveis e a contaminação por endotoxinas. Assim, uma alternativa aos sistemas convencionais de *E. coli* devem ser baseados em

outras espécies de bactérias, como espécies do gênero *Bacillus*. Dentre as espécies de *Bacillus* destaca-se o *B. subtilis*, uma bactéria de solo com grande uso industrial e alta capacidade de expressão de proteínas heterólogas, com
5 atividade biológica preservada e sem a contaminação por lipopolissacarídeos que podem afetar as respostas imunes.

Adicionalmente, o atual nível de conhecimento de sua fisiologia e genética, assim como a presença de diversos sistemas de expressão que tornam o emprego de *B. subtilis*
10 ainda mais atraente (Meima et al., 2004; Westers et al., 2004; Harwood, 1992; Paulitz et al., 2001 e Ferreira et al., 2005). No entanto, poucos laboratórios de pesquisa no mundo estão capacitados para empregar linhagens de *B. subtilis* como sistema de expressão de proteínas
15 heterólogas.

De fato, linhagens de *B. subtilis* demonstram uma boa capacidade de expressão e potencial para a purificação de proteínas recombinantes, principalmente com proteínas derivadas de bactérias gram positivas, tal como demonstrado
20 para a estreptoquinase, que apresentou uma grande estabilidade quando expressa em *B. subtilis* (Harwood, 1992; Terpe, 2006, Schumann, 2007 e Wong et al., 1994). Resultados semelhantes foram observados com a interleucina humana 3, a qual foi purificada com sucesso a partir de *B.*
25 *subtilis* e com um ótimo rendimento de cerca de 100 mg/L (Westers et al., 2005).

Diante de todos os problemas técnicos expostos, desenvolveu-se uma proteína recombinante inédita, derivada da proteína P1 do *S. mutans* que engloba a região A ou SBR e
30 sequências adicionais localizadas à jusante e à montante da

referida região A. Os resultados obtidos demonstram que, em função da definição de um novo segmento da proteína P1 do *S. mutans* (P1₃₉₋₅₁₂) e a utilização de linhagens recombinantes de *B. subtilis*, foi possível obter um antígeno com características antigênicas e imunogênicas inéditas e inesperadas, que permitem o seu uso como ferramenta para a geração de estratégias vacinais ou terapêuticas inovadoras no controle da cárie humana e geração de produtos inexistente no mercado até o momento.

10 **Estado da técnica:**

O documento coreano CN101036791 A provê o uso de uma vacina gênica voltada para o controle do *S. mutans* que codifica a proteína GTF (glicosiltransferase), envolvida na síntese de material capsular pela bactéria. Diferentemente da invenção em questão, o pedido de patente coreano está baseado em -(i) um gene encontrado na bactéria em seu estado natural, (ii) uma proteína distinta da proteína P1, (iii) o uso de uma vacina gênica e (iv) uma bactéria (*Escherichia coli*) distinta daquela ora pleiteada (*B. subtilis*).

20 A patente GB 2060647 A descreve o uso do antígeno I/II (ou proteína P1) para o desenvolvimento de vacinas contra a cárie causada pelo *S. mutans*. No entanto, a patente trata do uso da proteína natural extraída da bactéria *S. mutans*, enquanto o presente pedido refere-se ao uso da proteína recombinante produzida em *B. subtilis*, a qual engloba apenas um trecho da sequência original da proteína P1 e com características distintas da proteína natural.

30 O artigo "Vacinação: uma opção preventiva contra a cárie dental aprimorada pelos conhecimentos da imunologia e da biotecnologia" (PGR-Pós-Grad Rev Fac Odontol São José

dos Campos, v.4, n.1, jan./abr. 2001) descreve de forma genérica e superficial conceitos relativos ao desenvolvimento de vacinas e o eventual desenvolvimento de vacinas voltadas para o controle da cárie dental causada pelo *S. mutans*. No entanto, o gene que codifica para a proteína P1 (*spaP*) é apenas citado como um dos candidatos a antígeno vacinal para o controle da cárie dental e não são mencionados dados experimentais ou definição de processos que conflitam com a presente invenção.

10 O documento WO 2006/060903 A1 descreve o uso de peptídeos que interferem com a capacidade do *S. mutans* em trocar material genético e produzir biofilme, necessário à ligação da bactéria à superfície dental. O presente pedido, por sua vez, propõe uma estratégia experimental totalmente
15 distinta, envolvendo o conceito de vacinas e anticorpos que bloqueiam a adesão da bactéria ao hospedeiro, baseados em um derivado da proteína P1, sem qualquer ligação com a capacidade de troca de material genético entre bactérias.

O documento WO 1988/006594 descreve o uso de peptídeos
20 sintéticos derivados da proteína P1 do *S. mutans* apresentando até 35 aminoácidos derivados da proteína P1. Nenhum deles coincide com a proteína recombinante descrita na presente invenção. Pelo contrário, a estratégia descrita está voltada no uso de polipeptídeos sintéticos e não de
25 proteínas recombinantes.

A patente US 4442085 descreve um processo de purificação da proteína A do *S. mutans* e sua utilização na preparação de vacinas. De fato, a noção de que proteínas de superfície do *S. mutans* poderiam ser usadas como base para
30 o desenvolvimento de vacinas anti-cárie já existe, no

entanto, a presente invenção se diferencia pelo fato de
empregar um fragmento da proteína P1 que se mostrou mais
eficaz do que a proteína natural na geração de anticorpos
que neutralizam a capacidade do *S. mutans* em aderir a
5 superfícies abióticas.

A patente CN 101036790 A descreve o uso de vacinas de
DNA que codificam para proteínas localizadas na superfície
do *S. mutans*. No entanto, tanto o conceito vacinal quanto
as proteínas expressas são distintos daqueles descritos na
10 invenção ora pleiteada.

O artigo "Differentiation of salivary agglutinin-
mediated adherence and aggregation of mutans streptococci
by use of monoclonal antibodies against the major surface
protein P1" (Infection and Immunity, vol. 60, no. 3, Mar.
15 1992, p. 1008-1017) demonstra que anticorpos monoclonais
gerados com a proteína P1 do *S. mutans* podem bloquear a
capacidade de adesão da bactéria a superfície dental. Os
experimentos foram feitos empregando formas recombinantes
da proteína P1 produzidas em *E. coli*. A presente invenção
20 se diferencia do estudo feito pelo fato de empregar um
fragmento da proteína P1 que se mostrou mais eficaz do que
a proteína natural na geração de anticorpos que neutralizam
a capacidade do *S. mutans* em aderir a superfícies
abióticas. Além disto, o uso de linhagens de *B. subtilis*, e
25 não *E. coli*, contribuiu de forma não previsível para a
geração de uma proteína com potencial vacinal superior a
qualquer outra já descrita na literatura.

O artigo "Identification of a salivary agglutinin-
binding domain within cell surface adhesin P1 of
30 *Streptococcus mutans*" (Infection and Immunity, vol. 61, no.

4, Apr. 1993, p. 1547-1552) descreve regiões da proteína Pl do *S. mutans* que estão diretamente relacionadas ao processo de adesão da bactéria a superfícies abióticas, como a superfície dental. A sequência descrita no estudo engloba os aminoácidos 186-464 da proteína nativa, enquanto a sequência descrita na presente invenção engloba os aminoácidos 39 a 512. A diferença na região expressa, assim como a expressão da proteína em *B. subtilis*, contribuíram para a produção de um material com características antigênicas únicas, o que resultou na geração de anticorpos mais eficientes para o bloqueio da adesão da bactéria.

Descrição das Figuras:

A figura 1 mostra a construção do vetor pLDV701 (B), no qual o fragmento de DNA codificante (A) para a proteína Pl₃₉₋₅₁₂ foi clonado à montante do promotor P_{grac} (P) do vetor pHT08.

A figura 2 revela a expressão, detecção e purificação da proteína recombinante Pl₃₉₋₅₁₂ a partir da linhagem recombinante de *B. subtilis* (LDV701).

A figura 3 revela a especificidade dos anticorpos gerados com a proteína Pl₃₉₋₅₁₂ após a imunização subcutânea com adjuvante de Freund (Sigma) em camundongos Balb/c fêmeas.

A figura 4 mostra a titulação dos anticorpos anti-Pl₃₉₋₅₁₂ (IgG) presentes em amostras de soro de animais imunizados com a proteína recombinante.

A figura 5 mostra a detecção por imunofluorescência da proteína Pl nativa na superfície do *S. mutans* empregando os soros gerados com as proteínas recombinantes Pl₃₉₋₅₁₂ e Pl_{39-512d}.

A figura 6 revela a caracterização funcional dos anticorpos gerados com a proteína Pl₃₉₋₅₁₂ nativa ou desnaturada por tratamento térmico.

Descrição detalhada da invenção:

5 O presente pedido de patente de invenção provê uma sequência de aminoácidos de uma proteína imunogênica recombinante derivada da proteína P1 de *S. mutans*, que inclui a porção amino terminal, sem o peptídeo sinal (1), e 473 aminoácidos da região variável (aminoácidos 39 a 512)
10 da proteína nativa; um plasmídeo recombinante; formulações farmacêuticas derivadas destes, preferencialmente vacinas, e anticorpos poli e monoclonais derivados desta.

Adicionalmente, a presente invenção destina-se ao uso das sequências e/ou plasmídeos recombinantes que codificam
15 para o antígeno vacinal Pl₃₉₋₅₁₂ aplicado no controle profilático ou terapêutico da cárie e/ou doenças sistêmicas associadas à bactéria, tal como a endocardite bacteriana.

Em uma primeira modalidade, o presente pedido de patente trata da sequência de aminoácidos da proteína
20 imunogênica Pl₃₉₋₅₁₂, que difere da região A (2), a qual corresponde aos aminoácidos 186-464, previamente utilizados em pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas contra a cárie dental, por englobar regiões adicionais à montante e à jusante. A proposta de uso desta região é
25 inédita e contribui para as propriedades imunogênicas observadas.

A figura 1A corresponde a um esquema representativo da sequência primária da proteína P1 de *S. mutans*, a qual apresenta em sua porção N-terminal o peptídeo sinal
30 (resíduos de aminoácido 1-38) (1) e a região rica em

alanina denominada de região A ou SBR (resíduos de aminoácidos 186-464) (2). A região central contém a porção variável ou região V (resíduos de aminoácidos 465-839) (3) e a região rica em prolina ou região P (resíduos de aminoácidos 840-963) (4). Na porção C-terminal, há a região de ancoramento na membrana citoplasmática e parede celular (resíduos de aminoácidos 1486-1556) (5), o motivo LPXTG (resíduos de aminoácidos 1529-1533) (6) e cauda citoplasmática (resíduos de aminoácidos 1557-1561) (7).

10 Para a geração da proteína Pl_{39_512}, foi clonada a região que compreende a porção N-terminal, sem o peptídeo sinal (1), e uma pequena porção da região V (8).

Em uma segunda modalidade da invenção, ~~descreve-se um~~ plasmídeo recombinante pLDV701, derivado do vetor pHT08

15 (Nguyen et al., 2007), construído a partir da clivagem por enzimas de restrição (BamHI e AatII) do plasmídeo pGP1N, o qual é derivado do vetor pGEM-T-easy e possui a sequência codificante para os aminoácidos 39 a 512 de *S. mutans* UA159 (Adjic et al., 2002).

20 A enzima BamHI digere o fragmento SpaP1N à montante enquanto a enzima de restrição AatII digere o fragmento numa região à jusante do fragmento SpaP1N. Como resultado da dupla digestão do pG1N, é gerado um fragmento de DNA de tamanho molecular igual a 1.461 pb, que é extraído do gel
25 de agarose 0,8%, purificado utilizando-se, por exemplo, o kit de extração "QIAquick® Gel" e ligado com o auxílio da T4 Ligase, resultando no plasmídeo recombinante PLDV701 contendo a sequência de ácidos nucleicos que codifica para a proteína Pl_{39_512}.

30 A figura 1B corresponde à representação do vetor

construído pLDV701, o qual apresenta o promotor *Pgrac* (P) e uma cauda com 8 histinas (H) à jusante da região que codifica para a proteína Pl_{39_512}.

Em uma terceira modalidade, o presente pedido destina-se ao preparo de formulações farmacêuticas contendo a proteína recombinante Pl_{39_512}, preferencialmente, vacinas. As formulações farmacêuticas podem ser administradas por via de mucosa, transcutânea e/ou vias de administração parenteral.

Em uma quarta modalidade, a invenção pleiteia o uso da sequência e/ou plasmídeos recombinantes como antígeno vacinal no preparo de formulações vacinais e/ou imunoterapêuticas aplicadas no controle profilático e/ou terapêutico de doenças associadas ao *S. mutans*, como a cárie dental e a endocardite bacteriana.

Em uma quinta modalidade, a presente invenção provê o uso da proteína Pl_{39_512} e/ou proteínas e peptídeos dela derivados, na produção de anticorpos poli ou monoclonais empregados na prevenção ou tratamento de cárie dental e outras doenças associadas à infecção pelo *S. mutans*.

A proteína recombinante Pl_{39_512} foi construída em laboratório com base nos estudos de caracterização fisiológica e imunológica da proteína Pl completa de *S. mutans*, assim como da região denominada A (ou SBR).

Os resultados indicam que a inclusão de sequências adicionais à montante e à jusante da região A (2) e sua produção em linhagens recombinantes de *B. subtilis* conferiu propriedades inéditas à proteína recombinante quanto à sua estabilidade, conformação e, sobretudo, suas propriedades imunológicas.

Construção da proteína recombinante Pl_{39 512}

O plasmídeo recombinante pLDV701, que codifica para a proteína Pl_{39 512}, foi obtido a partir da inserção do produto de amplificação de uma porção do gene spaP, da linhagem laboratorial de *S. mutans* UA159, no vetor pGEM-T-Easy nos
5 sítios de clivagem das enzimas de restrição BamHI e AatII.

Os iniciadores utilizados na amplificação por PCR continham sítios de clivagem para as referidas enzimas. O produto de amplificação contendo 1.461 pb foi submetido a
10 eletroforese em gel de agarose 0,8%, e posteriormente, excisado e purificado empregando o sistema "QIAquick® Gel extraction kit" conforme instruções do fabricante.

O fragmento foi ligado ao vetor pHT08, um vetor de expressão previamente descrito para uso em linhagens de *B. subtilis*, utilizando-se a enzima T4 ligase. Desta forma,
15 foi obtido o plasmídeo recombinante contendo o fragmento que codifica para a porção amino-terminal da proteína Pl e uma pequena porção da região variável da proteína.

Os demais procedimentos de confirmação da obtenção do plasmídeo recombinante e de transformação em linhagens de *E. coli* K-12 e *B. subtilis* são procedimentos laboratoriais de uso rotineiro.
20

Procedimento para a purificação da proteína Pl_{39 512}

As etapas desenvolvidas para a purificação da proteína Pl_{39 512} referem-se à preparação da massa celular, extração da proteína e cromatografia de afinidade.
25

- Preparação da Massa Celular:

Uma alíquota do estoque congelado de *B. subtilis* recombinante LDV701, albergando o plasmídeo pLDV701 foi
30 inoculada em 5 mL de meio LB com cloranfenicol (30 µg/mL)

em erlenmeyer de 500 mL e incubada a 37°C, 200 rpm em agitador orbital por 18 horas.

Este pré-inóculo foi utilizado como inóculo de 1 L (1 erlenmeyers de 3 L com 1 L de meio de cultura) nas mesmas condições de cultivo do pré-inóculo, até a absorbância de 0.6-0.8, no qual foi adicionado 0,1 M de IPTG. A cultura foi mantida por 4 horas sob indução e a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C e a massa celular estocada a -80°C para processamento posterior.

10 - Extração da Pl_{39 512}:

A massa bacteriana foi ressuspensa em 1/10 do volume original em tampão A (0.1 M Tris HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) e lisozima (800 µg/mL) e mantida por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, 0,01% de SDS (dodecil sulfato de sódio) e 0,01 M de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto) foram adicionados à suspensão e as células foram lisadas por sonicação.

O homogenato obtido foi clarificado por centrifugação a 10.000 rpm por 1h a 4°C. O sobrenadante foi microfiltrado com filtros de 0.22 µm Millipore. A solução obtida ao final desse processo foi denominada homogenato clarificado e foi aplicada à coluna de cromatografia de afinidade.

- Cromatografia de Afinidade por Níquel:

25 A cromatografia foi realizada no aparelho Äkta Explorer empregando-se a resina Histrap equilibrada com 5 volumes de coluna (vc) de tampão A com fluxo de 1 mL/min. O homogenato clarificado (1 L) foi aplicado em coluna com fluxo de 1,0 mL/min. A fração não adsorvida foi denominada FT. A proteína Pl_{39_512} foi eluída com 5 mL de tampão de

eluição com concentrações crescentes de imidazol (0.05 M até 1 M). A coluna foi regenerada com 5 vc de Tampão B e 10 vc de água destilada.

As frações eluídas foram quantificadas por espectrofotometria e caracterizadas em SDS-PAGE com géis de poliacrilamida na concentração de 12,5%.

Avaliação Imunológica da proteína Pl_{39_512}

- Ensaio de Imunização:

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/C, de 6 a 8 semanas de idade, obtidos no Biotério de Isogênicos da Parasitologia-ICBII/USP.

O protocolo de imunização consistiu da administração subcutânea de 5 doses de 10 µg de proteína Pl_{39_512} combinada com adjuvante de Freund completo ou incompleto (a partir da segunda dose) com intervalo de 14 dias.

A proteína recombinante foi empregada como antígeno em duas formas: solúvel (Pl_{39_512}) ou desnaturada a 100°C por 10 minutos (Pl_{39_512d}). O sangue dos animais foi coletado um dia antes de cada dose e duas semanas após a última dose.

Os soros dos animais foram recolhidos após a coagulação do sangue a 37°C por 30 minutos e retração do coágulo a 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação refrigerada de 3.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi retirado e estocado a -20°C. Como controle, empregou-se a proteína Pl recombinante completa, expressa e purificada da cepa de *E. coli* CG14.

Avaliação da Resposta Humoral

- Ensaio de ELISA para Titulação de Anticorpos Específicos contra Pl₃₉₋₅₁₂:

Poços alternados de uma microplaca de poliestireno

Polisorp (Nunc) foram sensibilizados por 18 horas a 4°C com 200 ng de proteína recombinantes P1, P1_{39_512} solúvel ou desnaturada.

As placas foram lavadas três vezes com PBS 1x e, após a lavagem, foi feito o bloqueio adicionando-se 200 µl de PBS 1x Tween 0.05% com leite 5% durante 60 min a 37°C.

Após novo ciclo de lavagens (3x), 100 µl dos soros foram aplicados aos poços e diluídos sericamente, estes conjuntos foram incubados à temperatura ambiente por 1h30min.

As placas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween a 0,05% (PBST) e a revelação foi feita com 100 µL/poço da solução reveladora por 20 min, à temperatura ambiente e no escuro e interrompida com 50 µL por poço de ácido sulfúrico a 1 M.

A leitura da densidade óptica foi realizada a 492 nm em leitor de placa (Multiscan MS- Labsystems). Cada ensaio foi realizado em duplicata e os títulos dos anticorpos foram estabelecidos como o inverso da maior diluição dos soros com densidade óptica acima daquelas obtidas com os soros pré-ímmunes.

Avaliação funcional dos anticorpos anti-pl_{39_512} específicos

- Imunofluorescência:

As linhagens PC3370 (ΔP1), deletada no gene que codifica a proteína P1, e PC3370C de *S. mutans* crescidas foram preparadas por meio de lavagens com PBS 1X e ressuspensão em 1 ml de PBS 1X.

As bactérias preparadas (100 µl) foram espalhadas em lâminas de vidro e fixadas por aquecimento. Em seguida, as

lâminas foram bloqueadas com BSA 3% por 30 min à temperatura ambiente e foi adicionado 20 µl de soro (anti-Pl, anti-Pl₃₉₋₅₁₂ ou anti-Pl_{39-512d}) diluído 1/500 e a mistura foi incubada por 30 min à 37° C. Posteriormente, a lâmina
5 foi lavada com PBS.

Após esse procedimento, o segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao FITC (Sigma Aldrich) foi adicionado e incubado ao abrigo da luz por 30 min à 37° C. Novas lavagens foram feitas e a células marcadas foram
10 observadas em microscópio de fluorescência.

- Inibição da agregação mediada por saliva de *S. mutans* por meio de anticorpos anti-Pl₃₉₋₅₁₂ em placas de microtitulação:

Inicialmente, a saliva de um único doador foi
15 clarificada por centrifugação (14.000 rpm, 15 min à 4°C).

Para os ensaios de agregação de *S. mutans* e inibição em presença de diferentes soros, as células de *S. mutans* PC3370 (controle negativo) e PC3370C foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas para uma DO (600 nm) de 1.

20 Para o ensaio de agregação, 100 µl da suspensão bacteriana juntamente com 50 µl PBS 1X, 50 µl de saliva clarificada diluída em tampão KPBS (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.2) e 2 µl de CaCl₂ (0.1 M) foram misturados e aplicados a poços de placas de
25 microtitulação.

Esse material foi incubado por 5 min à 37° C para estabilização e depois a DO (600nm) foi medida em espectrofotômetro para medição da absorbância no tempo 0 (T0). Em seguida, a placa foi incubada por mais 60 min e a
30 DO foi novamente medida, resultando no valor T60. Para

calcular a taxa de agregação das cepas, foi utilizada a equação: $[T0 - T60]$.

Para o ensaio de inibição da agregação, foram misturados 133 μ l de suspensão bacteriana, 50 μ l PBS com os anticorpos devidamente diluídos e 2 μ l de CaCl_2 . A mistura foi colocada em poços de placas de microtitulação e incubada por 30 min a 22° C. Posteriormente, a saliva clarificada diluída em KPBS foi adicionada e o conjunto foi incubado por 5 min a 37°C e a DO no tempo 0 foi determinada.

Depois, a placa foi incubada por mais 60 min e a DO foi novamente medida. A inibição da agregação bacteriana foi estimada por meio do mesmo cálculo descrito anteriormente. Todos os testes foram independentemente repetidos por três vezes.

Inibição da adesão mediada por saliva de S. mutans por meio de anticorpos anti-Pl₃₉₋₅₁₂ em placas de microtitulação:

A saliva clarificada diluída em KPBS (100 μ l/ poço) foi colocada em poços de placas de microtitulação e incubada por uma noite à 4°C.

A saliva foi removida e os poços lavados uma vez com TBSC (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7.6 e 5 mM CaCl_2), bloqueados com BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Depois, os poços foram lavados duas vezes com TBSC e 100 μ l da suspensão bacteriana ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$) foram adicionados aos poços e as placas incubadas à 37°C por 2 horas.

Então, os poços foram lavados com TBS e as células aderentes fixadas com formaldeído 25% por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada com

TBS e as células foram marcadas com cristal violeta 0.5% por 1 min à temperatura ambiente.

Por fim, a placa foi lavada com TBS e o corante remanescente foi diluído em ácido acético 7% e a
5 absorvância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro (DO600nm). Para os ensaios de inibição da adesão, inicialmente as células preparadas foram incubadas com os soros anti-Pl₃₉₋₅₁₂, anti-Pl_{39-512d} ou anti-Pl (controle positivo) na diluição de 1/3200 por 30 min à 37°C, e
10 depois, adicionadas à placa revestida com saliva.

O número de células ligadas com as amostras de soro, com e sem incubação prévia, e depois adicionadas a placa de ELISA foram calculadas a partir de uma curva padrão que relaciona o número de células de *S. mutans* e a DO600nm.

15 Como controle positivo para a reação de inibição foi empregado também EDTA (3 mM), pois a ligação entre a Pl e a gp340 é cálcio dependente (Crowley, 1993). Como controle negativo foi empregado o soro pré-imune. Os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente.

20 **Resultados obtidos:**

Avaliações Estatísticas:

Os resultados foram analisados no programa GraphPrism 5 e foram expressos como $\pm$ SD. O método estatístico One way ANOVA foi usado para comparar a inibição de aderência pelos
25 soros anti-Pl₃₉₋₅₁₂. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0.05$.

- Ensaio 1:

A proteína recombinante Pl_{39_512} foi expressa e purificada com eficácia empregando um sistema de *B. subtilis*. A proteína recombinante é reconhecida por
30

anticorpos gerados com a proteína P1 completa, indicando a preservação de epítomos importantes.

- Ensaio 2:

Um primeiro exemplo de formulação vacinal foi testado
5 em modelo murino, por administração subcutânea, consistindo
no uso da proteína recombinante P1_{39_512} co-administrada com
o adjuvante de Freund.

- Ensaio 3:

A proteína recombinante P1_{39_512} também pode ser
10 utilizada sozinha ou em co-administração com outros
adjuvantes para o controle e/ou erradicação do *S. mutans*.

O produto da presente invenção foi caracterizado em um
estudo baseado em sua obtenção e avaliação de suas
propriedades imunológicas e funcionais.

15 A proteína recombinante P1_{39_512} foi expressa e
purificada com grande eficiência pelo sistema de *B.*
subtilis.

O vetor pLDV701 codifica o polipeptídio N-terminal
recombinante, truncado da proteína P1 de *S. mutans*, com uma
20 cauda de histidina (H) sob controle do promotor Pgrac (P)
induzível por IPTG (Fig. 1B).

A proteína codificada tem uma massa molecular predita
de 55,7 kDa. Uma única banda, com uma massa molecular
aparente de aproximadamente 50 kDa, reativa com um anti-
25 soro anti-P1, foi detectada em immunoblots de extratos
totais de *B. subtilis* LDV701 após a incubação com IPTG para
induzir a expressão da proteína.

O mesmo anticorpo policlonal específico contra a P1
detectou apenas uma proteína de 185 kDa correspondendo à P1
30 presente no extrato do *S. mutans* PC3370C, usado como

controle positivo.

Nenhuma reação cruzada foi observada em extratos de *B. subtilis* transformadas com o vetor vazio, pHT08, ou na cepa LDV701 na ausência do indutor (Fig. 2A).

5 A proteína recombinante é acumulada no citoplasma do *B. subtilis* LDV701 e aproximadamente 50% da proteína apresenta-se na fração solúvel e 50% na fração insolúvel (Fig. 2B).

10 A obtenção da proteína Pl₃₉₋₅₁₂ purificada foi feita carregando uma coluna de níquel com extratos solúveis do *B. subtilis* LDV701 e a proteína recombinante foi eluída com 0,5 M de imidazol (Fig. 2C). O rendimento final da proteína recombinante foi de 15 mg/L de cultura, foi realizado após a incubação a 37°C por 4h na presença de IPTG.

15 A caracterização das propriedades imunológicas da proteína Pl₃₉₋₅₁₂ foi iniciada por meio da imunização subcutânea de dois grupos de camundongos com 5 doses da proteína: um grupo com a proteína solúvel e outro com a proteína desnaturada por fervura (Pl_{39-512d}).

20 Os anticorpos obtidos com a proteína não-tratada e desnaturada, assim como o anticorpo anti-P1, foram titulados por meio de ELISA usando as proteínas purificadas Pl₃₉₋₅₁₂, Pl_{39-512d} e P1 como antígeno de fase sólida.

25 Os maiores títulos de IgG sérico anti-P1₃₉₋₅₁₂ foram obtidos com a proteína solúvel, 7.6×10^4 , e quando a proteína desnaturada foi empregada os títulos de IgG foram um pouco menores (6.8×10^3). A proteína solúvel empregada como antígeno ligado apresentou títulos de IgG que variaram de 7.6×10^4 até 1.1×10^4 , com o soro anti-P1₃₉₋₅₁₂ e anti-
30 Pl_{39-512d}, respectivamente.

Quando a proteína desnaturada P1_{39-512d} foi empregada como antígeno ligado, os títulos de IgG foram similares, contudo com uma potência menor do que quando foi empregado a proteína solúvel, conforme pode ser observado na Tabela 1

5 abaixo:

Soro	Antígeno de fase sólida:		
	P1	P1 ₃₉₋₅₁₂	P1 _{39-512d}
Anti-P1	1.65×10^9	1.3×10^4	6.3×10^3
Anti-P1 ₃₉₋₅₁₂	7.0×10^3	7.6×10^4	6.8×10^3
Anti-P1 _{39-512d}	8.4×10^3	1.1×10^4	5.1×10^3
Anti-Smua	ND	1.7×10^5	7.0×10^4
Anti-SmuΔP1b	ND	2.0×10^2	1.4×10^2

ND - Não determinado

a - Soro anti-*S. mutans* PC3370C

b - Soro anti-*S. mutans* PC3370

As propriedades antigênicas da proteína P1₃₉₋₅₁₂ na

10 forma solúvel e desnaturada foram estudas e comparadas em ensaios de ELISA empregando três anticorpos: o primeiro contra o *S. mutans* (α-Smu), o segundo contra a proteína P1 recombinante completa e, por fim, um controle negativo, com anticorpo contra uma linhagem de *S. mutans* nocaute para a

15 proteína P1 (PC3370).

Os resultados mostraram que o soro contra a proteína recombinante P1 e contra o *S. mutans* (PC3370C) foram fortemente reativos com ambas as formas da proteína P1₃₉₋₅₁₂ e que os títulos de IgG menores foram obtidos com a

proteína Pl₃₉₋₅₁₂ desnaturada (Figura 4).

Os anticorpos gerados com as duas formas da proteína Pl₃₉₋₅₁₂ são capazes de reconhecer especificamente a proteína Pl nativa expressa na superfície da linhagem PC3370C de *S. mutans*, mas não na linhagem nocaute PC3370 (Fig. 3). Além disso, este reconhecimento foi semelhante ao anticorpo anti-Pl.

Coletivamente, estes resultados indicam que proteína Pl₃₉₋₅₁₂ purificada a partir da linhagem recombinante de *B. subtilis*, nas formas solúvel e desnaturada, apresentam determinantes antigênicos e imunogênicos da proteína Pl nativa de *S. mutans* e induzem altos títulos de IgG antígeno-específico após imunização parental.

Entretanto, a presença de títulos IgG anti-Pl menores gerados em camundongos imunizados com a proteína Pl_{39-512d} sugerem que alguns determinantes antigênicos, como epítomos conformacionais, são perdidos após desnaturação por fervura da proteína. Além disso, estes resultados sugerem que epítomos lineares e conformacionais presentes na proteína Pl nativa, particularmente, aqueles localizados na superfície intacta das células de *S. mutans*, são mantidos no polipeptídeo recombinante Pl₃₉₋₅₁₂ não desnaturado

As características funcionais dos anticorpos gerados contra a proteína recombinante Pl_{39-512d} produzida em *B. subtilis* foi demonstrada por meio da análise da capacidade destes anticorpos em inibir in vitro tanto a agregação quanto a aderência de *S. mutans* mediada por saliva em superfícies abióticas. Os anticorpos anti-Pl₃₉₋₅₁₂ quanto o anti-Pl_{39-512d} inibem o processo de agregação mediado por saliva de *S. mutans* em níveis similares aos alcançados pelo

soro anti-P1 (Fig. 3A).

Em contraste, o soro pré-imune (controle negativo) não teve nenhum efeito neste processo. Ambos os anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ e anti-P1_{39-512d} inibiram significativamente a
5 ligação da linhagem PC3370C de *S. mutans* aos constituintes salivares imobilizados (Fig. 3B).

Nenhuma inibição significativa foi observada em presença do soro pré-imune, assim como nenhuma agregação e aderência foi observada sem ou com saliva quando a linhagem
10 de *S. mutans* PC3370, nocaute na proteína P1, foi empregada. Os resultados indicam que importantes determinantes imunológicos, necessários tanto para a agregação como para a adesão da proteína P1 nativa de *S. mutans*, estão presentes na proteína recombinante expressa em *B. subtilis*
15 e que os anticorpos gerados apresentam papel efetor e possível aplicação em vacinas acelulares contra o *S. mutans*.

O presente pedido de patente apresenta uma proteína recombinante derivada da proteína P1 de *S. mutans* com
20 potencial imunogênico preservado e, quando associado ao adjuvante de Freund ou outras substâncias com propriedades adjuvantes em imunizações por vias parenterais, induz altos títulos de IgG sérico específicos contra a proteína P1 de *S. mutans*.

25 Apesar de representar apenas uma porção da principal proteína de adesão de *S. mutans*, a formulação demonstrou ser mais eficiente em gerar anticorpos neutralizantes contra o patógeno do que a proteína P1 completa.

Referências bibliográficas:

30 - Adjic D, McLaughlin R, Savic G et al., (2002) Genome

sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. PNAS 99: 14439-14494.

- Brady LJ, Cvitkovitch DG, Geric CM, Addison MN, Joyce JP, Crowley PJ, & Bleiweis AS (1998) Deletion of the
5 central proline-rich repeat domain results in altered antigenicity and lack of surface expression of the *Streptococcus mutans* P1 adhesin molecule. Infect Immun 66: 4274-4282.

- Brady LJ, Piacentini DA, Crowley PJ, Oyston PC &
10 Bleiweis AS (1992) Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of *mutans streptococci* by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesion P1. Infect Immun 60: 1008-1017.

- Crowley PJ, Brady LJ, Piacentini DA & Bleiweis AS
15 (1993) Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*. Infect Immun 61: 1547-1552.

- Ferreira LCS, Ferreira RCC & Schumann W (2005) *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from
20 antigen factories to delivery vectors. An. Acad. Bras. Cienc. 77: 113-124.

- Gibbons R, Cohen L & Hay D (1986) Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. Infect Immun 52: 555-561.

25 - Gibbons, R. 1984. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. Journal Dental Research 63: 378-385.

- Hajishengallis G, Hollingshead SK, Koga T & Russell MW (1995) Mucosal immunization with a bacterial protein
30 antigen genetically coupled to cholera toxin A2/B subunits.

J Immun 154: 4322-4332.

- Hajishengallis G, Russell MW & Michalek SM (1998)
Comparison of an adherence domain and a structural region
of *Streptococcus mutans* antigen I/II in protective immunity
5 against dental caries in rats after intranasal
immunization. Infect Immun 66: 1740-1743.

- Harwood CR (1992) *Bacillus subtilis* and its
relatives: molecular biological and industrial workhorses.
Trends Biotechnol 10: 247-256.

10 - Homonylo-McGavin M & Lee SF (1996) Role of the C
terminus in antigen P1 surface localization in
Streptococcus mutans and two related cocci. J Bacteriol
178: 801-807.

- Huang Y, Hajishengallis G & Michalek SM (-2001) -

15 Induction of protective immunity against *Streptococcus*
mutans colonization after mucosal immunization with
attenuated *S. enterica* serovar typhimurium expressing an *S.*
mutans adhesion under control of in vivo-inducible nirB
promoter. Infect Immun 69: 2154-2161.

20 - Jenkinson H & Lamont RJ (2005) Oral microbial
communities in sickness and in health. Trends Microbiol 13:
589-595.

- Kelly CG, Todryk S, Kendal HL, Munro G & Lehner
T(1995) T-cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell
25 surface *Streptococcus mutans* protein antigen I/II. Infect
Immun 63: 3649-3658.

- Koga T (1992) Molecular and immunological
characterization of surface protein antigens from *mutans*
streptococci. J Dent Res 71: 518.

30 - Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa

H & Iwaki M (1990) Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect Immun* 58: 289-296.

- Larson MR, Rajashankar KR, Patel MH, Robinette RA,
5 Crowley PJ, Michalek S, Brady LJ, Deivanayagam C (2010)
Elongated fibrillar structure of a streptococcal adhesin
assembled by the high-affinity association of {alpha} - and
PPII-hleices. *PNAS* in press. doi: 10.1073/pnas.0912293107

- Lee S, Progulske-Fox A & Bleiweis AS (1988)
10 Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans*
major surface protein antigen, P1 (I/II), in *Escherichia*
coli. *Infect Immun* 56: 2114-2119.

- Lee S, Progulske-Fox A, Erdos GW, Piacentini D,
Ayakawa GY, Crowley PJ & Bleiweis AS (1989) Construction
15 and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus*
mutans deficient in major surface protein antigen P1
(I/II). *Infect Immun* 57: 3306-3313.

- Lehner T, Caldwell J & Smith T (1985) Local passive
immunization by monoclonal antibodies against streptococcal
20 antigen I/II in the prevention of dental caries. *Infect*
Immun 50: 796-799.

- Lehner T, Russell MW, Caldwell J & Smith R (1981)
Immunization with purified protein antigens from
Streptococcus mutans against dental caries in Rhesus
25 monkeys. *Infect Immun* 34: 407-415.

- Ma JKC, Smith R & Lehner T (1987) Use of monoclonal
antibodies in local passive immunization to prevent
colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*, *Infect*
Immun 55:1274-1278.

30 - Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Amano A & Ooshima T

(2008) Molecular interactions of alanine-rich and proline-rich regions of cell surface protein antigen c in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 23: 265-270.

- McArthur W, Rhodin N, Seifert T, Oli M, Robinette R,

5 Demuth D & Brady LJ (2007) Characterization of epitopes recognized by anti-*Streptococcus mutans* P1 monoclonal antibodies. *Immunol Med Microbiol* 50: 342-353.

- Meima R, Van Dijk JM & Bron S (2004) Expression systems in *Bacillus*. *Protein expression technologies*,

10 (Baneyx F, ed), pp. 199-252. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.

- Michalek SM, Huang Y & Hajishengallis G (2001b)

Induction of protective immunity against *Streptococcus mutans* colonization after mucosal immunization with

15 attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing an *S. mutans* adhesion under the control of in vivo-inducible *nirB* promoter. *Infect Immun* 69: 4344-4349.

- Michalek SM, Katz J & Childers NK (2001) A vaccine against dental caries: an overview. *Biodrugs* 15: 501-508.

20 - Munro G, Evans P, Todryk S, Buckett P, Kelly CG & Lehner T (1993) A protein fragment of Streptococcal cell surface antigen I/II which prevents adhesion of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 61: 4590-4598.

- Nakai M, Okahashi N, Ohta H & Koga T (1993) Saliva-

25 binding Region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. *Infect Immun* 61: 4344-4349.

- Nguyen HD, Phan TTP & Schumann W (2007) Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiol* 55: 89-93.

30 - Nobbs A, Lamont RJ & Jenkinson H (2009)

Streptococcus adherence and colonization. Microbiology and Molecular biology Reviews 73: 407-450.

- Okahashi N, Takahashi I, Nakai M, Senpuku H, Nisizawa T & Koga T (1993) Identification of Antigenic epitopes in an Alanine-rich repeating region of surface protein antigen of Streptococcus mutans. Infect Immun 61: 1301-1306.

- Oli MW, McArthur WP & Brady LJ (2006) A whole cell BIAcore assay to evaluate P1-mediated adherence of Streptococcus mutans to human salivary and inhibition by specific antibodies. J Microbiol Methods 65 (3): 503-511

- Pancholi V & Fischetti VA (1989) Identification of an endogenous membrane anchor-cleaving enzyme for group A streptococcal M protein. Its implication for the attachment of surface proteins in gram-positive bacteria. J Exp Med 170: 2119-2133.

- Paulitz TC & Bélanger RR (2001) Biological control in greenhouse systems. Annu Rev Phytopathol 39: 103-133.

- Prakobphol A, Xu F, Hoang VM et al., (2000) Salivary agglutinin, which binds Streptococcus mutans and Helicobacter pylori, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. J Biol Chem 275: 39860-39866.

- Rhodin NR, Cutalo, JM, Tomer, TN, McArthur WP & Brady LJ (2004) Characterization of the Streptococcus mutans P1 epitope recognized by immunomodulatory monoclonal antibody 6-11A. Infect Immun 72: 4680-4688.

- R ndegren JL & Arnold RR (1987) Bacteria-agglutinating characteristics of secretory IgA and a salivary agglutinin. Adv Exp Med Biol 216:1005-1013.

- Russell R (2000) Pathogenesis of oral streptococci. Gram-positive pathogens, (Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, & Rool JI, eds), pp. 272-279. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

5 - Russell RRB & Lehner T (1978) Characterization of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. Arch Oral Biol 23: 7-15.

 - Sambrook J & Russell DW (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New
10 York.

 - Schumann W (2007) Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. Adv Appl Microb 62: 137-189.

 - Seifert T, Bleiweis AS & Brady LJ (2004) Contribution of the alanine-rich region of *S. mutans*-P1 to
15 antigenicity, surface expression, and interaction with the proline-rich repeat domain. Infect Immun 72: 4699-4706.

 - Senpuku H, Iizima T, Yamaguchi Y, Nagata S, Ueno Y, Saito M, Hanada N & Nisizawa T (1996) Immunogenicity of peptides coupled with multiple T-cell epitopes of a surface
20 protein antigen of *Streptococcus mutans*. Immunology 88: 275-283.

 - Senpuku H, Yanagi K & Nisizawa T (1998) Identification of *Streptococcus mutans* PAc peptide motif binding with human MHC class II molecules (DRB1*0802,
25 *1101, *1401 and *1405). Immunology 95: 322-330.

 - Shivakumar KM, Vidya SK & Chandu GN (2009) Dental caries vaccine. Indian J Dent Res 20: 99-106.

 - Smith DJ & Mattos-Graner RO (2008) Secretory immunity following *mutans streptococcal* infection or
30 immunization. Curr Top Microbiol Immunol 319: 131-156.

- Takahashi I, Okahashi N, Matsushita K, Tokuda M, Kanamoto T, Munekata E, Russell MW & Koga T (1991) Immunogenicity and protective effect against oral colonization by Streptococcus mutans of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. J Immunol 146: 332-336.
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 72: 211-222.
- Toida N, Hajishengallis G, Wu H & Russell MW (1997) Oral immunization with Saliva-Binding Region of Streptococcus mutans Ag I/II genetically coupled to the cholera toxin B subunit elicits T-helper-cell responses in gut-associated lymphoid tissues. Infect Immun 65: 909-915.
- Ton-That H, Marraffini LA & Schneewind O (2004) Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. Biochim Biophys Acta 1694: 269-278.
- Tsuha Y, Hanada N, Asano T, Abeis T, Yamaguchi S, Salam M, Nakao R, & Takeuchi H (2004) Role of peptide antigen for induction of inhibitory antibodies to S. mutans in the human oral cavity. Clinical Exp Immunol 137: 393-401.
- Van Dolleweerd CJ, Kelly CG, Chargelegue D & Ma J (2004) Peptide Mapping of a Novel Discontinuous Epitope of the Major Surface Adhesin from Streptococcus mutans. J Biol Chem 279: 22198-22203.
- Westers L, Dijkstra DS, Westers H, Van Dijl JM & Quax WJ (2005) Secretion of functional human interleukin-3 from Bacillus subtilis. J Biotechnol 123: 211-214.

- Westers H, Darmon E, Zanen G, Veening JW, Kuipers OP, Bron S, Quax WJ, & Van Dijl JM (2004) The Bacillus secretion stress response is an indicator for alpha-amylase production levels. Lett Appl Microbiol 39: 65-73.

5 - Wong SL, Ye R & Nathoo S (1994) Engineering and production of streptokinase in a Bacillus subtilis expression-secretion system. Appl Environ Microbiol 60: 517-523.

10 - Zhang P, Jespersgaard C, Lamberty-Mallory L, Katz J, Huang Y, Hajishengallis G, & Michalek SM (2002) Enhanced immunogenicity of a genetic chimeric protein consisting of two virulence antigens of Streptococcus mutans and protection against infection. Infect Immun 70: 6779-6787.

15 - Zhang S, Green NM, Sitkiewicz I, LeFebvre RB & Musser JM (2006) Identification and characterization of an antigen - I/II - family protein produced by group A Streptococcus. Infect Immun 74: 4200-4213.

REIVINDICAÇÕES

1. Sequência de ácido nucléico recombinante que codifica para os aminoácidos 39 a 512 da proteína P1 do *S. mutans* caracterizada pelo fato de ser estabelecida na SEQ. de ID. No. 1 e compreender a região amino terminal da proteína P1 sem incluir o peptídeo sinal (aminoácidos 1 a 38), toda a sua região A e parte da região variável expressa por linhagens da bactéria *S. mutans*.

2. Proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ caracterizada pelo fato de não apresentar o peptídeo sinal e de conter toda a região A e parte da região variável da proteína P1 do *S. mutans*.

3. Proteína recombinante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de compreender a SEQ. de ID. No. 2.

4. Proteína recombinante, de acordo com qualquer umas das reivindicações 2 ou 3, caracterizada pelo fato de ser posteriormente purificada por cromatografia de afinidade de formas solúvel e insolúvel.

5. Proteína recombinante, de acordo com qualquer umas das reivindicações 2 ou 3, caracterizada pelo fato de ser expressa em linhagens recombinantes de *B. subtilis*.

6. Proteína recombinante, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de ser expressa em outros sistemas de expressão em bactérias, fungos (leveduras), vírus ou células de mamífero.

7. Proteína recombinante, de acordo com as reivindicações 2, 3 ou 4, caracterizada pelo fato de ainda ser submetidas a um tratamento desnaturante.

8. Proteína recombinante, de acordo com a

reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o tratamento desnaturante consiste na incubação da proteína a 100°C por 10 minutos.

9. Proteína recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que esta pode ser fusionada a outras proteínas heterólogas para subsequente purificação da proteína híbrida por cromatografia de afinidade.

10. Proteína recombinante, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que pode ser fusionada a antígenos de natureza viral, bacteriana, parasitária ou fúngica.

11. Formulação farmacêutica e/ou veterinária caracterizada pelo fato de compreender a proteína recombinante conforme descrita em qualquer uma das reivindicações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 e/ou a sequência de ácidos nucleicos conforme definida na reivindicação 1 em veículos farmacêuticamente aceitáveis.

12. Formulação, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de compreender, de forma preferencial, a proteína P₁₃₉₋₅₁₂ purificada.

13. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 12, caracterizada pelo fato de que esta está, preferencialmente, na forma de vacina.

14. Formulação, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a formulação vacinal compreende, opcionalmente, vacinas de DNA que codificam a proteína P₁₃₉₋₅₁₂.

15. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 12, 13 ou 14, caracterizada pelo fato de

compreender, opcionalmente, adjuvantes vacinais, particularmente, sais de alumínio (alumen), MF59 e saponina.

5 16. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 12, 13, 14 ou 15, caracterizada pelo fato de que a proteína Pl₃₉₋₅₁₂ recombinante purificada está presente em uma concentração de 1 µg/dose a 500 µg/dose, de preferência, 50 a 100 µg/dose.

10 17. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizada pelo fato de que pode ser administrada pelas vias intramuscular, subcutânea, intradérmica e mucosas, preferencialmente, a via oral.

15 18. Uso da proteína recombinante conforme descrita em qualquer uma das reivindicações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de ser para preparar uma formulação compreendendo a proteína Pl₃₉₋₅₁₂ como ingrediente ativo indicado para o tratamento de cáries, ou infecções sistêmicas associadas ao *S. mutans*, preferencialmente, 20 endocardites e outras infecções sistêmicas.

FIGURA 1

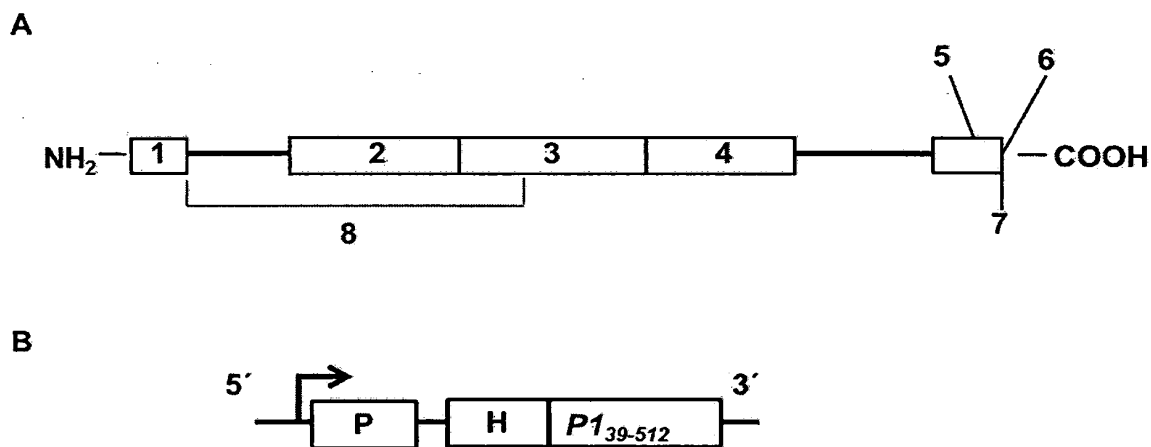


FIGURA 2

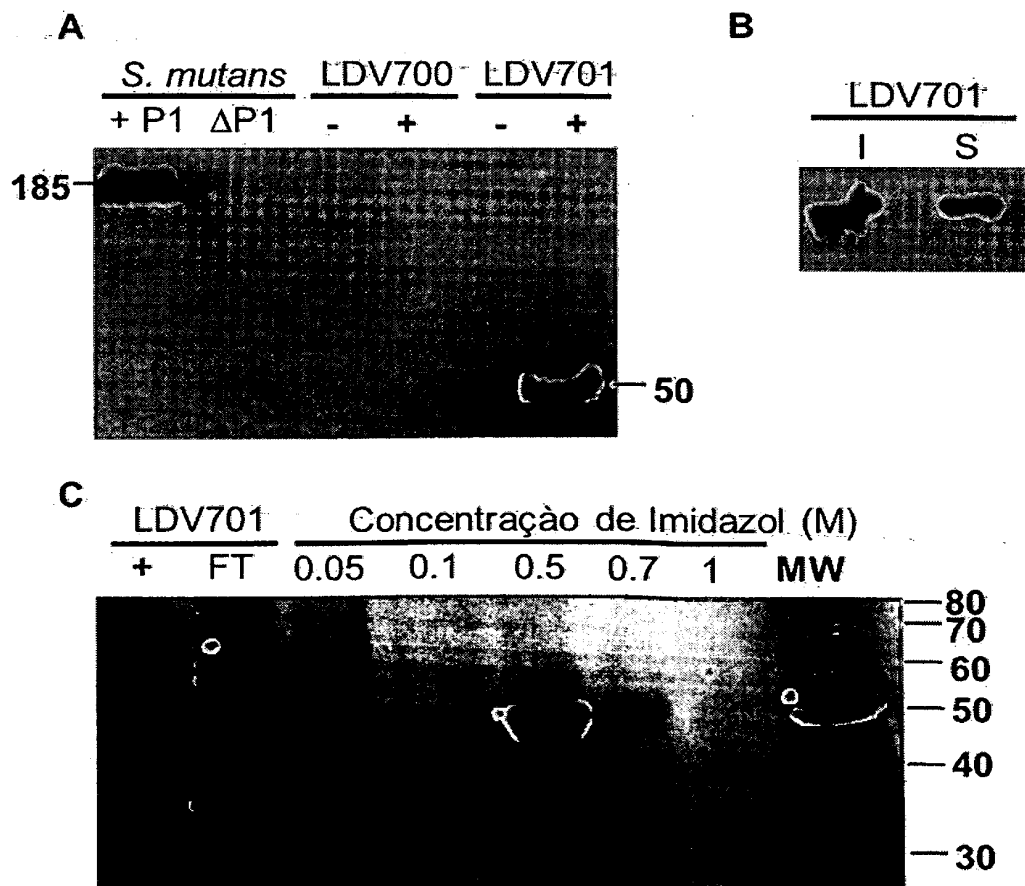


FIGURA 3

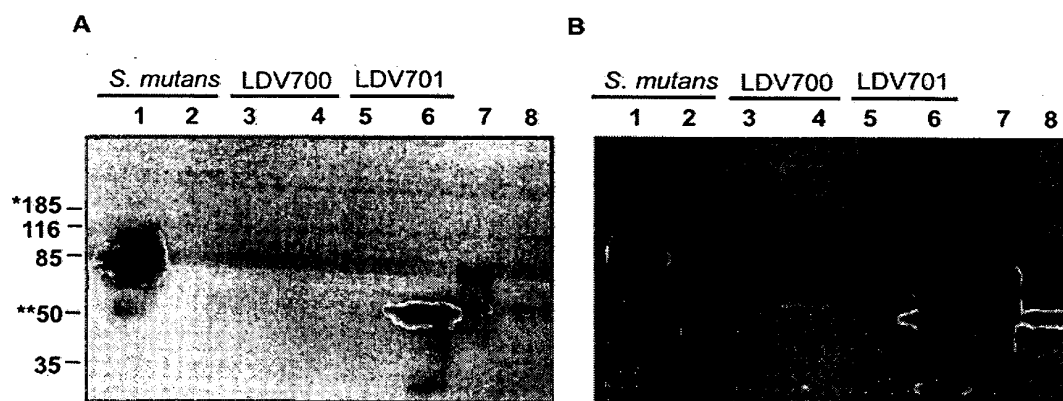


FIGURA 4

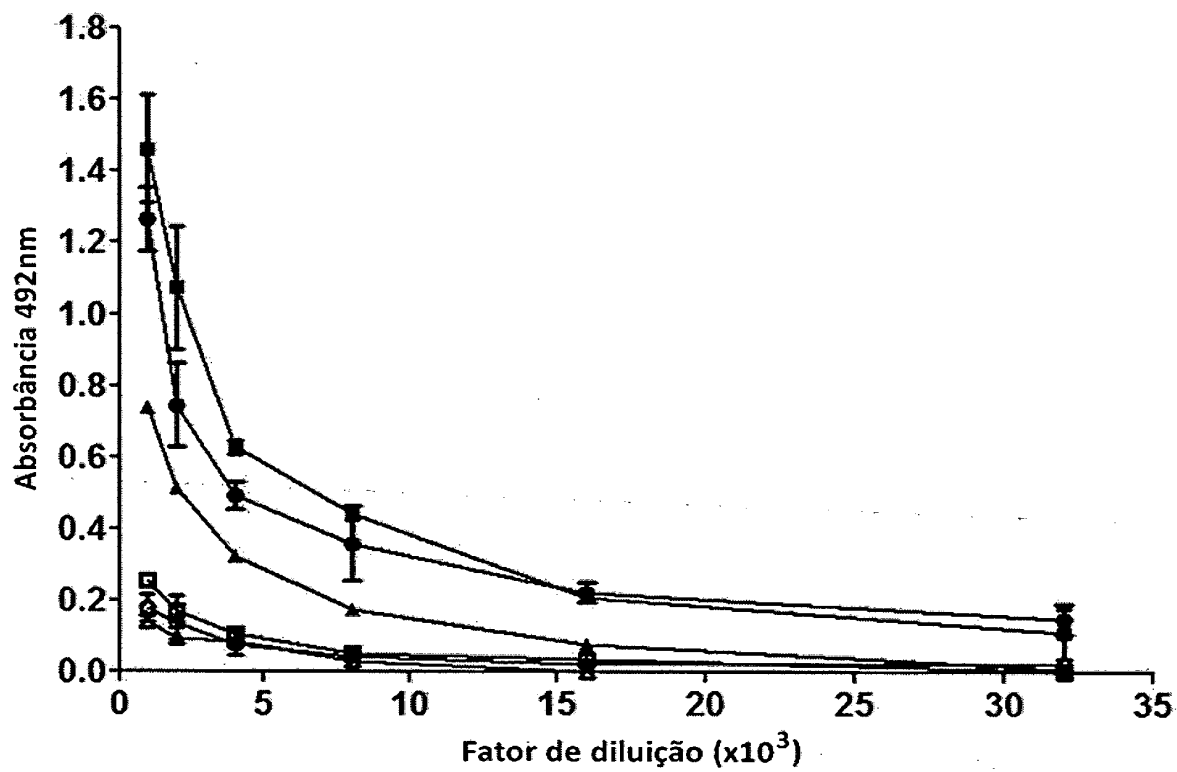


FIGURA 5

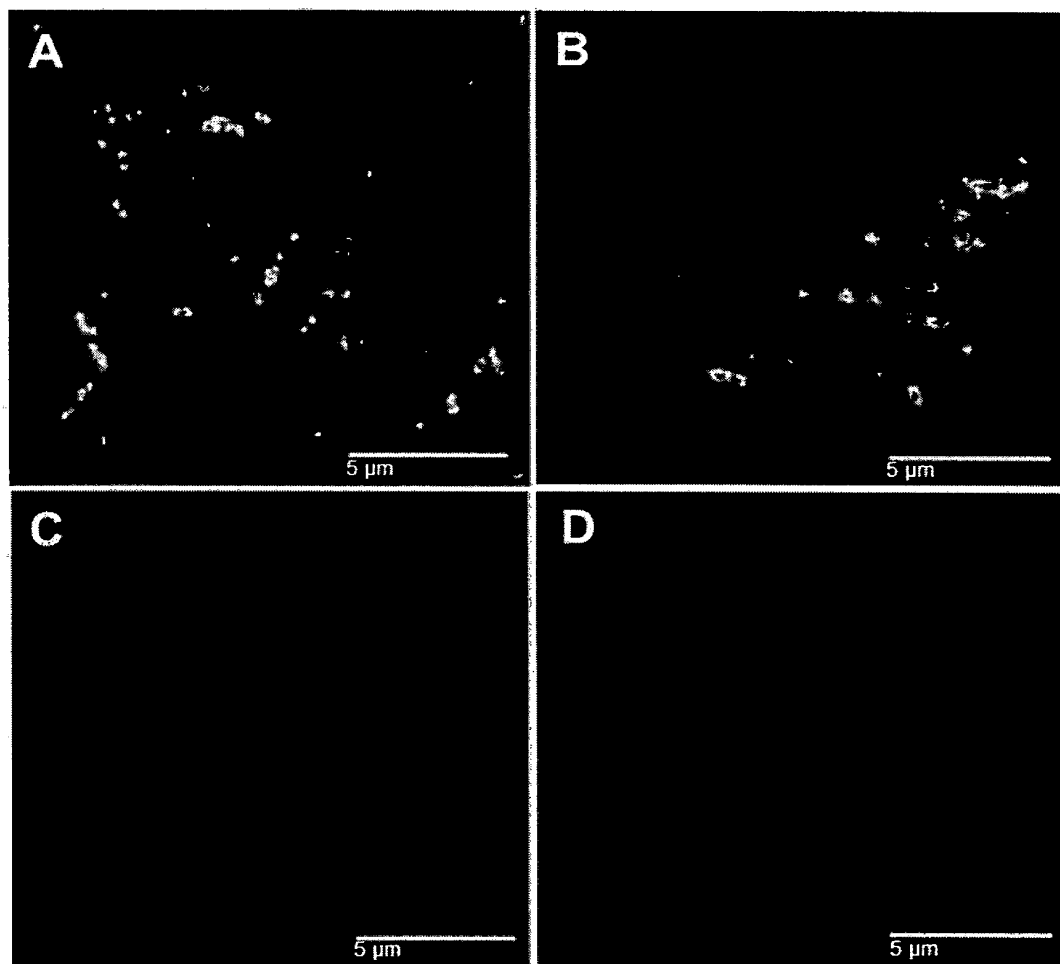
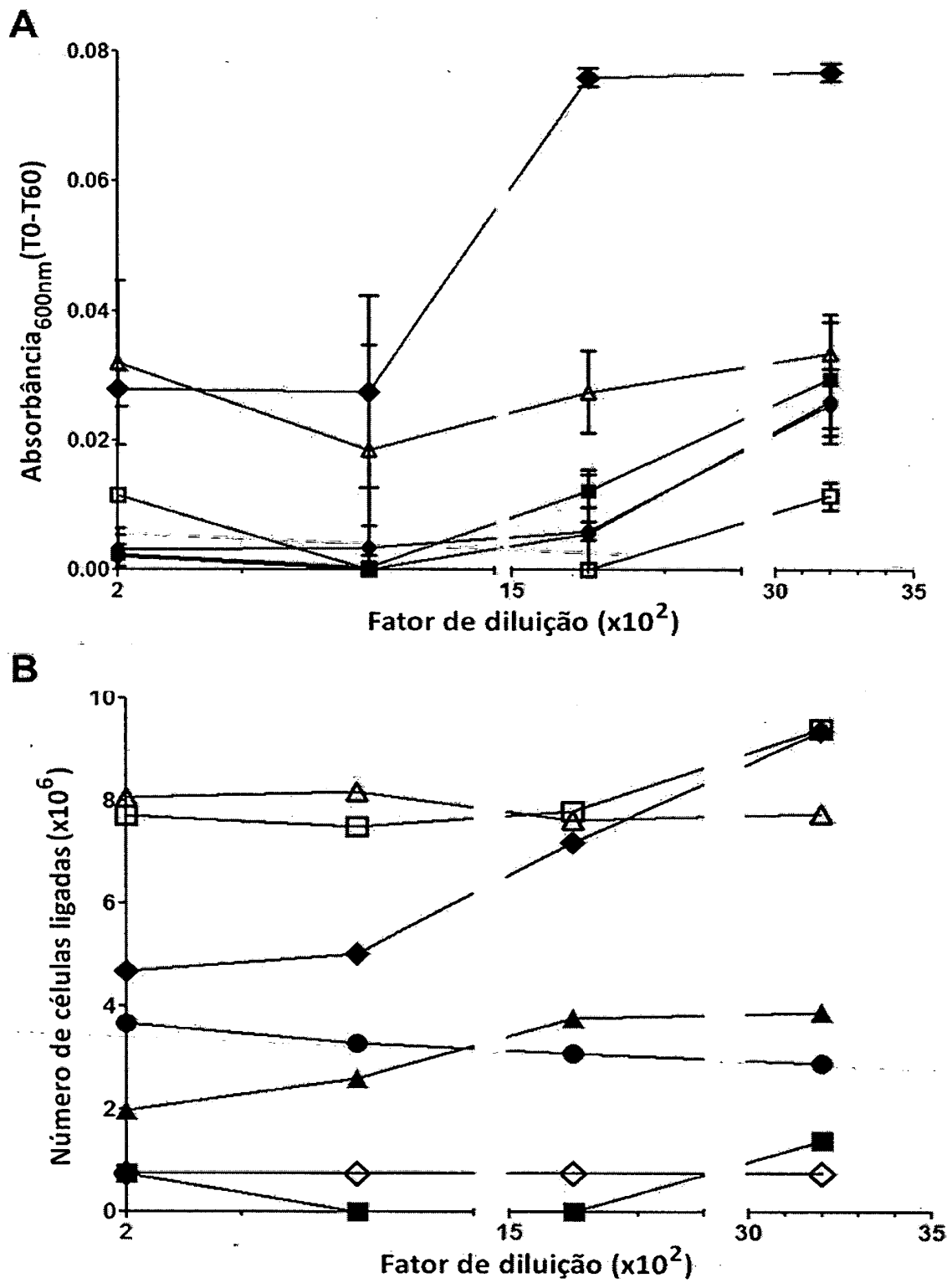


FIGURA 6



Resumo

**SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO RECOMBINANTE QUE CODIFICA PARA
OS AMINOÁCIDOS 39 A 512 DA PROTEÍNA P1 DO *S. MUTANS*,
PROTEÍNA RECOMBINANTE E SEUS USOS NA PREVENÇÃO E CONTROLE
DA CÁRIE DENTAL**

A presente invenção provê uma sequência de ácidos nucleicos (SEQ. de ID. No. 1) e correspondente sequência de aminoácidos da proteína imunogênica P1₃₉₋₅₁₂ (SEQ. de ID. No. 2) derivada da proteína P1 de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), compreendendo os aminoácidos 39 ao 512 da proteína nativa, expressa em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis* e formulações farmacêuticas, preferencialmente vacinas, voltadas para o controle da cárie humana. Adicionalmente, o presente pedido de patente destina-se ao uso de formulações farmacêuticas das sequências de ácidos nucleicos e/ou proteínas e/ou anticorpos específicos derivados da P1₃₉₋₅₁₂ para o controle profilático ou terapêutico da cárie e outras doenças associadas ao *S. mutans*.