

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

(21) **PI 1005908-3 A2**

(22) Data de Depósito: 02/09/2010
(43) Data da Publicação: 14/08/2012
(RPI 2171)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 1/21
C12N 15/31
A61K 39/04
C12R 1/01

(54) Título: IMUNOMODULAÇÃO ATRAVÉS DE CEPA BACTERIANA RECOMBINANTE

(73) Titular(es): Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

(72) Inventor(es): Ana Cristina Gomes Santos Hostt, Ana Maria Caetano de Faria, Anderson Miyoshi, Bernardo Coelho Horta, Clarissa Santos Rocha, Marcela Santiago Pachego de Azevedo, Naira Roque Electo de Paiva, Vasco Ariston Electo de Paiva

(57) Resumo: IMUNOMODULAÇÃO ATRAVÉS DE CEPA BACTERIANA RECOMBINANTE. A presente invenção refere-se a obtenção de uma linhagem bacteriana geneticamente modificada (cepa) engenhada para a produção e secreção da proteína Hsp65 livre de LPS. Além disso, a invenção ora proposta também descreve o uso dessa cepa e composições farmacêuticas contendo a mesma na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias.

Imunomodulação Através de Cepa Bacteriana Recombinante

A presente invenção refere-se a obtenção de uma linhagem bacteriana geneticamente modificada (cepa) engenhada para a produção e secreção da proteína Hsp65 livre de LPS. Além disso, a invenção ora proposta também
5 descreve o uso dessa cepa e composições farmacêuticas contendo a mesma na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias.

A imunomodulação de doenças de caráter auto-imune pela administração oral de antígenos (proteínas) que são o alvo do ataque tem sido relatada em vários trabalhos. Tais doenças auto-imunes, testadas em modelos
10 experimentais animais, incluem esclerose múltipla (ou encefalomielite auto-imune experimental), tireoidite, miastenia, artrite, uveíte, diabetes, colite, entre outras. Essa possibilidade terapêutica, testada em animais, pode ser explicada pela indução de um fenômeno imunológico conhecido há longo tempo na literatura como “tolerância oral”. A tolerância oral se refere à supressão da
15 reatividade inflamatória sistêmica a um antígeno (proteína) que tenha sido administrada previamente pela via oral. Os mecanismos para a indução de tolerância oral incluem desde a inativação de linfócitos T reativos com o antígeno até a geração de linfócitos T reguladores na mucosa intestinal capazes de regular a reatividade inflamatória sistêmica ao antígeno
20 administrado. Como todas as doenças auto-imunes são inflamatórias, a modulação da inflamação resulta em melhora na evolução da doença (Faria, AMC & Weiner, HL. (2006) Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. Clinical and Developmental Immunology, 13(2-4): 143-157).

Um outro aspecto importante da indução de tolerância por via da mucosa oral assim como da mucosa nasal, é que a identificação precisa do antígeno alvo do ataque auto-imune não é necessária. Já que o mecanismo de imuno-modulação envolve linfócitos T que regulam a atividade de outras células no sítio da inflamação, foi demonstrado que qualquer antígeno
30 (proteína) expresso nesse sítio inflamatório pode ser utilizado para indução da tolerância oral ou nasal porque a redução da reatividade inflamatória a esse antígeno atinge outras reatividades na vizinhança num processo conhecido

como “supressão cruzada” ou “bystander suppression”. Esse processo permitiu, então, modular condições inflamatórias não necessariamente auto-imunes tais como a aterosclerose, a isquemia cardíaca (Frenkel et al, 2009), o acidente vascular cerebral – AVC (Frenkel et al, 2003) e a doença de Alzheimer (Frenkel et al, 2005) pela administração oral ou nasal de proteínas sabidamente presentes nos respectivos sítios inflamatórios (vascular, cardíaco e cerebral) (Maron R, Sukhova G., Faria AMC, Hoffmann E, Mach F, Libby P, Weiner HL. (2002) Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*, 106: 1708-1714; Frenkel D, Maron R, Burt DS, Weiner HL. (2009) Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse modelo of Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(9):2423-2433; Frenkel D, Pachori AS, Zhang L, Dembinsky-Vaknin A, Farfara D, Petrovic-Stojkovic S, Dzau VJ, Weiner HL. (2005) Nasal vaccination with troponin reduces specific T cell respsnes and improve heart function in myocardial ischemia-reperfusion injury. *International Immunology*, 21(7):817-829; Frenkel D, Huang Z, Maron R, Koldzic DN, Hancock WW, Moskowitz MA, Weiner HL. (2003) Nasal vaccination with myelin oligodendrocyte glycoprotein reduces stroke size by inducing IL-10-producing CD4+ T cells. *Journal of Immunology*, 171(12):6549-55).

Um antígeno (proteína) utilizado nesses experimentos foi a Hsp65 que mostrou-se capaz, quando administrada por via oral ou nasal, de reduzir a reatividade inflamatória e a formação de placas ateroscleróticas na aorta de camundongos geneticamente propensos ao desenvolvimento da aterosclerose (Maron et al, 2002).

A proteína de choque térmico 65 é uma das proteínas importantes na manutenção da integridade celular cuja expressão aumenta em células submetidas ao estresse. Por isto mesmo, ela está presente em altas concentrações nos processos inflamatórios sendo uma excelente candidata como proteína alvo de imuno-modulação em processos inflamatórios onde não existem antígenos alvo conhecidos como a aterosclerose, a doença de Crohn (e a colite experimental) ou mesmo em doenças claramente auto-imunes onde

os alvos são conhecidos mas o processo inflamatório também envolve a presença dessa proteína (como a esclerose múltipla, a artrite, a diabetes, etc). A Hsp65 faz parte de uma família de proteínas (todas conhecidas como Hsp) que são expressas constitutivamente (em níveis mais baixos que aqueles observados durante a inflamação) nas células eucariotas e nas procariotas, onde tem um papel importante em eventos de manutenção celular. As Hsp estão entre as proteínas mais bem conservadas durante a evolução sendo que a Hsp65 de *Mycobacteria* tem 60-70% de homologia com a Hsp60 humana. Isto permite que elas sejam utilizadas em diferentes espécies com efeitos semelhantes, como comprovado anteriormente estudando o efeito modulador da Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis* na aterosclerosis experimental em camundongos (Maron et al, 2002).

Outro aspecto importante da imuno-modulação induzida pela administração oral de antígenos (proteínas) é a descrição feita pelo nosso grupo de que a maneira mais eficaz para induzir tal modulação é a administração oral contínua da proteína relevante. Essa administração contínua foi obtida pela oferta de mamadeiras contendo o antígeno diluído em água (em concentração conhecida) como única fonte de líquido para animais experimentais. Camundongos assim testados beberam essa solução de forma contínua ao longo do dia e a concentração total administrada pôde ser calculada ao final do dia. Essa forma de administração (lenta e gradual) demonstrou-se muito mais eficaz que a administração da mesma dose da proteína por via oral em uma única vez ao dia. A eficácia desse método foi comprovada em um modelo experimental de esclerose múltipla (encefalomielite auto-imune experimental) (Faria, AM; Maron, R; Ficker, SM; Slavin, AJ; Spahn, T; Weiner, HL. (2003) Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity*, 20(2): 135-145).

Tendo em vista esses dados prévios, na presente invenção foi testado o efeito da administração oral contínua (diluição na mamadeira) de *Lactococcus lactis* produtores (na forma secretada ou citoplasmática) de Hsp65 de

Mycobacterium leprae na colite experimental em camundongos. As vantagens da utilização de bactérias lácticas expressando proteínas Hsp são: a) como as Hsp não são um antígeno específico de uma doença inflamatória mas estão presentes em abundância em focos inflamatórios em geral, elas são candidatas

5 únicas para o tratamento de condições inflamatórias em geral; b) a garantia de que os antígenos Hsps não conteriam lipopolissacarídeo (LPS, um ativador do sistema imune inato); ao contrário das Hsps até então produzidas c) como bactérias lácticas permanecem no intestino por cerca de 48 horas, essa forma de administração oral de Hsps facilitaria a indução de tolerância oral e, por

10 outro lado, também facilitaria a sua interrupção quando essa administração não fosse mais necessária. d) Bactérias Lácticas liberando proteína Hsp65 por 48 horas permitem o desenvolvimento de uma formulação medicamentosa para o tratamento de doenças inflamatórias de fácil uso, pois poderá ser administrada com largos intervalos de tempo e ainda não agredirá a mucosa estomacal,

15 como ocorre com os antiinflamatórios presentes no mercado.

Num comentário publicado recentemente, Luis Bermudez-Humaran cita vários trabalhos que demonstraram a eficiência do *Lactococcus lactis* como vetor vivo para a liberação de proteínas com propriedades terapêuticas (Bermudez-Humaran LG (2009) *Lactococcus lactis* as a vector for mucosal

20 delivery of therapeutic proteins. Human Vaccines, 5(4): 264-267). O *Lactococcus lactis*, de fato, tem sido usado como carreador de uma grande variedade de proteínas principalmente de origem bacteriana e viral (como HPV-16 E7, NSP4, L7/L12 de *Brucella abortus*, GroEL) usando o sistema NICE de expressão. O objetivo desses estudos tem sido invariavelmente a produção de

25 vacinas de mucosa, ou seja, a criação de novos agentes que estimulem a resposta inflamatória do sistema imune contra infecções. Nosso objetivo, com o *L. lactis* produtor de Hsp65, é exatamente o oposto: imunomodular às respostas inflamatórias em doenças não infecciosas e, para isto, as heat-shock proteins teriam um papel diferenciado. Por outro lado, o mesmo *L. lactis* tem

30 sido utilizado também como carreador de citocinas (como IFN-tau, IL-12 ou IL-10, por exemplo) pela via oral. *Lactococcus lactis* produtores de IL-10, por exemplo, apresentaram efeitos benéficos na colite e na alergia experimentais

em camundongos (Lothar Steidler, Wolfgang Hans, Lieven Schotte, Sabine Neirynck, Florian Obermeier, Werner Falk, Walter Fiers, Erik Remaut; (2000) Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting Interleukin-10 Science 25 August 2000: Vol. 289. no. 5483, pp. 1352 – 1355; Frossard CP, Steidler L, Eigenmann PA (2007) Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. Journal of Allergy Clinical Immunology, 119(4): 952-958).

Um estudo clínico de fase I está em andamento testando os efeitos de *L. lactis* produtor de IL-10 em pacientes com doença de Crohn (Baat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E., Remon JP et al (2006) A phase I clinical Trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 4: 754-759). No caso desses estudos, o objetivo é semelhante ao que pretendemos mas a estratégia muito diferente. A administração oral de citocinas moduladoras (como a IL-10), seja na forma solúvel ou expressa por *L. lactis*, teria um efeito direto sobre o sistema imune de mucosas. No entanto, esse efeito seria exógeno e efêmero na inflamação desaparecendo logo que a proteína deixasse de ser administrada. A estratégia que utilizamos com o *L. lactis* produtor de Hsp65 seria ativa, direcionada e duradoura. A indução de tolerância oral à proteína Hsp65 seria capaz de gerar células T reguladoras (Treg) produtoras de citocinas imunomoduladoras (IL-10 e outras como TGF-beta) endógenas, seletivamente liberadas nos sítios inflamados (para onde as células Treg migrariam). Como o processo seria endógeno e ativo, os mecanismos de imunomodulação persistiriam por todo o período em que a inflamação existir.

O documento PI0705784-9A2- **Usos de uma Composição Contendo um Biofármaco Expressando a Proteína de Choque Térmico Hsp65 de Micobactérias**- descreve o uso de uma composição de DNA contendo o gene da proteína de choque térmico (heat shock protein – Hsp) de 65 KDa de micobactérias no preparo de um biofármaco para prevenção, tratamento e / ou cura de doenças inflamatórias, infecciosas e / ou fibróticas em seres humanos e animais. Particularmente, o presente pedido destina-se ao emprego do biofármaco na terapia da doença intersticial pulmonar (DIP). Essa patente se

difere da presente invenção pelo fato de não se constituir de vacina viva e de não utilizar bactérias como vetor vacinal.

Outros estudos têm abordado uma estratégia semelhante para a indução de tolerância oral como recentemente publicado pelo grupo de Rottiers (Huibregtse IL, Snoeck V, Creus AD, Braat H, Jong EC, van Deventer JH, Rottiers P. (2007) Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* secreting ovalbumin. *Gastroenterology*, 133: 517-528). Esses pesquisadores mostraram que *Lactococcus lactis* expressando a proteína ovalbumina são agentes eficientes para a indução da supressão da resposta imune à ovalbumina quando esta é utilizada para a imunização sistêmica. Embora a estratégia seja semelhante, a metodologia de expressão de ovalbumina pelo *L. lactis* descrita é diferente. Um outro fator fundamental que diferencia nosso estudo desse apresentado por Huibregtse e colaboradores é que eles utilizam um antígeno específico para a indução de tolerância oral a esse antígeno (ovalbumina). A utilização do método proposto por esse estudo para o tratamento de doenças auto-imunes ou inflamatórias exigiria que o antígeno alvo da inflamação fosse identificado e expresso no vetor incorporado ao *L. lactis* para cada doença em questão. Como algumas doenças inflamatórias e mesmo auto-imunes têm múltiplos antígenos alvo os quais nem sempre são conhecidos, a tarefa se tornaria difícil e dispendiosa. O grande avanço da presente invenção é demonstrar que a identificação de um alvo específico não é necessária e que a Hsp65 pode funcionar como antígeno universal das condições inflamatórias patológicas a serem tratadas pelo método da indução de tolerância por via oral. A expressão de Hsp65 pelo *L. lactis* torna essa metodologia segura (por se tratar de um probiótico), eficiente (por se tratar da administração de um antígeno liberado de forma contínua no intestino) e multifuncional (por conter uma proteína comprovadamente abundante em sítios inflamatórios em geral). Por outro lado, essa supressão não afetaria processos inflamatórios anti-infecciosos já que os patógenos possuem outros produtos ativadores de linfócitos que em geral se sobrepõem ao efeito estimulador das Hsps presentes nos focos infecciosos.

Breve descrição das figuras:

Figura 1: Imunodeteção da rHsp65 a partir de culturas dos clones de *L. lactis* pCYT: Hsp65. (A) Representação esquemática do vetor de expressão XIES para a produção de rHsp65 intracelular. (B) Controle: proteína Hsp65 purificada produzida em *E. coli*. PM: padrão de peso molecular BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen). C: fração citoplasmática. S: fração secretada. NI: não induzido. I: induzido. O retângulo em vermelho destaca o fragmento protéico referente à rHsp65. Vinte microlitros de cada amostra foram depositados em cada canaleta. As membranas foram reveladas utilizando-se soro de camundongo anti-Hsp65 (1:1000).

Figura 2: Imunodeteção da rHsp65 a partir de culturas dos clones de *L. lactis* pSEC:Hsp65. (A) Representação esquemática do vetor de expressão XIES para a produção de rHsp65 intracelular. (B) Controle: proteína Hsp65 purificada produzida em *E. coli*. PM: padrão de peso molecular BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen). C: fração citoplasmática. S: fração secretada. NI: não induzido. I: induzido. O retângulo em vermelho destaca o fragmento protéico referente à rHsp65. Vinte microlitros de cada amostra foram depositados em cada canaleta. As membranas foram reveladas utilizando-se soro de camundongo anti-Hsp65 (1:1000).

Figura 3 – Tratamento oral com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 impede o processo inflamatório característico da colite ulcerativa. As lâminas foram coradas com hematoxina e eosina, aumento de 100x. Meio (M17 sem *Lactococcus*), WT (wild type, *L. lactis* selvagem), SEC (*L. lactis* produtores de Hsp65 secretada), CYT (*L. lactis* produtores de Hsp65 citoplasmática). Número de animais por grupo=5 para cada grupo experimental.

Figura 4 - Tratamento oral com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 reduz a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-4 e IFN-gama no cólon de camunodongos com colite ulcerativa. Níveis de (A) IL-4 e (B) IFN-gamma medidas por ELISA em extratos de cólon. Meio (M17 sem *Lactococcus*), WT (wild type, *L. lactis* selvagem), SEC (*L. lactis* produtores de

Hsp65 secretada), CYT (*L. lactis* produtores de Hsp65 citoplasmática). Número de animais por grupo=5 para cada grupo experimental. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA Tukey), $p<0,05$.

Figura 5 - Tratamento oral com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65

reduz o estado de ativação de linfócitos nos linfonodos mesentéricos de camundongos com colite ulcerativa. CD44 expresso em linfócitos T CD4+ ativados efetores (MIF: intensidade média de fluorescência). Meio (M17 sem *Lactococcus*), WT (wild type, *L. lactis* selvagem), SEC (*L. lactis* produtores de Hsp65 secretada). Número de animais por grupo=5 para cada grupo experimental. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA Tukey), $p<0,05$.

Figura 6 - Tratamento oral com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65

aumenta a produção da citocinas anti-inflamatórias IL-10 no cólon de camundongos com colite ulcerativa. Níveis de IL-10 medida por ELISA em extratos de cólon. Meio (M17 sem *Lactococcus*), WT (wild type, *L. lactis* selvagem), SEC (*L. lactis* produtores de Hsp65 secretada), CYT (*L. lactis* produtores de Hsp65 citoplasmática). Número de animais por grupo=5 para cada grupo experimental. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA Tukey), $p<0,05$.

Figura 7 - Tratamento oral com *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65

reduz o número de linfócitos T ativados na lâmina própria de camundongos deficientes para IL-10. CD44 é expresso em linfócitos T CD4+ ativados efetores. Meio (M17 sem *Lactococcus*), WT (wild type, *L. lactis* selvagem), SEC (*L. lactis* produtores de Hsp65 secretada). $n=4$ para cada grupo experimental. O grupo CT é formado de animais mais jovens que ainda não desenvolveram a colite (controle). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA Tukey), $p<0,05$.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção refere-se a obtenção de uma linhagem bacteriana geneticamente modificada (cepa) engenhada para a produção e secreção da proteína Hsp65 livre de LPS. Além disso, a invenção ora proposta também
 5 descreve o uso dessa cepa e composições farmacêuticas contendo a mesma na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias.

Construção de linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de Hsp65 de *M. leprae*

As linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de Hsp65 de *M.*
 10 *leprae* foram construídas a partir da amplificação da ORF Hsp 65 de *M. leprae* presente no plasmídeo pcDNA3: Hsp 65, utilizando-se a enzima Accuprime™ Pfx DNA polimerase (Invitrogen) e os primers que se seguem, contendo os sítios de restrição para NsiI e EcoRI:

Iniciador “forward” da forma secretada (sítio de restrição para a enzima *NsiI*
 15 sublinhado):

5' CCATGCATCAGCCAAGACAATTGCGTACG 3'

Iniciador “forward” da forma citoplasmática (sítio de restrição para a enzima *NsiI* sublinhado):

5' CCATGCATGCCAAGACAATTGCGTACG 3'

20 Iniciador “reverse” tanto da forma secretada quanto da citoplasmática (sítio de restrição para a enzima *EcoRI* sublinhado):

5' CCGAATTCTCAGAAGTCCATACCACCC 3'

Os dois fragmentos amplificados, correspondentes às sequências codificadoras da forma citoplasmática e secretada de *Hsp65*, foram clonados
 25 no vetor pCR®-Blunt II-TOPO®, gerando assim os plasmídeos intermediários pTP:c*Hsp65* (citoplasmático) e pTP:s*Hsp65* (secretado).

Estes plasmídeos foram então utilizados para transformar células de *E. coli* TOP10 eletrocompetentes. A seleção de colônias de *E. coli* recombinantes

foi realizada em meio LB ágar contendo canamicina. Dez colônias transformadas com cada construção (citoplasmática ou secretada) foram escolhidas aleatoriamente, inoculadas em meio seletivo líquido e incubadas à 37° C por 18 horas. Essas culturas foram então utilizadas para fazer uma cultura estoque, em glicerol, de cada possível clone e para a realização da extração dos plasmídeos recombinantes.

O DNA plasmidiano foi extraído através do método de lise alcalina (Sambrook et al., 1989) e utilizado como molde para confirmar a clonagem do inserto através de uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos da ORF *Hsp65* de *M. leprae*. Todos os dez clones de cada construção foram confirmados como sendo portadores do inserto correspondente à ORF *Hsp65* (1626 pb). Os clones apresentando o fragmento correspondente ao inserto citoplasmático e os apresentando o fragmento correspondente ao inserto secretado receberam a denominação de pTP:c*Hsp65* e pTP:s*Hsp65*, respectivamente.

Após a confirmação da presença dos insertos nos vetores, os fragmentos correspondentes aos insertos *Hsp65* citoplasmático e *Hsp65* secretado extraídos dos clones pTP:c*Hsp65* e pTP:s*Hsp65* foram subclonados no sistema de expressão XIES (Xylose-Inducible-Expression-System), onde são utilizados os vetores de expressão p*XylIT*:CYT:*nuc* e p*XylIT*:SEC:*nuc* extraídos de linhagens de *E. coli* 83 e 84 (Miyoshi, A., Jamet, E., Commissaire, J., Renault, P., Langella, P. and Azevedo, V. (2004) A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 239, 205-212).

Para a subclonagem da ORF *Hsp65* nos vetores de expressão p*XylIT*:CYT:*nuc* e p*XylIT*:SEC:*nuc*, inicialmente foi realizada a extração desses plasmídeos a partir das linhagens de *E. coli* 83 e 84, através do método de lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Em seguida, foi realizada uma reação de digestão enzimática com as enzimas *NsiI* e *EcoRI*. Os fragmentos de DNA correspondentes aos vetores p*XylIT*:CYT (3244 pb) e p*XylIT*:SEC (3316 pb), desprovidos da sequência codificadora da nuclease de *S. aureus* (*nuc*; 511 pb), foram purificados com o Kit GFX (Amersham Biosciences). A concentração e a

pureza dos produtos purificados foram então estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose à 1%.

Os produtos digeridos e purificados correspondentes ao inserto *Hsp65* e aos vetores *pXylT:CYT* e *pXylT:SEC* foram submetidos a uma reação de
5 ligação com a enzima T4 DNA polimerase (Invitrogen).

O produto de cada reação de ligação (*pXylT:CYT:Hsp65* e *pXylT:SEC:Hsp65*) foi usado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10. Dez colônias transformadas com cada construção, selecionadas em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 10 µg/mL de
10 cloranfenicol, foram inoculadas em 5,0 mL de meio LB suplementado com 10 µg/mL de cloranfenicol e mantidas a 37° C por aproximadamente 18 horas sob agitação. Foi feita uma cultura estoque em glicerol (1 mL da cultura + 1mL de glicerol 80%) de cada clone e estes foram armazenados a -70° C. A partir destes clones foi realizada a extração dos plasmídeos.

Os plasmídeos extraídos *pXylT:CYT:Hsp65* e *pXylT:SEC:Hsp65* foram
15 aplicados em uma reação de PCR com os iniciadores já descritos, seguida de digestão enzimática com *Nsil* e *EcoRI*, com o objetivo de confirmar a presença da ORF *Hsp65*. Os plasmídeos foram então submetidos a reações de sequenciamento de DNA (Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA
20 sequencing with chain-terminating inhibitors, *Biotechnology*. 1992;24:104-8).

As seqüências nucleotídicas obtidas através do sequenciamento dos plasmídeos *pXylT:CYT:Hsp65* e *pXylT:SEC:Hsp65* foram analisadas utilizando-se o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no NCBI e demonstraram que os insertos correspondem à seqüência codificadora do
25 gene *Hsp65* de *M. leprae* (Escore “e-value” = 0.0) e que estes encontram-se clonados em fase de leitura correta com o sítio de ligação ao ribossomo (RBS) ou com o peptídeo sinal (PS) da proteína *Usp45* de *L. lactis*, respectivamente.

Exemplo 1: Preparo de células *L. lactis* eletrocompetentes

Após o preparo de células eletrocompetentes de *L. lactis* NCDO2118,
30 estas foram transformadas com os plasmídeos *pXylT:CYT:Hsp65* e *pXylT:SEC:Hsp65*, extraídos pelo método de lise alcalina a partir dos clones de *E. coli* TOP10. Os transformantes foram selecionados em placas de Petri

contendo meio M17Glu-Sac ágar suplementado com 10 µg/mL de cloranfenicol. Os clones transformantes foram recuperados e seu DNA plasmidiano foi extraído.

Os plasmídeos extraídos foram aplicados em uma reação de PCR com os iniciadores já com o objetivo de confirmar a obtenção de plasmídeos recombinantes contendo a ORF *Hsp65*.

A presente invenção pode ser melhor compreendida, de forma não limitante, a partir dos seguintes exemplos:

Exemplo 2: Indução da expressão da rHsp65 em *L. lactis*

Uma alíquota de 10 µL da cultura estoque dos clones confirmados de *L. lactis* NCDO2118 (pXylT:CYT:*Hsp65* e pXylT:SEC:*Hsp65*) foi inoculada em meio GM17 suplementado com 10 µg/mL de cloranfenicol. Os inóculos foram mantidos “over-night” à 30° C, sem agitação. Essas culturas foram então diluídas (1:10.000) em meio XM17 ou GM17 (controle negativo da indução) suplementados com 10 µg/mL de cloranfenicol. Uma vez que a cultura alcançou uma densidade óptica (DO_{600nm}) em torno de 1.5, alíquotas da fração celular e do sobrenadante (2 mL) de cada cultura foram coletadas e submetidas à extração protéica.

Extração das frações protéicas, citoplasmática e secretada, dos clones recombinantes de *L. lactis* NCDO2118

Alíquotas de 2 mL das culturas (induzidas e não induzidas) foram centrifugadas a 12.000 x g, 4° C, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi separado do precipitado celular e estes foram tratados separadamente.

O sobrenadante foi filtrado e então adicionou-se 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 100% gelado; ditioneitol (DTT) 10mM e fenil-metil sulfonyl fluoreto (PMSF) 1mM e este foi incubado por uma hora no gelo. Após incubação, foi centrifugado a 12.000 x g, 4° C, por 20 minutos. O precipitado protéico foi então ressuspensão em 60 µL de NaOH 50 mM.

O “pellet” celular foi ressuspensão em 100 µL de solução de Tris-EDTA-lisozima acrescido de PMSF 1 mM e DTT 10mM. Em seguida, foi incubado a 37° C por 30 minutos e, posteriormente, foi adicionado 50µL de SDS 20%.

Ao final da extração, as amostras foram ressuspensas em tampão DTT-LB na proporção de 1:1, aquecidas à 100°C por 5 minutos e estocadas a -20° C.

Exemplo 3- Análise da expressão da rHsp65 produzida por *L. lactis*

O teor de proteína contida nos extratos celular e sobrenadante de *L. lactis* foi aferido pelo **ensaio de Bradford** (Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding; *Anal Biochem* 1976; 72:248-54). As proteínas extraídas foram então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), e transferidas para membranas para posterior imunodeteção por “Western Blotting”. Como controle, foi aplicado no mesmo gel a proteína Hsp65 purificada produzida em *E. coli* (Nanocore Biotecnologia LTDA).

Após a transferência, as membranas foram reveladas através do Kit WesternBreeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection (Invitrogen), utilizando-se soro de camundongo anti-Hsp65 (1:1000), produzido como se segue:

Camundongos BALB/c foram imunizados subcutâneamente com 50 µg da proteína rHsp65 purificada de *Escherichia coli* misturada com adjuvante incompleto de Freud (Sigma) na proporção 1:1. Os animais receberam três doses dessa mistura a cada 15 dias (dias 15, 30 e 45). O soro foi coletado do plexo orbital por meio de uma pipeta Pasteur de vidro no dia 0 e no dia 50. Finalizado o experimento, os animais foram sacrificados com sedação prévia seguida de deslocamento cervical.

As análises de imunodeteção da rHsp65 produzida pelos clones pCYT:Hsp65 (Figura 1) e pSEC:Hsp65 (Figura 2) confirmam a capacidade de produção da proteína recombinante por *L. lactis*.

A rHsp65 produzida pelo clone pCYT:Hsp65 ficou retida dentro da célula, o que está de acordo com o esperado, já que o vetor de expressão pXyIT:CYT não possui peptídeo sinal para a exportação da proteína. Nenhum sinal do antígeno recombinante foi detectado nos extratos das culturas não induzidas (Figura 1).

As análise de expressão do antígeno pelo clone pSEC:Hsp65 demonstrou que a eficiência de secreção (isto é, a razão entre a quantidade de proteína observada no meio extracelular e no conteúdo intracelular) foi de aproximadamente 50%, como pode ser observado pela comparação da intensidade das proteínas detectadas nestas duas frações (Figura 2). O fragmento protéico observado na fração citoplasmática corresponde ao precursor da proteína (PS_{Usp45}::Hsp65) que provavelmente permaneceu associado ao envelope celular.

Quantificação da produção da rHsp65 produzida em L. lactis

A produção de rHsp65 de *M. leprae* produzida pelo clone pSEC:Hsp65 foi quantificada pelo método de Bradford utilizando-se lisozima como padrão. Foi feita a dosagem de proteínas totais do sobrenadante da cultura induzida e da cultura não induzida. A concentração de proteínas observadas no sobrenadante da cultura não induzida foi de 93 µg/L e no da cultura induzida foi de 660 µg/L. Uma vez que a única diferença entre as proteínas presentes no sobrenadante da cultura não induzida e induzida é a presença da rHsp65, pode-se concluir que 567 µg/L do antígeno estão sendo secretados para o meio extracelular. É importante notar que essa concentração diz respeito a uma alíquota de 2 mL de cultura induzida. Sendo assim, em 1 mL há 283,5 mg/L; o que por sua vez foi obtido por precipitação em cerca de 50 µL (concentrado 40X). Por fim, podemos concluir que o total de Hsp65 secretado para o sobrenadante do cultivo celular é de 7,08 mg/L. Como anteriormente mencionado, a eficiência de secreção foi estimada em 50%, logo, podemos concluir que a produção total (presente dentro da célula e no sobrenadante da cultura) de rHsp65 foi de aproximadamente 14,16 mg/L.

Exemplo 4- Teste do Lisado do Amebócito *Limulus* (LAL)

O teste do Lisado do Amebócito do *Limulus* (LAL) foi utilizado para a detecção de endotoxina nas proteínas extraídas da fração citoplasmática e secretada de *L. lactis* selvagem e recombinante, utilizando-se o Kit QCL-1000® (Lonza). Este teste permite a investigação do grau farmacêutico das linhagens a serem utilizadas nos ensaios imunológicos. A constatação da ausência de

impurezas contaminantes nas linhagens garante sua qualidade, segurança e eficácia. A tabela 1 demonstra os resultados obtidos.

TABELA 1: Resultados do ensaio do Lisado do Amebócito do *Limulus* realizado a partir das frações protéicas extraídas das linhagens recombinantes de *L. lactis*

Linhagens	Limite de UE/ μ g aceito	Resultados	
		Media de UE/ μ g obtida	Final
<i>L. lactis</i> pCYT:Hsp65 C I	< 0,1	0,00881	A
<i>L. lactis</i> pCYT:Hsp65 C NI	< 0,1	0,00501	A
<i>L. lactis</i> pCYT:Hsp65 S I	< 0,1	0,00458	A
<i>L. lactis</i> pCYT:Hsp65 S NI	< 0,1	0,00641	A
<i>L. lactis</i> pSEC:Hsp65 C I	< 0,1	0,00192	A
<i>L. lactis</i> pSEC:Hsp65 C NI	< 0,1	0,00542	A
<i>L. lactis</i> pSEC:Hsp65 S I	< 0,1	0,00137	A
<i>L. lactis</i> pSEC:Hsp65 S NI	< 0,1	0,00205	A
<i>L. lactis</i> selvagem C	< 0,1	0,01119	A
<i>L. lactis</i> selvagem S	< 0,1	0,00225	A

A: Aprovado; **C:** Fração celular; **S:** Fração secretada; **I:** Linhagem Induzida; **NI:** Linhagem Não Induzida; **UE/ μ g:** unidades endotoxínicas/micrograma *L. lactis* **pCYT:Hsp65:** Linhagem produtora da forma citoplasmática do antígeno; *L. lactis* **pSEC:Hsp65:** Linhagem produtora da forma secretada do antígeno

Todas as amostras testadas apresentaram concentração de endotoxina abaixo de 0,1 UE/ μ g e, dessa maneira, foram consideradas livres de LPS cumprindo os requisitos estabelecidos pelo FDA (*Food and Drug*

Administration), USP (United States Pharmacopeia) e EP (European Pharmacopoeia). Considerando que *L. lactis* é uma bactéria Gram-positiva e que o LPS está presente somente na parede celular de bactérias Gram-negativas, os resultados observados estão de acordo com o esperado.

5 Exemplo 6- Testes da atividade anti-inflamatória

Nos testes pré-clínicos que fizemos, tratamos camundongos com dois tipos de colite experimental: a) induzida, pela administração de dextrana sulfato de sódio (DSS), um agente químico causador de um quadro de colite agudo com características inflamatórias semelhantes à colite ulcerativa em humanos; 10 b) espontânea, em camundongos geneticamente deficientes em IL-10 que desenvolvem um quadro de colite semelhante à doença de Crohn humana.

Para isso mamadeira contendo meio de crescimento das bactérias (grupo Meio), *L. Lactis* selvagem (grupo WT), *L. lactis* produtores da forma secretada (grupo SEC) ou citoplasmática (grupo CYT) da Hsp65 foram 15 ofertadas ad libitum durante 4 dias consecutivos. Após um intervalo de 10 dias, a indução da colite experimental (modelo de colite ulcerativa em camundongos) foi realizada pela administração de DSS a 1,5%, oferecido na mamadeira, como única fonte líquida por 7 dias.

O tratamento prévio com o *L. lactis* secretor de Hsp65 aboliu 20 completamente (100% de inibição) a perda de peso que acompanha a colite experimental), melhorou drasticamente os parâmetros clínicos e histológicos da doença) e impediu o processo inflamatório no intestino grosso (Figura 3) dos camundongos tratados com DSS. As citocinas inflamatórias típicas da colite ulcerativa (IL-4 e IFN-gama) foram inibidas e a frequência de linfócitos T CD4+ 25 efetores (CD44+) nos linfonodos mesentéricos foram reduzidos pela administração de *L. lactis* produtor de Hsp65 (Figura 4 e 5). O aumento da citocina imuno-moduladora IL-10 nos extratos de cólon de camundongos tratados com *L. lactis* produtor de Hsp65 indica que mecanismos imuno-moduladores locais geralmente relacionados à indução de tolerância oral foram 30 desencadeados pelo tratamento (Figura 6).

Testamos também o tratamento com *L. lactis* produtor de Hsp65 em camundongos 129 Sv/Ev geneticamente deficientes em IL-10 que desenvolvem colite espontânea (semelhante à doença de Crohn humana) a partir de 6 semanas de idade . Para isso a mamadeira contendo meio de crescimento das

5 bactérias (grupo Meio) *L. Lactis selvagem* (grupo WT) ou *L. lactis produtores da forma secretada* (grupo SEC) da Hsp65 foram ofertadas *ad libitum* durante 4 dias consecutivos aos camundongos deficientes para IL-10 que desenvolvem enterocolite espontânea. Quando os animais atingiram a idade de 12 semanas, esses foram sacrificados e estudados. Nesse modelo experimental, obtivemos

10 até o momento alguns resultados preliminares (com poucos animais ainda) que mostram um efeito benéfico do *L. lactis* produtor de Hsp65 tanto melhorando os parâmetros clínicos da doença como o aumento do comprimento dos vilos do cólon, por exemplo quanto reduzindo a frequência de linfócitos T CD4+ ativados efetores (CD44+) na lâmina própria do intestino dos camundongos

15 deficientes de IL-10 com 12 semanas de idade (Figura 7).

REIVINDICAÇÕES

- 1- **Cepa recombinante de bactéria láctica**, caracterizada por apresentar a sequência codificadora (ORF; open reading frame) de uma proteína de choque térmico (Hsp) livre de LPS.
- 2- **Cepa recombinante de bactéria láctica**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser preferencialmente do gênero *Lactococcus sp.*
- 3- **Cepa recombinante de bactéria láctica**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela proteína de choque térmico ser preferencialmente Hsp65 livre de LPS.
- 4- **Cepa recombinante de bactéria láctica**, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pela proteína Hsp65 livre de LPS ser expressa na forma secretada ou citoplasmática.
- 5- **Cepa recombinante de bactéria láctica**, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizada por ser utilizada como imunomoduladora no tratamento e prevenção de doenças inflamatórias e auto-imunes.
- 6- **Composição farmacêutica**, caracterizada por compreender cepa recombinante de bactéria láctica produtora de proteínas de choque térmico (Hsp) livre de LPS, citoplasmática ou secretada e ao menos um excipiente farmacêuticamente aceitável.
- 7- **Composição farmacêutica**, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pela cepa recombinante de bactéria láctica ser preferencialmente do gênero *Lactococcus sp.*
- 8- **Composição farmacêutica**, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pela proteína de choque térmico ser preferencialmente Hsp65 livre de LPS.
- 9- **Composição farmacêutica**, de acordo com as reivindicações 6 a 8, caracterizada por ser utilizada como imunomoduladora no tratamento e prevenção de doenças inflamatórias e auto imunes.
- 10- **Composição farmacêutica**, de acordo com as reivindicações 1 a 9, caracterizada por ser administrada por via oral.

FIGURAS

***L. lactis* NCDO2118 (pXylT:CYT:Hsp65)**

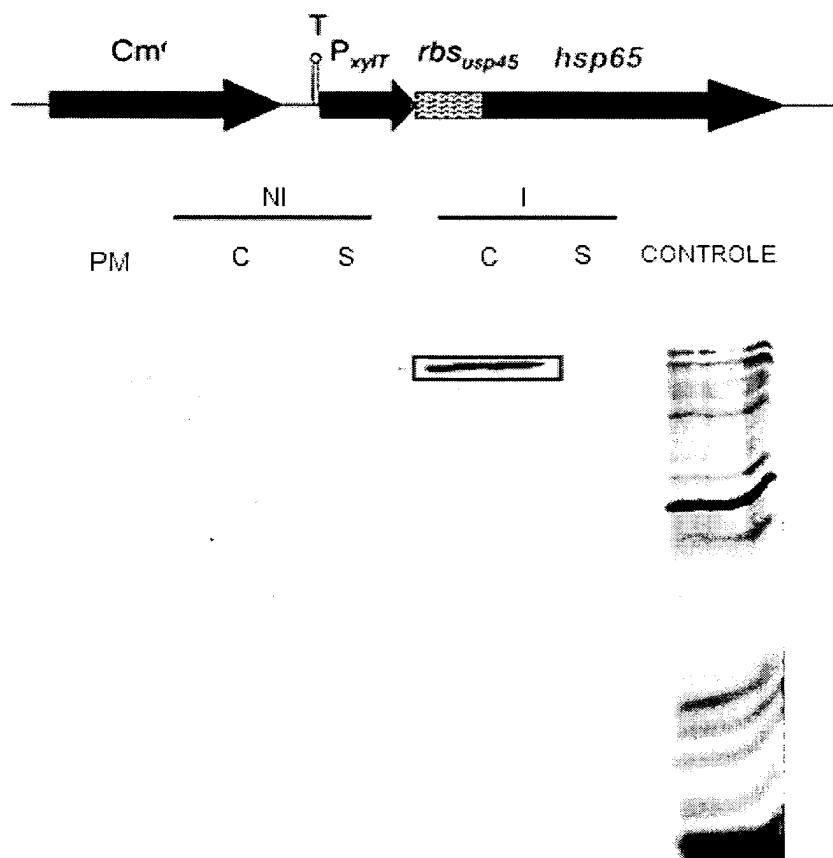


Figura 1

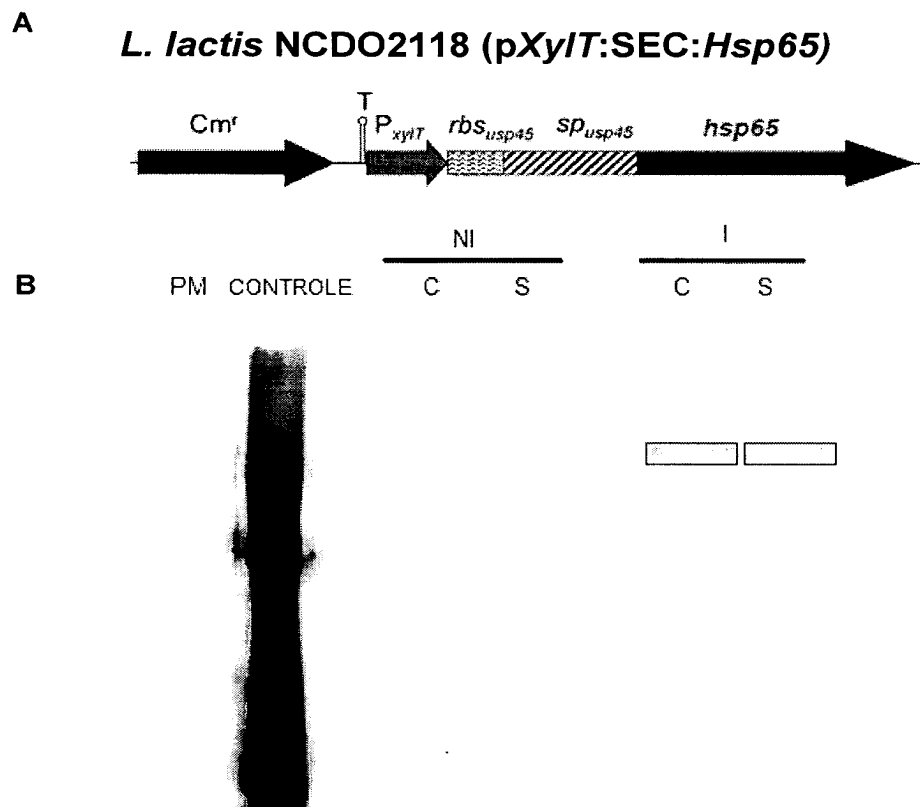


Figura 2

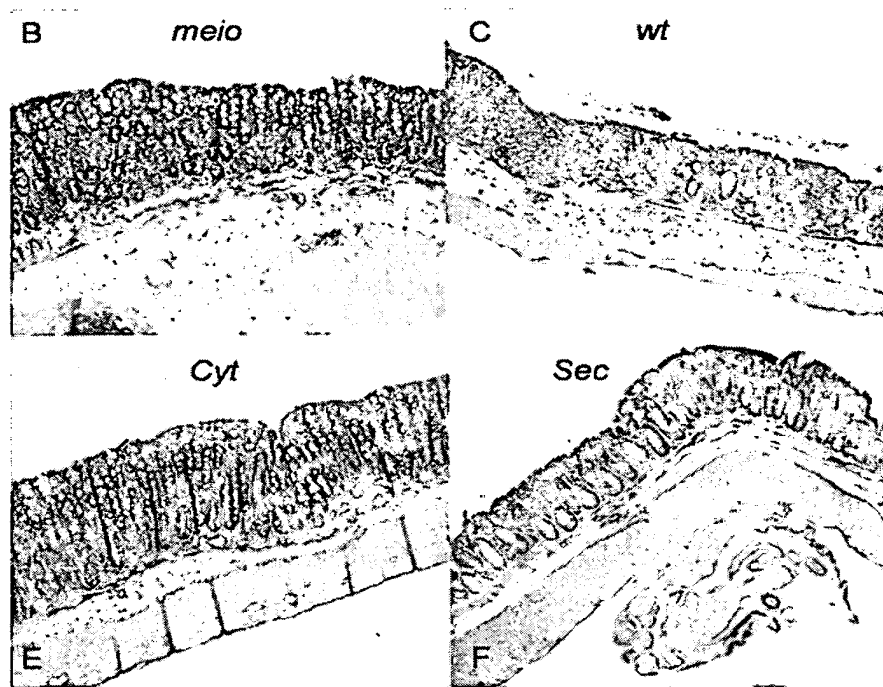


Figura 3

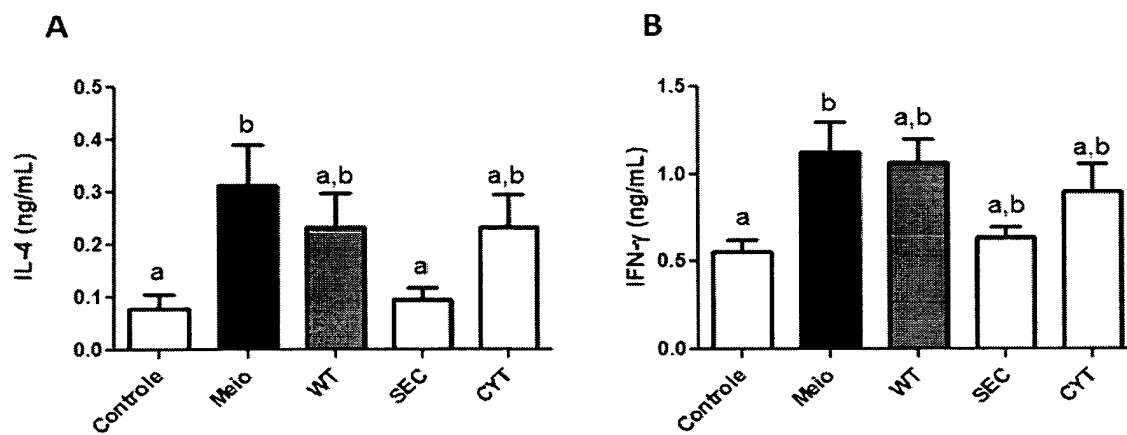


Figura 4

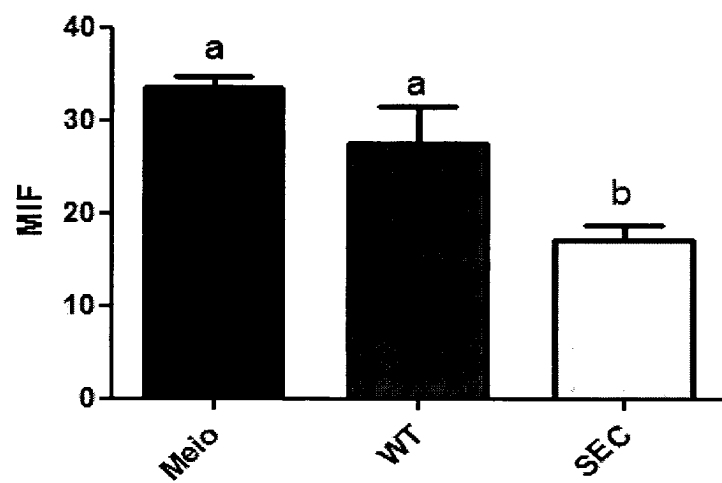


Figura 5

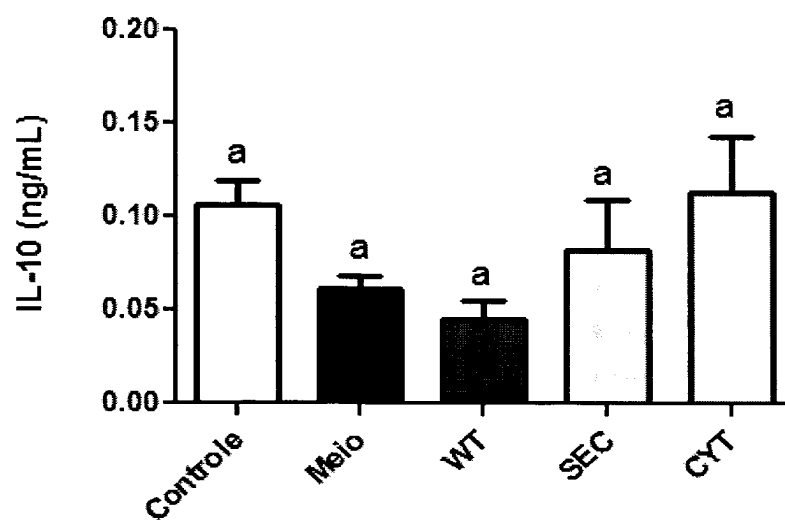


Figura 6

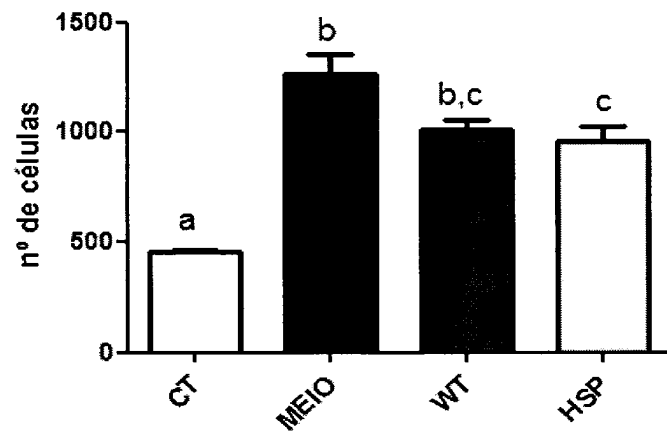


Figura 7

RESUMO

Imunomodulação Através de Cepa Bacteriana Recombinante

A presente invenção refere-se a obtenção de uma linhagem bacteriana geneticamente modificada (cepa) engenhada para a produção e secreção da
5 proteína Hsp65 livre de LPS. Além disso, a invenção ora proposta também descreve o uso dessa cepa e composições farmacêuticas contendo a mesma na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias.