



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

CARTA PATENTE Nº PI 0707102-7

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

**(21) Número do Depósito:** PI 0707102-7

**(22) Data do Depósito:** 07/03/2007

**(43) Data da Publicação Nacional:** 19/04/2011

**(51) Classificação Internacional:** C12N 1/36; A61K 39/10.

**(30) Prioridade Unionista:** US 60/780,827 de 10/03/2006; US 60/817,430 de 30/06/2006.

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA

**(73) Titular:** INSTITUT PASTEUR DE LILLE. Endereço: 1, rue du Professeur Calmette, Bolte Postale 245, Lille Cedex, FRANÇA(FR), F-59019; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM). Endereço: 101 RUE DE TOLBIAC, F-75654 PARIS CEDEX 13 FRANÇA, FRANÇA (FR), F-75654

**(72) Inventor:** NATHALIE MIELCAREK; ANNE-SOPHIE DEBRIE; DOMINIQUE RAZE; JULIE BERTOUT; CAMILLE LOCHT.

**(87) Publicação PCT:** WO 2007/104451 de 20/09/2007

**Código de Controle:** C7F89553884AC172 8239A91E21E574B7

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 07/03/2007, observadas as condições legais. Patente concedida conforme ADI 5.529/DF, que determina a alteração do prazo de concessão.

**Expedida em:** 31/05/2022

Assinado digitalmente por:

**Alexandre Dantas Rodrigues**

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

## “COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA”

### CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a uma linhagem mutante de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo. A linhagem mutante atenuada de *Bordetella* pode ser usada em uma composição imunogênica ou em uma vacina, para o tratamento ou a prevenção de infecção por *Bordetella*. O uso da linhagem atenuada de *Bordetella* para a fabricação de uma vacina ou composições imunogênicas, bem como métodos para proteger os mamíferos contra infecção por *Bordetella*, também fazem parte da invenção.

### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO E TÉCNICAS ANTERIORES RELACIONADAS

[002] *Pertussis* é ainda a principal causa de morte no mundo, e sua incidência está aumentando até mesmo em países com alta cobertura vacinal. Embora grupos de pessoas com idades diversas estejam suscetíveis, ela é mais grave em bebês, novos demais para serem protegidos por meio das vacinas atualmente disponíveis.

[003] Coqueluche ou *pertussis* é uma doença grave na infância, responsável por altas taxas de mortalidade antes da introdução de vacinas efetivas, na segunda metade do século XX. O sucesso destas vacinas levou à opinião de que a doença está essencialmente sob controle, embora 200.000 a 400.000 mortes ao redor do mundo ligadas à *Pertussis* ainda tenham sido registradas anualmente, e a doença ainda alcança a 6ª posição entre as causas de mortalidade devido a agentes infecciosos [1]. Embora mais frequente em países em desenvolvimento, a doença está reaparecendo também nos países desenvolvidos [2,3], incluindo os EUA, onde a incidência aumentou cinco vezes nos últimos vinte anos [4]. De forma inesperada, a epidemiologia de *pertussis* mudou nos países com alta cobertura vacinal, onde casos de adolescentes e adultos com *pertussis* estão aumentando progressivamente [5]. Isto,

provavelmente, é devido à diminuição progressiva da imunidade mediada por vacina durante a adolescência. Muitas vezes atípica e, por essa razão, de diagnóstico difícil, geralmente *pertussis* não é uma ameaça de vida em adultos e, em muitos casos, permanece imperceptível. No entanto, adultos infectados constituem um reservatório importante para transmissão da doença às crianças muito novas, jovens demais para serem vacinadas e, portanto, em risco de desenvolver doença grave associada com altas taxas de mortalidade.

[004] A vacinação para *Pertussis* usualmente começa aos dois meses de idade, e a proteção completa exige pelo menos três imunizações com um a dois meses de intervalo. Portanto, bebês não estão completamente protegidos antes dos 6 meses de idade, com o uso das vacinas atualmente disponíveis. Para reduzir a incidência de *pertussis* em grupos muito jovens e com idade mais vulnerável, a imunização precoce, possivelmente no nascimento, seria bastante desejável. No entanto, numerosos estudos em humanos e em modelos animais têm sugerido que o sistema imune neonatal é muito imaturo para induzir, de forma efetiva, a imunidade protetora induzida pela vacina [6,7]. Especialmente para a produção de IFN- $\gamma$ , indicativo de uma resposta Th1, que é essencial para o desenvolvimento de imunidade protetora contra *pertussis* [8], parece ser substancialmente reduzida em humanos recém-nascidos, em comparação às crianças mais velhas ou em adultos [9]. Isso se reflete pelo fato de que quantidades significantes de IFN- $\gamma$  específico para o antígeno são somente produzidas após alguns meses (6 meses ou mais) em crianças vacinadas com vacinas para *pertussis*, especialmente com vacinas acelulares (aPV) [10].

[005] Infecção natural com *Bordetella pertussis* tem sido considerada, há muito tempo, como forte indutora da imunidade mais duradora, a qual diminui de intensidade mais tarde do que a imunidade induzida pela vacina [5, 11]. Além disso, a infecção com *B. pertussis* induz moderadamente a resposta

imune tipo Th1 específica para o antígeno, mesmo em crianças muito jovens (tão jovens quanto um mês de idade) [12]. Estas observações sugerem que vacinas vivas, aplicadas por rota nasal para imitar o máximo possível a infecção natural, podem ser alternativas atraentes sobre as vacinas atualmente disponíveis.

[006] Existem muitas composições de vacinação para tratar infecções por *Bordetella* conhecidas na técnica. No entanto, estas composições imunogênicas não são usadas para tratar crianças recém-nascidas, ou em casos em que a rápida imunidade protetora é necessária.

[007] Dessa forma, a patente francesa FR 0206666 divulga linhagens vivas de *Bordetella*, que foram criadas de forma deficiente em pelo menos duas toxinas selecionadas de PTX, DNT, AC e TCT. Esta patente divulga a superexpressão de um gene *AmpG* endógeno, pela adição de um promotor forte e adição de 11 aminoácidos terminais do gene *AmpG* de *E. coli*.

[008] Mielcarek *et al*, *Vaccine* (2006; 24S2: S2/54-S2-55) divulga a linhagem atenuada de *Bordetella pertussis* de PTX<sup>-</sup>, DTN<sup>-</sup> e TCT<sup>-</sup> para uso na imunização de camundongos. Esta referência divulga que, para redução da produção da citotoxina traqueal, o gene *AmpG* deve ser superexpresso. No entanto, por avaliação posterior, os autores perceberam que pela superexpressão do gene *AmpG*, há um aumento na citotoxina traqueal e não uma diminuição, como se acreditava originalmente.

[009] Mielcarek *et al* em *Advance Drug Delivery Review* 51 (2001) páginas 55-69 divulga que vacinas vivas podem induzir respostas sistêmicas e de mucosa, quando administradas por rotas oral ou nasal.

[010] Roduit *et al* em *Infection and Immunity* (julho de 2002; 70(7): 3521-8) descreve vacinação em neonatais e bebês, com linhagens mutantes de *Bordetella* com uma composição DTP.

[011] Mattoo *et al*, em *Frontiers of Bioscience* 6, e168-e186 (2001), sugerem substituição do gene endógeno *AmpG* de *Bordetella* pelo gene

*AmpG* de *E. coli*, que resultou em uma diminuição na quantidade de TCT produzido.

[012] Dessa forma, a técnica anterior ainda que divulgue vários tipos de composições para vacinação, falha ao endereçar o problema de fornecer uma vacina ou composição imunogênica que possa fornecer proteção a um recém-nascido antes dos seis meses. Além disso, a técnica anterior falha em divulgar um imunogênico ou uma vacina que forneça rápida imunidade protetora contra uma infecção por *Bordetella*. A técnica anterior também falha em divulgar uma composição imunogênica ou uma vacina que forneça rápida imunidade protetora contra uma infecção por *Bordetella*, dito aumento de imunidade protetora ao longo de pelo menos dois meses após a vacinação.

[013] Portanto, é um objetivo da presente invenção superar as deficiências da técnica anterior.

[014] Outro objetivo da presente invenção é produzir uma vacina candidata atenuada ou composição imunogênica, por meio da atenuação genética de uma linhagem de *Bordetella*, como *B. pertussis* ou *B. parapertussis*, para diminuir a patogenicidade, ao mesmo tempo mantendo a habilidade em colonizar e induzir a imunidade protetora.

[015] Outro objetivo da presente invenção é produzir uma vacina ou composição imunogênica que induz a proteção em recém-nascidos após uma única administração intranasal, que é superior à proteção fornecida pela atual aPV.

[016] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer proteção contra infecção por *Bordetella parapertussis*, bem como *Bordetella pertussis*, que não foi vista após vacinação com aPV.

[017] Outro objetivo da presente invenção é induzir forte imunidade protetora em recém-nascidos contra a infecção por *Bordetella*.

[018] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer uma

vacina ou composição imunogênica que induz imunidade de mucosa ou sistêmica.

[019] Outro objetivo da presente invenção é produzir uma linhagem de *Bordetella pertussis* viva, para ser fornecida como uma vacina nasal de dose única no início da vida, chamada BPZE1.

[020] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer uma vacina que pode ser usada não apenas para vacinar recém-nascidos, mas também ser usada em todos os mamíferos, em qualquer idade, no caso de uma epidemia de coqueluche.

[021] Outro objetivo da presente invenção é fornecer uma vacina contra a infecção por *Bordetella*, que induz uma rápida imunidade protetora e/ou aumento de imunidade protetora ao longo de pelo menos dois meses após a vacinação.

[022] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer prevenção ou tratamento contra a infecção por *Bordetella*, que é relativamente baixa em custos de produção.

[023] Estes e outros objetivos são alcançados pela presente invenção, como evidenciados pela descrição da invenção, descrição das realizações preferidas e das reivindicações.

#### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

[024] A presente invenção fornece uma linhagem mutante de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene (*ptx*) mutante de toxina *pertussis*, um gene (*dnt*) dermonecrótico deletado ou mutante de toxina e um gene *AmpG* heterólogo.

[025] Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a uma composição imunogênica, que compreende uma linhagem mutante de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene (*ptx*) mutante de toxina *pertussis*, um gene (*dnt*) dermonecrótico deletado ou mutante de toxina *pertussis*

e um gene *AmpG* heterólogo.

[026] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece uma vacina, que compreende uma linhagem atenuada de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene (*ptx*) mutante de toxina *pertussis*, um gene (*dnt*) dermonecrótico deletado ou mutante de toxina *pertussis* e um gene *AmpG* heterólogo.

[027] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma linhagem atenuada de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo, para a fabricação de uma vacina para a prevenção de uma infecção por *Bordetella*.

[028] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de uma linhagem atenuada de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo, para a fabricação de uma vacina para a indução de uma resposta imune, dirigida preferencialmente para a via Th1 contra dita *Bordetella* atenuada.

[029] Também é fornecido um método de proteção para um mamífero contra a doença causada pela infecção por *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis*, que compreende administrar a dito mamífero com necessidade de tal tratamento, uma linhagem mutante de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo.

[030] Também é parte da presente invenção, um método para fornecer uma rápida imunidade protetora contra infecção por *Bordetella*, que compreende administrar a dito mamífero com necessidade de tal tratamento, uma linhagem mutante de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo.

[031] É ainda outro aspecto da presente invenção, um método

para fornecer uma rápida imunidade protetora contra infecção por *Bordetella*, que compreende administrar a um mamífero com necessidade de tal tratamento, uma linhagem mutante de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante, e um gene *AmpG* heterólogo ou uma vacina que compreende dita linhagem de *Bordetella* mutante, em que dito método fornece, ainda, um aumento em dita imunidade protetora ao longo de pelo menos dois meses após a vacinação.

[032] É ainda outro aspecto da presente invenção, o uso de uma linhagem mutante de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo, para a preparação de uma vacina multivalente (isto é, uma vacina para prevenção ou tratamento de infecções causadas por diferentes patógenos) para tratar doenças respiratórias.

[033] O uso de uma linhagem atenuada de *Bordetella* da invenção, para administração em mamíferos com necessidade de uma rápida imunidade protetora contra uma infecção por *Bordetella*, em que dita imunidade protetora aumenta ao longo de pelo menos dois meses após administração, também é parte da presente invenção.

[034] Um método para fornecer uma resposta de mucosa e uma resposta sistêmica para tratar ou proteger contra infecções por *Bordetella* em mamíferos é ainda outro aspecto da presente invenção.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[035] A Fig. 1 é um gráfico de barras que ilustra o presente TCT em sobrenadantes da cultura de BPSM e BPZE1, expresso como média de nM/OD<sub>540nm</sub> ( $\pm$  desvio padrão) de 3 culturas separadas para cada linhagem.

[036] A Fig. 2 é uma análise *immunoblot* da produção de PTX nos sobrenadantes da cultura de BPSM (linha 1) e BPZE1 (linha 2). Os marcadores de tamanho *Mr* são expressos em kDa e fornecidos na margem esquerda.

[037] A Fig. 3 é uma análise *Southern-blot* do *locus* do *dnt* em BPSM (linha 1) e BPZE1 (linha 2). Os comprimentos dos marcadores de tamanho estão indicados em pares de base (bp) e estão mostrados na margem esquerda.

[038] A Fig. 4 é um gráfico que ilustra as taxas de crescimento de BPSM (linhas pretas) e BPZE1 (linhas pontilhadas) na cultura líquida.

[039] A Fig. 5 são micrografos de elétron representando o crescimento de BPSM (esquerda) e BPZE1 (direita) no meio de cultura por 24 h.

[040] A Fig. 6 é um gráfico que ilustra a adesão *in vitro* de BPSM (colunas pretas) e BPZE1 (colunas brancas) para células A549 pulmonares epiteliais humanas (esquerda) e células J774 similares a macrófagos de murino (direita). Os resultados são expressos como médias das porcentagens da bactéria de ligação relativa à presente bactéria no inóculo de três experimentos diferentes.

[041] A Fig. 7 é um gráfico que ilustra a colonização no pulmão por BPSM (linhas pretas) e BPZE1 (linhas pontilhadas) de camundongo adulto infectado por via intranasal com  $10^6$  CFU de BPZE1 ou BPSM. Os resultados são expressos como CFUs médios ( $\pm$  desvio padrão) de três a quatro camundongos por grupo e representam dois experimentos separados. \*,  $P = 0,004$ .

[042] A Fig. 8 são fotografias de uma análise histórica de pulmões de camundongos adultos infectados com BPZE1 (painel superior) ou BPSM (painel do meio) comparados com controles em PBS (painel inferior). Uma semana após a infecção, os pulmões foram removidos de forma asséptica e fixados em formaldeído. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, e examinados por microscopia de luz.

[043] A Fig. 9 são gráficos que ilustram a proteção contra *B. pertussis* em camundongos adultos (a) e filhotes (b) ou *B. paraptussis* em

filhotes de camundongos (d). Camundongos imunizados com BPZE1, aPV ou PBS (naive) foram desafiados com BPSM (a e b) ou *B. parapertussis* (d), e as contagens CFU dos pulmões foram determinadas 3 h (barras brancas) ou 7 dias (barras pretas) depois. Os resultados são expressos como CFUs médios ( $\pm$  desvio padrão) de três a quatro camundongos por grupo e representam dois experimentos separados. (b, \*,  $P = 0,009$ ; d, \*,  $P = 0,007$ ) (c) contagens CFU 3 h após desafio com BPSM em camundongos adultos vacinados com BPZE1 ou aPV, comparados aos controles. Os resultados obtidos de três experimentos separados são expressos como porcentagens de CFUs de cada camundongo relativo à média de CFUs no grupo não imunizado do mesmo experimento.

[044] A Fig. 10 são gráficos de barra que ilustram as respostas imunes induzidas por imunização com BPZE1 ou aPV. (a) titulações de anti-FHA IgG(H+L) e (b) razões de IgG1/IgG2a antes (barras brancas) ou 1 semana após desafio com BPSM (barras pretas) em camundongos imunizados com BPZE1 ou aPV, comparados aos controles. (c) IFN- $\gamma$  para razões de IL-5 produzidos por esplenócitos com FHA-, PTX- ou ConA-estimulados de camundongos vacinados 2 meses antes com BPZE1 (barras pretas) ou aPV (barras brancas), comparados aos controles (barras cinzas). Anticorpos e citocinas foram medidos em camundongos individuais e os resultados estão expressos como valores médios ( $\pm$  desvio padrão) para 4 camundongos por grupo testado em triplicata.

[045] A Fig. 11 é a sequência de aminoácidos da toxina *pertussis* (SEQ ID NO:1) (proteína S1 ativada por ilhota). Os primeiros 34 aminoácidos são a sequência sinal, enquanto os aminoácidos 35 a 269 são da cadeia madura.

[046] A Fig. 12 é a sequência de aminoácidos da toxina dermonecrótica (SEQ ID NO:2).

[047] A Fig. 13 é a sequência de aminoácidos de AmpG de *Bordetella pertussis* (SEQ ID NO:3).

[048] A Fig. 14 é a sequência de aminoácidos de AmpG de

*Escherichia coli* (SEQ ID NO:4).

**DESCRIÇÃO DAS REALIZAÇÕES PREFERIDAS DA PRESENTE INVENÇÃO**

[049] Como usado no presente pedido, a abreviação “PTX” refere-se à toxina *pertussis*, que sintetiza e secreta uma toxina de ribosilação de ADP. O PTX é composto de seis polipeptídeos S1 a S5, a porção enzimaticamente ativa é chamada S1. O PTX tem uma sequência sinal com 34 aminoácidos, enquanto a cadeia madura consiste de 35 a 269 aminoácidos. O PTX é o fator mais virulento expresso por *B. pertussis*. A porção A destas toxinas exibe atividade ADP-ribosiltransferase e a porção B media a ligação da toxina aos receptores das células hospedeiras e a translocação de A para o seu local de ação (57).

[050] Como usado no presente pedido, a abreviação “DNT” refere-se à toxina dermonecrótica *pertussis*, que é uma toxina instável ao calor que induz lesões localizadas em camundongos e outros animais de laboratório quando é injetada intradermicamente. Ela é letal para os camundongos quando é injetada intravenosamente em doses baixas (58 a 61). O DNT é considerado um fator de virulência para a produção de atrofia turbinada em rinite atrófica de suínos (62,63).

[051] Como usado no presente pedido, a abreviação “TCT” refere-se à citotoxina traqueal, que é um fator de virulência sintetizado por *Bordetellae*. O TCT é um fragmento de peptídeoglicano e tem a habilidade de induzir a produção de interleucina-1 e óxido nítrico sintase. Ele tem a habilidade de causar estase dos cílios e tem efeitos letais nas células epiteliais respiratórias.

[052] O termo “mamífero” abrange qualquer um dos vários animais vertebrados de sangue quente da classe Mammalia, incluindo humanos, caracterizados por uma cobertura de pêlos na pele, e nas fêmeas, glândulas mamárias que produzem leite para nutrir os filhotes.

[053] O termo “atenuado” significa uma linhagem de *Bordetella*

menos virulenta e enfraquecida, que é capaz de estimular uma resposta imune e criar imunidade protetora, mas sem causar qualquer enfermidade.

[054] A terminologia “rápida imunidade protetora” significa que a imunidade contra *Bordetella* é conferida em um curto período de tempo após administração da linhagem mutante de *Bordetella* da presente invenção. Por “curto período de tempo” entende-se vacinado e desafiado após uma semana. Mais especificamente, há uma rápida expansão dos linfócitos periféricos específicos para o patógeno, células CD8<sup>+</sup> citotóxicas efectoras (CTLs) e células CD4<sup>+</sup> auxiliares. As células CD4<sup>+</sup> auxiliares induzem a maturação das células B e a produção de anticorpos. Dessa forma, os linfócitos com o *pool* de memória são equilibrados para se proliferarem rapidamente até o momento da infecção subsequente.

[055] O termo “linhagem de *Bordetella*” engloba linhagens de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella bronchiseptica*.

[056] A expressão “infecção por *Bordetella*” significa uma infecção causada por pelo menos uma das três linhagens a seguir: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella bronchiseptica*.

[057] Por “criança” entende-se uma pessoa ou um mamífero entre 6 meses e 12 anos de idade.

[058] O termo “recém-nascido” significa uma pessoa ou um mamífero que tem entre 1 dia e 24 semanas de idade.

[059] O termo “tratamento”, como usado no presente pedido não está restrito à cura de uma doença e à remoção de sua causa, mas particularmente abrange os meios de cura, alívio, remoção ou diminuição dos sintomas associados com a doença de interesse, prevenção ou redução da possibilidade em contrair qualquer doença ou mau funcionamento do organismo hospedeiro.

[060] Os termos “proteção” e “prevenção” são usados no presente

pedido alternadamente e significam o impedimento de uma infecção por *Bordetella*.

[061] “Vacina para profilaxia” significa que a vacina previne contra infecção em futuras exposições à *Bordetella*.

[062] Por “preferencialmente em direção à via Th1” entende-se que a via Th1 é favorecida em relação à via Th2.

[063] O termo “composição imunogênica” significa que a composição pode induzir uma resposta imune e é, então, antigênica. Por “resposta imune” entende-se qualquer reação do sistema imune. Estas reações incluem a alteração na atividade de um sistema imune do organismo, em resposta a um antígeno e pode envolver, por exemplo, produção de anticorpo, indução de imunidade mediada por célula, ativação do complemento ou desenvolvimento de tolerância imunológica.

[064] Mais especificamente, a presente invenção fornece pelo menos uma linhagem mutante tripla de *Bordetella* que pode ser usada como uma composição imunogênica ou uma vacina. Estima-se que pelo menos uma linhagem mutante de *Bordetella*, contenha um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo. O produto do gene *AmpG* heterólogo reduz muito a quantidade de citotoxina traqueal produzida.

[065] A presente invenção não está limitada a apenas triplos mutantes descritos acima. Outras mutações adicionais podem ser realizadas, como mutantes deficientes em adenilato ciclase (AC) (64), mutantes deficientes em lipopolissacarídeos (LPS) (65), hemaglutinina filamentosa (FHA) (66) e qualquer um dos componentes regulados por *bvg* (67).

[066] A linhagem inicial que sofre mutação pode ser qualquer linhagem de *Bordetella*, incluindo *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* e *Bordetella bronchiseptica*. Em um aspecto, a linhagem inicial usada para se obter a linhagem mutante de *Bordetella* é *B. pertussis*.

[067] A construção de uma linhagem mutante de *Bordetella* inicia-se com a substituição do gene *AmpG* de *Bordetella* na linhagem, pelo gene *AmpG* heterólogo. Qualquer gene *AmpG* heterólogo pode ser usado na presente invenção. Estes incluem aquelas bactérias gram-negativas que liberam quantidades muito pequenas de fragmentos de peptídeoglicano no meio, por geração. Exemplos de bactérias gram-negativas incluem, mas não se limitam a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Legionella* e similares.

[068] Pela substituição do gene *AmpG* de *Bordetella* pelo gene *AmpG* heterólogo, a quantidade de citotoxina traqueal (TCT) produzida na linhagem resultante expressa menos que 1% de atividade residual de TCT. Em outra realização, a quantidade de toxina TCT expressa pela linhagem resultante está entre 0,6% a 1% de atividade residual de TCT, 0,4% a 3% de atividade residual de TCT ou 0,3% a 5% de atividade residual de TCT.

[069] PTX é o principal fator de virulência, responsável pelos efeitos sistêmicos das infecções por *B. pertussis*, bem como um dos principais antígenos protetores. Devido às suas propriedades o gene *ptx* natural é substituído por uma versão mutante, de forma que a porção S1 enzimaticamente ativa codifica uma toxina enzimaticamente inativa, mas as propriedades imunogênicas da toxina pertussis não são afetadas. Isto pode ser realizado pela substituição da arginina (Arg), na posição 9 da sequência, pela lisina (Lys) (R9K). Além disso, um ácido glutâmico (Glu) na posição 129 é substituído por uma glicina (Gly).

[070] Outras mutações podem ser feitas também, como aquelas descritas na patente US 6.713.072, incorporada no presente pedido como referência, bem como qualquer outra mutação conhecida, capaz de reduzir a atividade da toxina a níveis indetectáveis. A troca alélica é inicialmente usada para deletar o operon *ptx* e, então, inserir a versão mutante.

[071] Finalmente, o gene *dnt* é então removido da linhagem de *Bordetella* usando-se troca alélica. Além da remoção total, a atividade enzimática pode ser também inibida por uma mutação pontual. Já que a DNT é constituída por um domínio de ligação do receptor na região N-terminal e um domínio catalítico na parte C-terminal, uma mutação pontual no gene *dnt* para substituir Cys-1305 por Ala-1305 inibe a atividade enzimática da DNT (68). O DNT foi identificado como uma importante toxina em *Bordetella bronchiseptica* e exibe atividade letal sob injeção de pequenas quantidades (26).

[072] Além da troca alélica para inserir o gene *ptx* mutante e o gene *dnt* inibido ou deletado, o quadro aberto de leitura de um gene pode ser interrompido pela inserção de uma sequência genética ou plasmídeo. Este método também está contemplado na presente invenção.

[073] A linhagem mutante tripla da presente invenção é chamada BPZE1 e foi depositada na Coleção Nacional de Culturas de Microorganismos (CNCM) em Paris, França, em 9 de março de 2006, sob número CNCM I-3585. As mutações introduzidas na BPZE1 resultam em atenuação drástica, mas permitem que a bactéria colonize e persista. Dessa forma, em outra realização, a presente invenção fornece BPZE1, que pode induzir imunidade de mucosa e imunidade sistêmica quando administrada. Em outro aspecto, a BPZE1 é administrada por via intranasal.

[074] As linhagens mutantes de *Bordetella* da presente invenção podem ser usadas em composições imunogênicas. Tais composições imunogênicas são úteis para causar uma resposta imune, tanto uma resposta ao anticorpo como, preferencialmente, uma resposta de célula T em mamíferos. De forma vantajosa, a resposta da célula T é tal que para que proteja um mamífero contra infecção por *Bordetella* ou contra suas consequências.

[075] As linhagens mutantes de *Bordetella* da presente invenção podem ser usadas como linhagens vivas ou linhagens destruídas quimicamente

ou pelo calor, nas vacinas ou em composições imunogênicas. Em um aspecto, as linhagens vivas são usadas para administração nasal, enquanto as linhagens destruídas quimicamente ou pelo calor podem ser usadas para administração sistêmica ou de mucosa.

[076] A composição imunogênica pode compreender, ainda, um excipiente ou carreador farmacologicamente adequado e/ou veículo, quando usada para administração sistêmica ou local. Os veículos farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não se limitam a soluções tampão fosfato salino, água destilada, emulsões como uma emulsão em óleo/água, vários tipos de soluções estéreis de agentes umectantes e similares.

[077] As composições imunogênicas da invenção também podem compreender adjuvantes, isto é, qualquer substância ou composto capaz de promover ou aumentar uma resposta mediada por célula T, e particularmente, resposta imune mediada por CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> contra o princípio ativo da invenção. Adjuvantes como peptídeos muramyl, como MDP, IL-12, fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, Alum e/ou Montanide® podem ser usados nas composições imunogênicas da presente invenção.

[078] É apreciado pelos técnicos no assunto que os adjuvantes e as emulsões nas composições imunogênicas sejam usados, quando linhagens mutantes de *Bordetella* tratadas quimicamente ou pelo calor são usadas em vacinas ou composições imunogênicas.

[079] As composições imunogênicas da invenção compreendem, ainda, pelo menos uma molécula que tem um efeito profilático contra uma infecção por *Bordetella* ou efeitos prejudiciais da infecção por *Bordetella*, como um ácido nucléico, uma proteína, um polipeptídeo, um vetor ou uma droga.

[080] A composição imunogênica da invenção é usada para produzir uma resposta imune de célula T em um hospedeiro em que a composição é administrada. Todas as composições imunogênicas descritas

acima podem ser injetadas em um hospedeiro por diferentes rotas: injeções subcutânea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.) ou intravenosa (i.v.); administração oral e administração intranasal ou inalação.

[081] Quando formulada para injeção subcutânea, a composição imunogênica ou vacina da invenção, preferencialmente, compreende entre 10 a 100  $\mu\text{g}$  da linhagem de *Bordetella* por dose de injeção, mais preferencialmente de 20 a 60  $\mu\text{g}$ /dose, especialmente em torno de 50  $\mu\text{g}$ /dose, em uma única injeção.

[082] Quando formulada para administração intranasal, a linhagem de *Bordetella* é administrada em uma dose de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^6$  bactérias, dependendo do peso e idade do mamífero que a recebeu. Em outro aspecto, uma dose de  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^6$  pode ser usada.

[083] As linhagens mutantes de *Bordetella* da presente invenção podem ser usadas como uma vacina atenuada para proteção contra futuras infecções por *Bordetella*. Sob esse aspecto, uma vantagem da presente invenção é que uma única dose pode ser administrada aos mamíferos e a proteção pode durar por pelo menos mais de dois meses, particularmente mais de seis meses. A vacina da presente invenção pode ser administrada aos recém-nascidos e protege contra infecção de coqueluche. Isto é especialmente crucial, já que o coeficiente de fatalidade de infecções por *Bordetella pertussis* é de aproximadamente 1,3% para bebês menores de 1 mês.

[084] Além disso, as vacinas da presente invenção podem ser usadas em mamíferos adultos quando há uma epidemia, ou em idosos com mais de 60 anos, desde que o risco de complicações seja maior que aqueles em crianças ou em adultos saudáveis.

[085] As vacinas podem ser formuladas com excipientes fisiológicos apresentados acima, do mesmo modo que nas composições imunogênicas. Por exemplo, os veículos farmacologicamente aceitáveis incluem,

mas não se limitam a soluções tampão fosfato salino, água destilada, emulsões como uma emulsão em óleo/água, vários tipos de soluções estéreis de agentes umectantes e similares. Adjuvantes como peptídeos muramil, como MDP, IL-12, fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, Alum e/ou Montanide® podem ser usados nas vacinas.

[086] As vacinas da presente invenção são capazes de induzir altas titulações de IgG no soro contra FHA. A análise dos padrões de citocina específicos para o antígeno revelou que a administração com as linhagens mutantes atenuadas de *Bordetella* da presente invenção favoreceram uma forte resposta de Th1.

[087] As vacinas da presente invenção fornecem alto nível de proteção contra uma infecção por *Bordetella*, isto é, um nível de proteção mais alto que 90%, particularmente mais alto que 95%, mais particularmente, mais alto que 99% (calculado 7 dias após a injeção, como detalhado no Exemplo 9). O nível de proteção da vacina que compreende a linhagem BPZE1 alcança mais de 99,999% em comparação aos camundongos não vacinados (naive), pelo menos dois meses após a vacinação.

[088] As vacinas podem ser administradas por injeções subcutânea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.) ou intravenosa (i.v.); administração oral e administração intranasal ou inalação. A administração da vacina é usualmente em uma única dose. Alternativamente, a administração da vacina da invenção é feita em um primeiro momento (vacinação inicial), seguido por pelo menos um reforço (administração subsequente) com a mesma linhagem, composição ou vacina, além de vacinas acelulares ou uma combinação de ambas

[089] Em um aspecto, é realizada a administração intranasal ou inalação das vacinas, cujo tipo de administração é de baixo custo e permite a colonização por linhagens atenuadas da invenção no trato respiratório: no trato

respiratório superior (nariz e passagens nasais, cavidades paranasais e garganta ou faringe) e/ou vias respiratórias (laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos) e/ou pulmões (bronquíolos respiratórios, dutos alveolares, cavidades alveolares e alvéolos).

[090] A administração intranasal é realizada com uma composição imunogênica ou uma vacina sob a forma de solução líquida, suspensão, emulsão, lipossomo, um creme, um gel ou similar, como composição multifásica. Soluções e suspensões são administradas como pastilhas. Soluções podem ser administradas como uma névoa fina de uma garrafa de spray nasal ou de um inalador nasal. Géis são colocados em pequenas seringas contendo a dose necessária para uma aplicação.

[091] A inalação é realizada com uma composição imunogênica ou uma vacina sob a forma de soluções, suspensões e pós; estas formulações são administradas via um aerossol ou um inalador de pó seco. Pós compostos são administrados com insufladores ou sopradores.

[092] O uso das linhagens mutantes de *Bordetella*, que compreendem pelo menos um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo, para a preparação de uma vacina multivalente para tratar doenças respiratórias é ainda outro aspecto da presente invenção. Sob esse aspecto, a linhagem mutante atenuada de *Bordetella* descrita acima, pode ser usada como uma plataforma de expressão heteróloga para carregar antígenos heterólogos à mucosa respiratória. Dessa forma, tais patógenos respiratórios como *Neisseria*, *Pneumophila*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Mycobacteria*, *Influenza* e similares, podem prevenir infecção usando-se a BPZE1 como um carreador.

[093] O uso das linhagens mutantes atenuadas de *Bordetella*, descritas no presente pedido, para a fabricação de uma vacina para o tratamento e prevenção de infecção por *Bordetella* está também incluído na presente

invenção. Sob esse aspecto, a vacina pode ser usada para o tratamento simultâneo ou prevenção de uma infecção por *B. pertussis* e *B. parapertussis*.

[094] O uso da vacina para fornecer uma rápida imunidade protetora no caso de uma epidemia de *pertussis* está também incluído na presente invenção.

[095] O uso da vacina para fornecer uma rápida imunidade protetora, aumentando por pelo menos dois meses após a vacinação, está também incluído na presente invenção.

[096] A vacina ou composição imunogênica também são fornecidas em um kit. O kit compreende a vacina ou composição imunogênica e um folheto de informação que fornece instruções para a imunização.

[097] A presente invenção também se refere a um método para indução de resposta imune mediada por célula T e, particularmente, uma resposta imune mediada por CD4<sup>+</sup> ou resposta imune mediada por CD8<sup>+</sup>, que compreende administrar as linhagens atenuadas de *Bordetella* da invenção em um mamífero não humano ou um mamífero humano.

[098] Um método de proteção de um mamífero contra doença causada pela infecção por *Bordetella*, que compreende administrar a dito mamífero com necessidade de tal tratamento, uma linhagem mutante de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene *ptx* mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo é outra realização da presente invenção. Este método abrange o tratamento ou prevenção de infecções contra *Bordetella pertussis* e/ou *Bordetella parapertussis*. Em um aspecto, a linhagem BPZE1 é usada neste método.

[099] Também está incluído na presente invenção, um método para fornecer uma rápida imunidade protetora contra infecção por *Bordetella*, que compreende administrar a dito mamífero com necessidade de tal tratamento, uma linhagem mutante de *Bordetella*, que compreende pelo menos um gene *ptx*

mutante, um gene *dnt* deletado ou mutante e um gene *AmpG* heterólogo. Em um aspecto, a linhagem BPZE1 é usada neste método.

[0100] Além disso, as linhagens mutantes atenuadas vivas de *Bordetella* da presente invenção induzem a imunidade de mucosa, bem como a imunidade sistêmica. Dessa forma, outro aspecto da invenção também se refere a um método de indução de mucosa e imunidade sistêmica, pela administração de linhagens mutantes atenuadas vivas de *Bordetella* da presente invenção a um mamífero com necessidade de tal tratamento. Em um aspecto, a linhagem BPZE1 é usada neste método.

[0101] Além de seu papel na prevenção e/ou tratamento de infecção por *Bordetella*, a linhagem mutante da invenção pode ser usada como vetor para produzir pelo menos uma sequência de ácido nucléico heterólogo adicional que codifica um RNA (como um RNA *antisense*) ou uma proteína de interesse. Isto significa que a linhagem mutante produz pelo menos uma sequência adicional de ácido nucléico heteróloga, em adição ao gene *AmpG* heterólogo. Em um aspecto, a proteína codificada por pelo menos esta sequência de ácido nucléico heterólogo adicional é uma proteína cuja expressão é desejada no trato respiratório. Em outro aspecto, a proteína de interesse é um antígeno, como um antígeno viral, bacteriano ou um antígeno tumoral, contra o qual uma resposta imune é desejada. Conseqüentemente, a linhagem mutante de *Bordetella* que produz pelo menos uma sequência de ácido nucléico heteróloga adicional pode ser usada como uma vacina. As definições fornecidas acima para a administração da vacina ou composição imunogênica também se aplicam a uma vacina que compreende a linhagem mutante de *Bordetella* que produz pelo menos uma sequência de ácido nucléico heterólogo adicional. Exemplos de proteínas heterólogas são antígenos de patógenos que causam infecções ou doenças associadas ao trato respiratório: poliomielite, gripe (vírus *influenza* da família *Orthomyxoviridae*) ou antígenos de pneumococcus (como

*Streptococcus pneumoniae*).

[0102] Várias realizações da invenção foram descritas. No entanto, deve-se entender que várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e escopo da invenção.

### EXEMPLOS

#### MATERIAIS E MÉTODOS

##### EXEMPLO 1 - LINHAGENS DE *BORDETELLA* E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

[0103] As linhagens de *B. pertussis* usadas neste estudo foram todas derivadas a partir de *B. pertussis* BPSM [13], e *B. parapertussis* é uma linhagem resistente à estreptomicina derivada da linhagem 12822 (gentilmente fornecida pelo Dr. N. Guiso, Institut Pasteur, Paris, França). Todas as linhagens de *Bordetella* foram cultivadas em ágar Bordet-Gengou (BG) (Difco, Detroit, Mich.) suplementado com 1% de glicerol, 20% de sangue de ovelha desfibrinado e 100 µg/ml de estreptomicina. Para testes de adesão celular, *B. pertussis* em crescimento exponencial foi inoculada a uma densidade óptica de 0,15 a 600 nm em 2,5 ml de meio Stainer-Scholte modificado [14], contendo 1 g/l de heptaquis(2,6-di-*o*-metil) β-ciclodextrina (Sigma) e suplementado com 65 µCi/ml de L-[<sup>35</sup>S]metionina mais L-[<sup>35</sup>S]cisteína (NEN, Boston, Mass.) e cultivada por 24 h a 37°C. As bactérias foram então colhidas por centrifugação, lavadas três vezes em tampão fosfato salino (PBS) e resuspensas em RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N.Y.) na densidade desejada.

##### EXEMPLO 2 - CONSTRUÇÃO DE *B. PERTUSSIS* BPZE1

[0104] Para se construir *B. pertussis* BPZE1, o gene *AmpG* de *B. pertussis* foi substituído pelo *AmpG* de *Escherichia coli*, usando-se troca alélica. Um fragmento de PCR denominado *met* e localizado na posição 49.149 a 49.990 do genoma de *B. pertussis* ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/B\\_pertussis/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_pertussis/)), a montante do gene *AmpG* de *B. pertussis*, foi amplificado usando-se oligonucleotídeos A: 5'-TATAAATCGATATTCCTGCTGGTTTCGTTCTC-3' (SEQ ID No:5) e B : 5'-

TATAGCTAGCAAGTTGGGAAACGACACCAC-3' (SEQ ID No:6), e DNA genômico de *B. pertussis* BPSM [13] como um molde. Este fragmento de 634 bp foi inserido no Topo PCRII (InVitrogen Life Technology, Groningen, The Netherlands) e então cortado como um fragmento *Clal-NheI* e inserido no pBP23 [50] digerido por *Clal* e *NheI*, um vetor suicida contendo o gene *AmpG* de *E. coli* com DNA of 618 bp de *B. pertussis* adjacente (da posição 50.474 até 51.092 do genoma de *B. pertussis*) e 379 bp (da posição 52.581 a 52.960 do genoma de *B. pertussis*) na terminação 5' e 3' do *AmpG* de *E. coli*, respectivamente. O plasmídeo resultante foi transferido para *E. coli* SM10 [51], que foi então conjugado com BPSM, e dois eventos sucessivos de recombinação homóloga foram selecionados conforme descrito [52]. Dez colônias individuais foram selecionadas por PCR como a seguir: As colônias foram suspensas em 100 µl de H<sub>2</sub>O, aquecidas por 20 minutos a 95°C, e centrifugadas por 5 min a 15.000 x g. Um µl de sobrenadante foi então usado como molde para PCR, usando-se oligonucleotídeos A e C: 5'-TAAGAAGCAAATAAGCCAGGCATT-3' (SEQ ID No:7) para verificar a presença de *AmpG* de *E. coli* e usando-se oligonucleotídeos D: 5'-TATACCATGGCGCCGCTGCTGGTGCTGGGC-3'(SEQ ID No:8) e E : 5'-TATATCTAGACGCTGGCCGTAACCTTAGCA-3'(SEQ ID No:9) para verificar a ausência do *AmpG* de *B. pertussis*. Uma das linhagens contendo *AmpG* de *E. coli* e desprovida de *AmpG* de *B. pertussis* foi então selecionada e o *lôcus* inteiro do *AmpG* foi sequenciado. Esta linhagem foi então usada para posterior modificação genética.

[0105] Os genes *ptx* foram deletados do cromossomo desta linhagem, conforme descrito [21] e depois substituídos pelo *ptx* mutante que codifica PTX inativo. O fragmento de *EcoRI* contendo o *lôcus* do *ptx* de pPT-RE [16] foi inserido no sítio *EcoRI* de pJQ200mp18rpsI [53]. O plasmídeo resultante foi integrado no cromossomo de *B. pertussis* no *lôcus* do *ptx* por recombinação homóloga após conjugação via *E. coli* SM10. O *lôcus* do *ptx* no cromossomo da linhagem de *B. pertussis* resultante foi sequenciado para confirmar a presença das mutações desejadas. A produção de toxina foi analisada por *immunoblotting*, usando-se uma

mistura de anticorpos monoclonais IB7 [54], específica para as subunidades S1 e 11E6 [55], específica para as subunidades S2 e S3 de PTX.

[0106] Finalmente, o gene *dnt* foi deletado da linhagem resultante de *B. pertussis*, assim como regiões adjacentes ao *dnt* foram amplificadas por PCR, usando-se um DNA genômico de BPSM como molde e oligonucleotídeos F: 5'-TATAGAATTCGCTCGGTTTCGCTGGTCAAG G-3' (SEQ ID No:10) e G: 5'-TATATCTAGAGCAATGCCGATTCATCTTTA-3' (SEQ ID No:11) para a região a montante do *dnt*, e H: 5'-TATATCTAGAGCGGCCTTTATTGCTTTTCC-3' (SEQ ID No:12) e I: 5'-TATAAAGCTTCTCATGCACGCCGGCTTCTC-3' (SEQ ID No:13) para regiões a jusante do *dnt*, como *primers*. Os fragmentos de DNA resultantes de 799-bp e 712-bp foram digeridos com *EcoRI/XbaI* e *XbaI/HindIII*, respectivamente, e ligados usando-se o kit Fast Link (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). O fragmento ligado foi amplificado por PCR usando-se oligonucleotídeos F e I, e o fragmento de PCR de 1505-bp PCR foi então inserido no pCR2.1-Topo (Invitrogen), novamente isolado do plasmídeo resultante como um fragmento *EcoRI* e inserido no sítio exclusivo *EcoRI* de pJQmp200rpsL18. O plasmídeo resultante foi introduzido em *B. pertussis* por conjugação via *E. coli* SM10. A deleção correta do gene *dnt* por troca alélica foi verificada por análise *Southern blot* no DNA genômico de *B. pertussis* digerido por *PvuII*, usando-se fragmento de PCR que corresponde à região a montante do *dnt* como uma sonda. A sonda foi marcada com digoxigenina (DIG), usando-se o kit marcador DIG Easy Hyb (Roche, Meylan, France). O tamanho das bandas de hibridização foram determinados a partir da distância de migração do marcador molecular III de DNA marcado com Dig (Roche). O *locus* de *dnt* na linhagem final, denominada BPZE1 foi sequenciado.

### **EXEMPLO 3 - ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE TCT**

[0107] Para quantificação sensível da produção de TCT, sobrenadantes da cultura de *B. pertussis* cultivados até a fase logarítmica foram coletados, sujeitos à extração de fase sólida [15] e derivados com

fenilisotiocianato (PITC, Pierce). Os derivados feniltiocarbamil (PTC) foram separados por HPLC de fase reversa usando-se uma coluna C8 (Perkin Elmer) e detectados a 254 nm. A quantidade de *B. pertussis* PTC-TCT em cada amostra foi determinada pela comparação da área de pico e tempo de eluição com um TCT padrão, processado de maneira idêntica.

#### **EXEMPLO 4 - TESTE DE ADESÃO CELULAR**

[0108] Para análise das propriedades de adesão celular das linhagens de *B. pertussis*, suas taxas de ligação à linhagem celular epitelial pulmonar humana A549 (ATCC n° CCL-185) e a linhagem celular de macrófago de murino J774 (ATCC n° TIB-67) foram medidas como previamente descrito [16].

#### **EXEMPLO 5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

[0109] O procedimento de coloração negativa por gotas simples foi usado, conforme previamente descrito [17] com as modificações a seguir. 20 µl de uma suspensão com aproximadamente 10<sup>9</sup> bactérias/ml foram absorvidos por 2 minutos em formas de grelhas de níquel revestidas com carbono (malha 400 mesh; Electron Microscopy Sciences EMS, Washington, PA). Após 30 segundos de secagem ao ar, as grelhas foram coradas por 2 minutos com 20 µl de ácido fosfotúngstico a 2% (pH7; EMS) e examinados após secagem ao ar sob um microscópio eletrônico de transmissão (Hitachi 7500, Japan) a 60 kvolts e alta resolução.

#### **EXEMPLO 6 - INFEÇÃO E VACINAÇÃO INTRANASAL**

[0110] Fêmeas Balb/C com 3 a 8 semanas foram mantidas sob condições livre de patógenos e todos os experimentos foram realizados de acordo com as Normas da Comissão de Estudos em Animais do Instituto Pasteur de Lille. Os camundongos foram infectados por via intranasal com aproximadamente 4x10<sup>6</sup> bactérias em 20 µl de PBS, e a cinética de CFU nos pulmões foi medida, conforme descrito previamente [18]. Para vacinação com

aPV (Tetravac; Aventis-Pasteur, France), os camundongos foram imunizados por via intraperitoneal (i.p.) com 20% da dose humana e estimulados um mês depois, usando-se a mesma dose.

#### **EXEMPLO 7 - DETERMINAÇÃO DO ANTICORPO**

[0111] Os soros foram coletados e as titulações de anticorpos foram estimadas por testes imunoabsorventes ligados à enzima (ELISA), conforme descrito previamente [18].

#### **EXEMPLO 8 - TESTES DE CITOCINA**

[0112] Células do baço de camundongos individuais foram testadas em diferentes espaços de tempo após imunização para a produção de citocina *in vitro*, em resposta a *B. pertussis* BPSM ( $10^6$  células/ml) destruída pelo calor, 5,0 µg/ml de PTX (purificada de *B. pertussis* BPGR4 [19], conforme previamente descrito [20] e inativada pelo calor a 80°C por 20 minutos), 5,0 µg de hemaglutinina filamentosa (FHA, purificada de *B. pertussis* BPRA [21], conforme previamente descrito [22]), 5 µg/ml de concanavalina A (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) ou meio sozinho como controle. Os sobrenadantes foram removidos das culturas em triplicata após 72 h de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, e as concentrações de IFN-γ e IL-5 foram determinadas por imunoenaios (conjunto BD OptEIA, Pharmingen).

#### **EXEMPLO 9**

##### **INFECCÃO E VACINAÇÃO INTRANASAL: DESAFIO NAS SEMANAS 1, 2, 3 E 4**

[0113] Um modelo de filhote de camundongo (com 3 semanas) [29] foi usado para comparar a eficiência de vacinação com BPZE1 com a vacinação *pertussis* acelular (aPv). Fêmeas de camundongos Balb/C foram infectadas por via intranasal com aproximadamente  $1 \times 10^6$  da linhagem BPZE1 em 20 µl de PBS. Para vacinação com aPV (Tetravac; Aventis-Pasteur, France), os camundongos foram imunizados por via intraperitoneal com 20% da dose humana. Uma, duas, três ou quatro semanas após a vacinação com BPZE1 ou

aPv, os camundongos foram desafiados por via intranasal com a linhagem virulenta de *B. pertussis*, BPSM/bctA-lacZ [53]. A linhagem é derivada de BPSM resistente à gentamicina, que permite a diferenciação com BPZE1 (sensível à gentamicina) em placas de ágar Bordet-Gengou contendo 10µg/ml de gentamicina e 100µg/ml de estreptomicina (BGgs). O grupo controle corresponde aos camundongos naive desafiados com BPSM/bctA-lacZ. Uma semana após a infecção de desafio, os pulmões foram removidos assepticamente, homogeneizados e plaqueados em BGgs para determinação de CFU, conforme previamente descrito[18].

[0114] Os camundongos foram vacinados com BPZE1 ou aPv e desafiados com *B. pertussis* virulenta, em uma, duas, três ou quatro semanas após a vacinação. As contagens CFUs dos pulmões foram determinadas 3 horas ou 7 dias depois. Os resultados são expressos como CFUs médias ( $\pm$  desvio padrão) de três a quatro camundongos por grupo. Os níveis de proteção são calculados para cada infecção de desafio como porcentagens médias de CFUs de cada grupo relativo da média de CFUs no grupo não imunizado, 7 dias após infecção de desafio (Tabelas 2 a 5).

#### **EXEMPLO 10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

[0115] Os resultados foram analisados usando-se o teste t de Student não pareado e o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de Dunn (programa GraphPad Prism), conforme apropriado. As diferenças foram consideradas significantes a  $P \leq 0,05$ .

#### **RESULTADOS**

##### **CONSTRUÇÃO DE *B. PERTUSSIS* BPZE1**

[0116] Três fatores virulentos eram geneticamente intencionados: citotoxina traqueal (TCT), toxina pertussis (PTX) e toxina dermonecrótica (DNT).

[0117] O TCT é responsável pela destruição das células ciliadas na traquéia de hospedeiros infectados [24, 25] e pode, então, estar envolvido na

síndrome da tosse. O TCT é um produto de colapso de peptídeoglicano na parede celular de bactéria Gram-negativa, que geralmente a internaliza no citosol pela proteína transportadora AmpG a ser reutilizada durante a biossíntese da parede celular. O AmpG de *B. pertussis* é ineficiente na internalização de produtos de colapso de peptídeoglicano. Consequentemente, nós substituímos o gene *AmpG* de *B. pertussis* pelo *AmpG* de *E. coli*. A linhagem resultante expressou menos de 1% de atividade residual de TCT (**Fig. 1**).

[0118] O PTX é o principal fator virulento responsável pelos efeitos sistêmicos de infecções por *B. pertussis* e é composto de uma porção enzimaticamente ativa, chamada S1, e uma porção responsável pela ligação aos receptores celulares alvos (para revisão, ver 26). No entanto, este é também um dos princípios antígenos protetores, que nos estimula a substituir os genes *ptx* naturais pela versão mutante, que codifica uma toxina enzimaticamente inativa. Isto foi alcançado pela substituição de (Arg-9) por (Lys) (R9K) e Glu-129 por Gly em S1, dois resíduos chave, envolvidos na ligação do substrato e catálise, respectivamente. A troca alélica foi usada inicialmente para deletar o operon *ptx* e, então, inserir a versão mutante. A presença dos análogos da toxina relevante nos sobrenadantes da cultura de *B. pertussis* foi avaliada por análise *immunoblot* (**Fig. 2**).

[0119] Finalmente, a troca alélica foi usada para remover o gene *dnt* (**Fig. 3**). Embora o papel da DNT na virulência de *B. pertussis* seja incerto, foi identificado como uma importante toxina nas espécies intimamente relacionadas de *Bordetella bronchiseptica* e exibe atividade letal por injeção de pequenas quantidades (para revisão, ver 26).

#### **CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DE B. PERTUSSIS BPZE1**

[0120] Já que algumas alterações genéticas em BPZE1 podem afetar potencialmente a síntese da parede celular bacteriana, o tamanho e a forma, bem como a taxa de crescimento *in vitro* de BPZE1 foi comparada àquela

da linhagem de BPSM parental. A taxa de crescimento de BPZE1 não diferiu daquela de BPSM (**Fig. 4**), e nenhuma diferença na forma ou no tamanho da bactéria foi detectada entre BPZE1 e BPSM, como evidenciado pela análise de microscopia eletrônica (**Fig. 5**). No entanto, a parede celular de BPZE1 pareceu ser consistentemente um pouco mais fina que aquela de BPSM.

[0121] Para determinar se a ausência ou alterações em qualquer uma das toxinas intencionadas em BPZE1 afetam as propriedades de adesão celular de *B. pertussis*, as taxas de ligação de BPZE1 foram comparadas com aquelas de BPSM, usando-se a linhagem celular epitelial pulmonar A549 e a linhagem celular de macrófago de murino J774, como dois modelos celulares frequentemente usados para estudo de adesão de *B. pertussis*. Nenhuma diferença significativa na capacidade de adesão de ambas as linhagens celulares foi observada entre as duas linhagens (**Fig. 6**).

#### **ATENUAÇÃO DE *B. PERTUSSIS* BPZE1**

[0122] Para determinar se as mutações introduzidas em *B. pertussis* BPZE1 resultaram em atenuação, permitindo ainda ao organismo colonizar o trato respiratório, camundongos Balb/C foram infectados por via intranasal com BPZE1 ou BPSM, e a colonização foi acompanhada ao longo do tempo. BPZE1 foi capaz de colonizar e persistir nos pulmões, tanto quanto BPSM (**Fig. 7**). No entanto, não se observou pico de multiplicação constante, 7 dias após a infecção com BPSM em camundongos infectados com BPZE1. Estudos realizados com linhagens mutantes em genes de toxinas individuais indicaram que isto é devido a mutações no locus *ptx* (dados não apresentados). Quando os pulmões foram examinados para mudanças histopatológicas e infiltração inflamatória, a infecção com BPSM induziu fortes infiltrados peribroncovasculares e recrutamento de células inflamatórias, 7 dias após infecção, associada com uma forte hipertrofia das células epiteliais bronquiolares (**Fig. 8**). Ao contrário, nenhuma mudança foi observada em

animais infectados com BPZE1 e a histologia dos camundongos infectados com BPZE1 foi similar àquela dos camundongos controle que receberam PBS ao invés de bactéria. A infecção por BPSM induziu inflamação que durou mais de dois meses (dados não apresentados). Estes resultados indicam que as mutações introduzidas em BPZE1 resultaram em atenuação drástica, mas permitiram que a bactéria colonizasse e persistisse nos pulmões.

**PROTEÇÃO CONTRA DESAFIO COM *B. PERTUSSIS* APÓS VACINAÇÃO INTRANASAL  
COM BPZE1 EM CAMUNDONGOS ADULTOS**

[0123] Para avaliar a proteção oferecida pela BPZE1, o efeito de uma única administração intranasal desta linhagem, para camundongos Balb/C com 8 semanas na colonização subsequente pelo desafio da linhagem tipo selvagem BPSM, foi comparado com aquele de duas imunizações i. p. com 1/5 de uma dose humana de aPV. Este protocolo de imunização com aPV foi descrito como o melhor correlacionado à eficácia da vacina de pertussis em pesquisa clínica humana [27, 28]. Como mostrado pela total ausência de contagens de colônias bacterianas nos pulmões, sete dias após infecção de desafio, uma única administração intranasal de BPZE1 e duas imunizações i.p. com aPV forneceram níveis similares de proteção (**Fig. 9a**). Grande quantidade de bactérias foi encontrada nos camundongos controle que receberam duas injeções de PBS ao invés da vacina.

**PROTEÇÃO CONTRA DESAFIO DE *B. PERTUSSIS* APÓS VACINAÇÃO INTRANASAL COM  
BPZE1 EM FILHOTES DE CAMUNDONGOS**

[0124] Já que os alvos principais de novas vacinas de *pertussis* são bebês novos que não são protegidas com as vacinas atualmente disponíveis, um modelo de filhote de camundongo [29] foi desenvolvido e usado para comparar a eficácia da vacinação com BPZE1 com aquele de vacinação com aPV. Uma única administração nasal de BPZE1 protegeu completamente o filhote de camundongo contra o desafio da infecção (**Fig. 9b**), como também foi observada

a completa ausência de bactérias nos pulmões, uma semana após o desafio. Ao contrário, números substanciais de bactérias permaneceram nos animais vacinados com aPV, uma semana após infecção de desafio. A diferença na quantidade de bactérias entre os camundongos vacinados com BPZE1 e os vacinados com aPV foi estatisticamente significativa, indicando que no modelo de filhote camundongo, uma única administração intranasal com BPZE1 forneceu melhor proteção do que as duas administrações sistêmicas de aPV.

[0125] Além disso, uma forte redução na quantidade de bactérias da linhagem de desafio, 3 horas após administração da imunização dos camundongos com BPZE1 foi consistentemente observada, em comparação aos animais imunizados com aPV (**Fig. 9c**), indicando que a vacinação com BPZE1 reduz a suscetibilidade à infecção pela linhagem de desafio. Este efeito foi observado tanto nos camundongos com 8 semanas como nos filhotes de camundongos. Ao contrário, aPV não teve efeito nas contagens de bactérias, 3 horas após infecção, em comparação aos camundongos controle.

### **PROTEÇÃO CONTRA DESAFIO COM *B. PARAPERTUSSIS* APÓS VACINAÇÃO**

#### **INTRANASAL COM BPZE1**

[0126] Há uma preocupação crescente sobre infecção por *B. parapertussis* em crianças, especialmente nas populações imunizadas [30, 31]. *B. parapertussis* causa uma síndrome mais branda, similar à *pertussis*, cuja frequência é provavelmente maior que a estimada. Além disso, a incidência de infecções por *B. parapertussis* tem aumentado ao longo das últimas décadas, possivelmente devido ao fato de que as vacinas de *pertussis* têm eficácia protetora muito baixa, ou nenhuma eficácia, contra *B. parapertussis* [32, 33]. Ao contrário, a infecção por *B. pertussis* foi recentemente relatada como sendo protetora contra infecções por *B. parapertussis* [34]. BPZE1 foi também avaliada para proteção contra *B. parapertussis*, usando-se o modelo de filhote de camundongo. Enquanto que duas administrações de aPV não forneceram

qualquer proteção contra *B. paraptussis*, como previamente relatado, uma única administração intranasal de BPZE1 forneceu forte proteção, como medido pelo baixo número de contagens de *B. paraptussis* nos pulmões dos camundongos vacinados, 1 semana após o desafio (**Fig. 9d**).

#### **RESPOSTAS IMUNES INDUZIDAS PELA VACINAÇÃO COM BPZE1**

[0127] Embora os mecanismos de imunidade protetora contra infecção por *B. pertussis* não sejam ainda completamente entendidos, claras evidências de um papel para células B e IFN- $\gamma$  foram demonstradas em camundongos [28]. A vacinação tanto com uma dose nasal de BPZE1 ou duas administrações i. p. de aPV induziram altas titulações de IgG no soro contra FHA, o principal antígeno de superfície de *B. pertussis* [35], também presente na aPV (**Fig. 10a**). Seguindo o desafio com *B. pertussis*, respostas anamnésicas positivas foram medidas em animais vacinados com BPZE1 e com aPV, como indicado pelo aumento de titulações de IgG anti-FHA, em comparação às respostas primárias antes da infecção por *B. pertussis*. O exame das taxas de IgG1/IgG2a anti-FHA mostraram que estas taxas foram maiores após a administração de aPV, característica de uma resposta tipo Th2, do que após vacinação com BPZE1 (**Fig. 10b**). Embora o IgG1/IgG2a anti-FHA tenha diminuído após o desafio em camundongos vacinados com aPV, este ainda permaneceu substancialmente mais alto do que nos animais vacinados com BPZE1, após desafio com *B. pertussis*.

[0128] A análise dos padrões de citocina antígeno-específico *B. pertussis* induzida pela vacinação com BPZE1 ou aPV confirmou que a administração com BPZE1 favorece uma resposta tipo Th1 mais forte do que a vacinação com aPV. Isto foi revelado pelo fato que as taxas de IFN- $\gamma$  sobre IL-5 produzidos por esplenócitos estimulados com FHA ou PT, ou com o ativador policlonal ConA foram significativamente maiores nos camundongos vacinados com BPZE1 do que nos camundongos vacinados com aPV (**Fig. 10c**).

**IMUNIDADE PROTETORA DE BPZE1 AO LONGO DO TEMPO (DE 1 A 4 SEMANAS)**

[0129] Como mostrado nas Tabelas 1 a 5 abaixo, enquanto a administração de aPv forneceu proteção limitada (redução de 75% na quantidade de bactérias, comparado aos camundongos não vacinados em 1 semana) contra *B. pertussis*, uma única administração de BPZE1 já forneceu alto nível de proteção (redução de 97,64% na quantidade de bactérias) contra uma infecção de desafio com *B. pertussis* realizada uma semana após a vacinação. Se a infecção de desafio ocorreu duas semanas após a vacinação, o nível de proteção induzido pela BPZE1 alcançou mais de 99,999%, comparado aos camundongos não vacinados e é significativamente superior à proteção induzida pela vacina com aPv (aproximadamente 92% comparado aos camundongos não vacinados). Consequentemente, a eficácia da vacina com BPZE1 contra desafio de *B. pertussis* já é significativa e aumenta pelo menos ao longo de dois meses.

**TABELA 1**

**CINÉTICA DA EFICÁCIA DAS VACINAS CONTRA O DESAFIO COM *B. PERTUSSIS* EM FILHOTES DE CAMUNDONGOS**

| TEMPO ENTRE A VACINAÇÃO E O DESAFIO | TEMPO ENTRE A RECUPERAÇÃO DOS PULMÕES E O DESAFIO | LOG <sub>10</sub> CFU / PULMÕES DE CAMUNDONGOS |                   |                     |
|-------------------------------------|---|--|-------------------|---------------------|
|                                     |   | NAIVE  | VACINADOS COM APV | VACINADOS COM BPZE1 |
| 1 semana                            | 3 horas   | 5,71 ± 0,03                                    | 5,8 ± 0,07        | 5,74 ± 0,01         |
|                                     | 7 dias  | 6,71 ± 0,06                                    | 5,97 ± 0,20       | 4,86 ± 0,35         |
| 2 semanas                           | 3 horas   | 5,77 ± 0,10                                    | 5,60 ± 0,02       | 5,49 ± 0,05         |
|                                     | 7 dias  | 6,49 ± 0,8                                     | 5,31 ± 0,16       | 3,22 ± 0,33         |
| 3 semanas                           | 3 horas   | 6,03 ± 0,11                                    | 5,88 ± 0,04       | 5,33 ± 0,08         |
|                                     | 7 dias  | 6,58 ± 0,09                                    | 5,62 ± 0,11       | 3,14 ± 0,38         |
| 4 semanas                           | 3 horas   | 6,31 ± 0,01                                    | 6,15 ± 0,02       | 5,83 ± 0,05         |
|                                     | 7 dias  | 6,36 ± 0,04                                    | 5,21 ± 0,11       | 1,83 ± 0,46         |

**TABELA 2**

**NÍVEL DE PROTEÇÃO DE CAMUNDONGOS VACINADOS COM APV E COM BPZE1 EM COMPARAÇÃO A CAMUNDONGOS NÃO VACINADOS NA SEMANA 1**

| Camundongos não vacinados              | Número de bactérias nos pulmões | Número médio de bactérias                             |  |                   |
|--|---------------------------------|---|--|-------------------|
| Não vacinados 1                        | 4,7x10 <sup>6</sup>             | 5,36x10 <sup>6</sup>                                  |  |                   |
| Não vacinados 2                        | 3,8x10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 3                        | 8,2x10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 4                        | 4,1x10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 5                        | 6 x10 <sup>6</sup>              |   |  |                   |
|  | Número de bactérias nos pulmões | Porcentagem de bactérias <sup>(1)</sup> remanescentes | Porcentagem média de bactérias remanescentes | Nível de proteção |
| <b>Camundongos vacinados com aPv</b>   |                                 |   |  |                   |
| aPv1                                   | 1,95 x10 <sup>6</sup>           | 36,38   | 25 %   | 75 %              |
| aPv2                                   | 2,9 x10 <sup>6</sup>            | 54,1  |  |                   |
| aPv3                                   | 2,9 x10 <sup>5</sup>            | 5,41  |  |                   |
| aPv4                                   | 3,6 x10 <sup>5</sup>            | 6,72  |  |                   |
| aPv5                                   | 1,2 x10 <sup>6</sup>            | 22,39   |  |                   |
| <b>Camundongos vacinados com BPZE1</b> |                                 |   |  |                   |
| BPZE1-1                                | 3,2 x10 <sup>5</sup>            | 5,97  | 2,36 %                                       | 97,64 %           |
| BPZE1-2                                | 2 x10 <sup>4</sup>              | 0,004   |  |                   |
| BPZE1-3                                | 6 x10 <sup>4</sup>              | 1,12  |  |                   |

[0130] <sup>(1)</sup> Porcentagem de bactérias remanescentes = número de bactérias para cada camundongo específico/ número médio de bactérias de todos os camundongos não vacinados.

**TABELA 3**

**NÍVEL DE PROTEÇÃO DE CAMUNDONGOS VACINADOS COM APV E COM BPZE1 EM COMPARAÇÃO A CAMUNDONGOS NÃO VACINADOS NA SEMANA 2**

| Camundongos não vacinados              | Número de bactérias nos pulmões | Número médio de bactérias                           |  |                   |
|--|---------------------------------|---|--|-------------------|
| Não vacinados 1                        | 5X10 <sup>6</sup>               | 3,34X10 <sup>6</sup>                                |  |                   |
| Não vacinados 2                        | 3,6X10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 3                        | 1,7X10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 4                        | 2,4X10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 5                        | 4 X10 <sup>6</sup>              |   |  |                   |
|  |                                 |   |  |                   |
|  | Número de bactérias nos pulmões | Porcentagem de bactéria <sup>(1)</sup> remanescente | Porcentagem média de bactéria remanescente | Nível de proteção |
| <b>CAMUNDONGOS VACINADOS COM APV</b>   |                                 |   |  |                   |
| aPv1                                   | 9,5 x10 <sup>4</sup>            | 2,84  | 8,11 %                                     | 91,89 %           |
| aPv2                                   | 2,9 x10 <sup>5</sup>            | 8,68  |  |                   |
| aPv3                                   | 1 x10 <sup>5</sup>              | 2,99  |  |                   |
| aPv4                                   | 6,8 x10 <sup>5</sup>            | 20,36   |  |                   |
| aPv5                                   | 1,9 x10 <sup>5</sup>            | 5,69  |  |                   |
| <b>Camundongos vacinados com BPZE1</b> |                                 |   |  |                   |
| BPZE1-1                                | 9,5 x10 <sup>3</sup>            | 2,8 x10 <sup>-3</sup>                               | 1,03 x10 <sup>-3</sup> %                   | 99,999 %          |
| BPZE1-2                                | 450                             | 1,35 x10 <sup>-4</sup>                              |  |                   |
| BPZE1-3                                | 3500                            | 1,05 x10 <sup>-3</sup>                              |  |                   |
| BPZE1-4                                | 500                             | 1,5 x10 <sup>-4</sup>                               |  |                   |

[0131] <sup>(1)</sup> Porcentagem de bactérias remanescentes = número de bactérias para cada camundongo específico/número médio de bactérias de todos os camundongos não vacinados.

**TABELA 4**

**NÍVEL DE PROTEÇÃO DE CAMUNDONGOS VACINADOS COM APV E COM BPZE1 EM COMPARAÇÃO A CAMUNDONGOS NÃO VACINADOS NA SEMANA 3**

| Camundongos não vacinados       | Número de bactérias nos pulmões | Número médio de bactérias                             |  |                   |
|---------------------------------|---------------------------------|---|--|-------------------|
| Não vacinados 1                 | 1,8x10 <sup>6</sup>             | 4,04x10 <sup>6</sup>                                  |  |                   |
| Não vacinados 2                 | 5,75x10 <sup>6</sup>            |   |  |                   |
| Não vacinados 3                 | 4,7x10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 4                 | 3,2x10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 5                 | 4,75 x10 <sup>6</sup>           |   |  |                   |
|                                 | Número de bactérias nos pulmões | Porcentagem de bactérias <sup>(1)</sup> remanescentes | Porcentagem média de bactérias remanescentes | Nível de proteção |
| Camundongos vacinados com aPv   |                                 |   |  |                   |
| aPv1                            | 1,99 x10 <sup>5</sup>           | 4,94  | 11,26 %                                      | 88,74 %           |
| aPv2                            | 6 x10 <sup>5</sup>              | 14,85   |  |                   |
| aPv3                            | 6 x10 <sup>5</sup>              | 14,85   |  |                   |
| aPv4                            | 4,2 x10 <sup>5</sup>            | 10,40   |  |                   |
| Camundongos vacinados com BPZE1 |                                 |   |  |                   |
| BPZE1-1                         | 3640                            | 9,01 x10 <sup>-4</sup>                                | 8,65 x10 <sup>-4</sup> %                     | 99,999 %          |
| BPZE1-2                         | 9720                            | 2,4 x10 <sup>-3</sup>                                 |  |                   |
| BPZE1-3                         | 300                             | 7,43 x10 <sup>-5</sup>                                |  |                   |
| BPZE1-4                         | 340                             | 8,42 x10 <sup>-5</sup>                                |  |                   |

[0132] <sup>(1)</sup> Porcentagem de bactérias remanescentes = número de bactérias para cada camundongo específico/número médio de bactérias de todos os camundongos não vacinados.

**TABELA 5**

**NÍVEL DE PROTEÇÃO DE CAMUNDONGOS VACINADOS COM APV E COM BPZE1 EM COMPARAÇÃO A CAMUNDONGOS NÃO VACINADOS NA SEMANA 4.**

| Camundongos não vacinados              | Número de bactérias nos pulmões | Número médio de bactérias                             |  |                   |
|--|---------------------------------|---|--|-------------------|
| Não vacinados 1                        | 2,1x10 <sup>6</sup>             | 2,36x10 <sup>6</sup>                                  |  |                   |
| Não vacinados 2                        | 2,2x10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 3                        | 3,1x10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 4                        | 2,6x10 <sup>6</sup>             |   |  |                   |
| Não vacinados 5                        | 1,8 x10 <sup>6</sup>            |   |  |                   |
|  |                                 |   |  |                   |
|  | Número de bactérias nos pulmões | Porcentagem de bactérias <sup>(1)</sup> remanescentes | Porcentagem média de bactérias remanescentes | Nível de proteção |
| <b>Camundongos vacinados com aPv</b>   |                                 |   |  |                   |
| aPv1                                   | 2,52 x10 <sup>5</sup>           | 10,68   | 7,76 %                                       | 92,24 %           |
| aPv2                                   | 3,28 x10 <sup>5</sup>           | 13,90   |  |                   |
| aPv3                                   | 1,04 x10 <sup>5</sup>           | 4,41  |  |                   |
| aPv4                                   | 8,4 x10 <sup>5</sup>            | 3,56  |  |                   |
| aPv5                                   | 1,48 x10 <sup>5</sup>           | 6,27  |  |                   |
| <b>Camundongos vacinados com BPZE1</b> |                                 |   |  |                   |
| BPZE1-1                                | 190                             | 8,05 x10 <sup>-5</sup>                                | 7,13 x10 <sup>-5</sup> %                     | 99,999 %          |
| BPZE1-2                                | 0                               | 0   |  |                   |
| BPZE1-3                                | 110                             | 4,66 x10 <sup>-5</sup>                                |  |                   |
| BPZE1-4                                | 320                             | 1,36 x10 <sup>-4</sup>                                |  |                   |
| BPZE1-5                                | 220                             | 9,32 x10 <sup>-5</sup>                                |  |                   |

[0133] <sup>(1)</sup> Porcentagem de bactérias remanescentes = número de bactérias para cada camundongo específico/número médio de bactérias de todos os camundongos não vacinados

### DISCUSSÃO

[0134] *Pertussis* é a primeira doença infecciosa cuja incidência aumentou nos países com alta cobertura vacinal. Esta situação paradoxal mais provavelmente está ligada às mudanças epidemiológicas, observadas desde a introdução maciça de vacinas altamente eficazes. Ao contrário da época pré-vacinação, casos de adolescentes e adultos com *pertussis* estão aumentando com mais frequência. Embora geralmente não seja uma ameaça à vida neste grupo de idade, adultos infectados com *B. pertussis* são um importante reservatório para a infecção de crianças muito novas, novas demais para serem protegidas pela vacinação. A vacinação precoce, possivelmente no nascimento, seria então altamente desejável, mas é um empecilho pela imaturidade do sistema imune de neonatais e bebês. No entanto, o fato de que a infecção natural por *B. pertussis*, até mesmo no início da vida, é capaz de induzir uma forte resposta de Th1 em bebês [12], nos estimulou a desenvolver uma linhagem para vacina com *B. pertussis* atenuada para ser dada por rota nasal como uma alternativa sobre as vacinas atualmente disponíveis.

[0135] Baseado em infecções experimentais de primatas, Huang *et al.* já chegou à conclusão, em 1962, de que a proteção final contra coqueluche provavelmente ocorreu da melhor maneira após a inoculação de *B. pertussis* viva [36]. Em medicina veterinária, linhagens atenuadas de *Bordetella* foram usadas para vacinar cachorros e filhotes de porco contra bordetelose. Uma linhagem atenuada de *Bordetella bronchiseptica* mostrou fornecer forte proteção contra tosse de canil em cachorros [37] após administração nasal. Esta proteção foi observada já em 48h após a vacinação. A vacinação intranasal com *B. bronchiseptica* viva atenuada também mostrou proteção contra rinite atrófica em filhotes de porco com dois dias [38], indicando que vacinas com *Bordetella*, na forma viva atenuada, podem ser altamente ativas em animais recém-nascidos.

[0136] Tentativas anteriores para atenuar *B. pertussis* como

candidata à vacina viva, tiveram sucesso particularmente limitado. Com base na estratégia usada para a correta atenuação de linhagens para vacina com *Salmonella* [39], Roberts *et al.* deletou o gene *aroA* de *B. pertussis* [40]. O mutante *aroA* foi realmente bastante atenuado, mas também perdeu sua capacidade para colonizar o trato respiratório de animais vacinados por via intranasal e induziu imunidade protetora apenas após administrações repetidas de altas doses. Nós tiramos vantagens dos conhecimentos em relação aos mecanismos moleculares da virulência de *B. pertussis* e desenvolvemos a linhagem BPZE1 altamente atenuada. Esta linhagem contém alterações genéticas que levam à ausência ou inativação de três toxinas principais, PTX, TCT e DNT. Ao contrário da mutante *aroA*, esta linhagem foi capaz de colonizar o trato respiratório de camundongos e fornecer proteção completa após uma única administração intranasal. A proteção em camundongos adultos foi irreconhecível em relação àquela induzida por duas administrações de 1/5 de uma dose humana de aPV. Uma diferença importante, no entanto, foi observada em filhotes de camundongos, quando uma única administração de BPZE1 protegeu completamente, enquanto que aPV ofereceu somente proteção parcial. No contexto destas dificuldades para induzir proteção em bebês no início da vida com as vacinas atualmente disponíveis, estes resultados fornecem expectativas para o desenvolvimento de novas estratégias de vacinação que possam ser usadas em crianças novas, possivelmente no nascimento. Além disso, BPZE1 protegeu contra *B. parapertussis*, enquanto que aPV não o fez. Portanto, o uso de BPZE1 poderia ter também um impacto na incidência de coqueluche causada por *B. parapertussis* em bebês.

[0137] Embora a substituição recente da primeira geração de vacinas celulares completas pela nova aPV, em muitos países tem reduzido significativamente reações sistêmicas adversas observadas com vacinas celulares completas, não se aboliu a necessidade de vacinação repetida para

alcançar proteção. Isto torna improvável a obtenção de proteção em crianças muito novas (menores de 6 meses) que apresentam alto risco em desenvolver doença grave. Além disso, o uso difundido de aPV revelou novos problemas inesperados. A administração repetida de aPV pode causar inchaço extensivo no local da injeção [41], o que não foi observado com vacinas celulares completas. Em aproximadamente 5 % dos casos, este inchaço envolve quase o membro todo e dura mais de uma semana. Embora o mecanismo deste inchaço ainda não tenha sido caracterizado, foi proposto ser devido a uma reação de hipersensibilidade de Arthus, causada pelos altos níveis de anticorpo induzidos pela imunização primária [42]. No entanto, poderia estar relacionado à direção de Th2 da resposta imune, quando comparada às vacinas celulares completas, a administração de aPV induz mais citocinas do tipo Th2 em crianças vacinadas [10] e causa um atraso no desenvolvimento de Th1 (Mascart *et al.*, em preparação). A maturação atrasada da função de Th1 foi associada com o risco para atopia em indivíduos predispostos geneticamente [33]. Os dois mecanismos são mutuamente exclusivos. Comparada ao aPV, a resposta imune para administração de BPZE1 é menos influenciada em direção ao braço Th2, e já que BPZE1 é administrada via mucosa, nenhuma reação de inchaço pode ocorrer.

[0138] O uso de bactéria viva atenuada como vacina levantou a questão de biossegurança. Como tal, elas se incluem nas diretrizes e normas para organismos modificados geneticamente, suscetíveis a serem liberados no meio ambiente. Estas normas e diretrizes descrevem diversos objetivos que devem ser seguidos, incluindo identificação de perigo e avaliação de risco ambiental [44]. Patogenicidades potenciais precisam ser consideradas de forma cautelosa, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles infectados com HIV. A biologia natural de *B. pertussis* é particularmente interessante nesta consideração. Embora pertussis em sujeitos infectados com

HIV tenham sido descritos ocasionalmente, é especialmente raro em pacientes com AIDS [45]. Em sua forma geneticamente atenuada, não seria então esperado que *B. pertussis* causasse maiores problemas em crianças infectadas com HIV, especialmente se AIDS grave for um critério de exclusão, como é para muitas vacinas. A colonização de *B. pertussis* é estritamente limitada ao epitélio respiratório, sem disseminação extrapulmonar da bactéria, que naturalmente exclui bacteremia sistêmica da linhagem BPZE1 para vacina. Se, apesar disso, problemas imprevisíveis de segurança ocorrerem, a linhagem para vacina pode facilmente ser eliminada pelo uso de antibióticos de macrolida, como eritromicina, para o qual essencialmente todas os isolados de *B. pertussis* são sensíveis.

[0139] Uma preocupação adicional, como para qualquer vacina viva, é a liberação potencial da linhagem para vacina no meio ambiente e as consequências desta liberação. *B. pertussis* é um patógeno estritamente humano, e não há vetor ou reservatório animal. Além disso, diferente de *B. bronchiseptica*, a sobrevivência de *B. pertussis* no meio ambiente é extremamente limitada [46]. *Pertussis* somente se espalha pela tosse dos indivíduos, e parece não haver transporte assintomático [47]. A coqueluche não pode ser avaliada nos modelos de camundongos usados neste estudo. No entanto, devido à natureza das alterações genéticas em BPZE1, em particular a forte redução de TCT e a inativação genética de PTX, não seria esperado que esta linhagem induzisse coqueluche. A PTX ativa mostrou ser necessária para indução de coqueluche em um modelo de rato com coqueluche, embora o mecanismo não seja conhecido. Se a linhagem para vacina fosse, apesar disso, transmitida para indivíduos não vacinados, isto ocasionaria na pior das hipóteses, um aumento na cobertura vacinal. As consequências de cada um destes perigos potenciais podem ser, portanto, consideradas insignificantes e podem ser facilmente e rapidamente controladas pelo tratamento com

antibióticos, se necessário.

[0140] As vantagens do uso de BPZE1 incluem os custos de produção relativamente baixos, tornando-a especialmente atraente para os países em desenvolvimento, sua forma de administração sem agulha e segura, e seu potencial para induzir imunidade de mucosa, além da imunidade sistêmica. Embora o papel da imunidade de mucosa contra *pertussis* não tenha sido dirigido, de forma surpreendente, o fato de *B. pertussis* ser um patógeno estritamente de mucosa, é provável que respostas imunes possam contribuir significativamente para proteção. Nenhuma das vacinas atualmente disponíveis induz qualquer resposta significativa de mucosa.

[0141] Outras vantagens do uso de BPZE1 na vacinação são:

- a rápida imunidade protetora obtida após uma única dose intranasal de BPZE1, uma vez que a indução da imunidade pode ser detectada 1 semana após a vacinação;
- um aumento da imunidade protetora por pelo menos dois meses após a vacinação, e
- a imunidade protetora completa, uma vez que um nível de proteção de mais de 99,999% é obtido 2 semanas após a vacinação.

[0142] O uso de *B. pertussis* vivos atenuados para vacinação de mucosa oferece ainda outra vantagem. *B. pertussis* pode ser usado para a apresentação de antígenos heterólogos para a mucosa respiratória (para revisão ver 49). O uso de BPZE1 como uma plataforma de expressão heteróloga pode, dessa forma, ser útil para a geração de vacinas multivalentes contra uma variedade de patógenos respiratórios. No entanto, uma vez que a entrega intranasal de BPZE1 também induz fortes respostas sistêmicas, como mostrado tanto pelos altos níveis de anticorpos anti-FHA como pela produção de IFN- $\gamma$  específico para antígeno, ela também pode ser usada para a produção de antígeno para os quais as respostas imunes são desejadas.

[0143] Como a invenção foi descrita em termos de várias realizações preferidas, o técnico no assunto estima que várias modificações, substituições, exclusões e alterações possam ser feitas sem se afastar do escopo desta invenção. Consequentemente, pretende-se que o escopo da presente invenção seja limitado pelo escopo das reivindicações a seguir, incluindo as equivalentes destas.

#### **REFERÊNCIAS**

1. WHO (2004) *The world health report 2004-changing history*, Geneva, WHO.
2. Das P (2002) *Whooping cough makes global comeback*. *Lancet* ii: 322.
3. Tan T, Trindade E, Skowronski D (2005) *Epidemiology of Pertussis*. *Pediatr Infect Dis J* 24: S10-S18.
4. *Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis*. Available : <http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/pert.pdf> via the Internet.
5. Wirsing von König CH, Halperin S, Riffelmann M, Guiso N (2002) *Pertussis of adults and infants*. *Lancet Infect Dis* 2: 744-750.
6. Lewis DB, Yu CC, Meyer J, English BK, Kahn SJ, *et al.* (1991) *Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin-4 and interferon- $\gamma$  production by neonatal T cells*. *J Clin Invest* 87: 194-202.
7. Siegrist CA (2001) *Neonatal and early life vaccinology*. *Vaccine*. 19: 3331-3346.
8. Mills KHG (2001) *Immunity to Bordetella pertussis*. *Microbes Infect* 3: 655-677.
9. Lewis DB, Larsen A, Wilson CB (1986) *Reduced interferon- $\gamma$  mRNA levels in human neonates*. *J Exp Med* 163: 1018-1023.
10. Ausiello CM, Urbani F, La Sala A, Lande R, Cassone A (1997) *Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after*

*primary vaccination in infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines.* Infect Immun 65: 2168-2174.

11. Wirsing von König CH, Postels-Multani S, Bock HL, Schmitt HJ (1995) *Pertussis in adults: frequency of transmission after household exposure.* Lancet 346: 1326-1329.

12. Mascart F, Verscheure V, Malfroot A, Hainaut M, Piérard D, *et al.* (2003) *Bordetella pertussis infection in 2-months-old infants promotes Type 1 T cell responses.* J Immunol 170: 1504-1509.

13. Menozzi FD, Mutombo R, Renauld G, Gantiez C, Hannah JH, *et al.* (1994) *Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis.* Infect Immun 62: 769-778.

14. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y (1983) *Effect of heptakis (2,6-O-dimethyl)-beta-cyclodextrin on the production of pertussis toxin by Bordetella pertussis.* Infect Immun 41: 1138-1143.

15. Cookson BT, Cho H-L, Herwaldt LA, Goldman WE (1989) *Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of Bordetella pertussis.* Infect Immun 57: 2223-2229.

16. Alonso S, Pethe K, Mielcarek N, Raze D, Locht C (2001) *Role of ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during Bordetella pertussis infection.* Infect Immun 69: 6038-6043.

17. Collyn F, Lety MA, Nair S, Escuyer V, Ben Younes A, *et al.* (2002) *Yersinia pseudotuberculosis harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity.* Infect Immun 70: 619-620.

18. Mielcarek N, Cornette J, Schacht AM, Pierce RJ, Locht C, *et al.* (1997) *Intranasal priming with recombinant Bordetella pertussis for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen.* Infect Immun 65: 544-550.

19. Locht C, Geoffroy MC, Renauld G (1992) *Common accessory genes for the Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families*. EMBO J 11: 3175-3183.
20. Sekura RD, Fish F, Manclark CR, Meade B, Zhang YL (1983) *Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase*. J Biol Chem 258: 14647-14651.
21. Antoine R, Locht C (1990) *Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin*. Infect Immun 58: 1518-1526.
22. Menozzi FD, Gantiez C, Locht C (1991) *Interaction of the Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin with heparin*. FEMS Microbiol Lett 62: 59-64.
23. Locht C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F (2001) *Bordetella pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects*. Curr Opin Microbiol 4: 82-89.
24. Heiss LN, Flak TA, Lancaster JR, McDaniel ML, Goldman WE (1993) *Nitric oxide mediates Bordetella pertussis tracheal cytotoxin damage to the respiratory epithelium*. Infect Agents Dis 2: 173-177.
25. Goldman WE, Cookson BT (1988) *Structure and functions of the Bordetella tracheal cytotoxin*. Tokai J Exp Clin Med 13 Suppl: 187-191.
26. Locht C, Antoine R (1999) *Bordetella pertussis protein toxins*. In: Alouf JE, Freer JH, editors. Comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. Academic Press, páginas 130-146.
27. Guiso N, Capiou C, Carletti G, Poolman J, Hauser P (1999) *Intranasal murine model of Bordetella pertussis infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines*. Vaccine 17: 2366-2376.
28. Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP (1998) *A murine model*

*in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against Bordetella pertussis.* Infect Immun 66: 594-602.

29. Roduit C, Bozzotti P, Mielcarek N, Lambert PH, Del Giudice G, et al. (2002) *Immunogenicity and protective efficacy of neonatal immunization against Bordetella pertussis in a murine model: Evidence for early control of Pertussis.* Infect Immun 70: 3521-3528.

30. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, Mertsola J (1998) *Whooping cough caused by Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis in an immunized population.* JAMA 280: 635-637.

31. Watanabe M, Nagai M (2004) *Whooping cough due to Bordetella parapertussis: an unresolved problem.* Expert Rev Anti Infect Ther 2: 447-454.

32. Mastrantonio P, Stefanelli P, Giuliano M, Herrera Rojas Y, Ciofi degli Atti M, et al. (1998) *Bordetella parapertussis infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates.* J Clin Microbiol 36: 999-1002.

33. Liese JG, Renner C, Stojanov S, Belohradsky BH, Munich Vaccine Study Group. (2003) *Clinical and epidemiological picture of B. pertussis and B. parapertussis infections after introduction of acellular pertussis vaccines.* Arch Dis Child 88: 684-687.

34. Watanabe M, Nagai M (2001) *Reciprocal protective immunity against Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis in a murine model of respiratory infection.* Infect Immun 69: 6981-6986.

35. Locht C, Bertin P, Menozzi FD, Renauld G (1993) *The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent Bordetella spp.* Mol Microbiol 9: 653-660.

36. Huang CC, Chen PM, Kuo JK, Chui WH, Lin ST, et al. (1962)

*Experimental whooping cough*. N Engl J Med 266: 105-111.

37. Bey RF, Shade FJ, Goodnow RA, Johnson RC (1981) *Intranasal vaccination of dogs with live avirulent Bordetella bronchiseptica: correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis*. Am J Vet Res 42: 1130-1132.

38. De Jong MF (1987) *Prevention of atrophic rhinitis in piglets by means of intranasal administration of a live non-AR-pathogenic Bordetella bronchiseptica vaccine*. Vet Q 9: 123-133.

39. Hoiseth SK, Stocker BAD (1981) *Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines*. Nature 291: 238 – 239.

40. Roberts M, Maskell D, Novotny P, Dougan G (1990) *Construction and characterization in vivo of Bordetella pertussis aroA mutants*. Infect Immun 58: 732-739.

41. Rennels MB (2003) *Extensive swelling reactions occurring after booster doses of diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccines*. Semin Pediatr Infect Dis 14: 196-198.

42. Robbins JB, Schneerson R, Trollfors B, Sato H, Sato Y, et al. (2005) *The diphtheria and pertussis components of diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine should be genetically inactivated mutant toxins*. J Infect Dis 191: 81-88.

43. Holt PG, Clough JB, Holt BJ, Baron-Hay MJU, Rose AH, et al. (1992) *Genetic “risk” for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence*. Clin Exp Allergy 22: 1093-1099.

44. Favre D, Viret JF (2006) *Biosafety evaluation of recombinant live oral bacterial vaccines in the context of European regulation*. Vaccine. 1 de maio; 24(18):3856-64.

45. Cohn SE, Knorr KL, Gilligan PH, Smiley ML, Weber DJ (1993)

*Pertussis is rare in human immunodeficiency virus disease.* Am Rev Respir Dis 147: 411-413.

46. Porter JF, Wardlaw AC (1993) *Long-term survival of Bordetella bronchiseptica in lakewater and in buffered saline without added nutrients.* FEMS Microbiol Lett 110: 33-36.

47. Linnemann CCJr, Bass JW, Smith MHD (1968) *The carrier state in pertussis.* Am J Epidemiol 88: 422-427.

48. Parton R, Hall E, Wardlaw AC (1994) *Responses to Bordetella pertussis mutant strains and to vaccination in the coughing rat model of pertussis.* J Med Microbiol 40: 307-312.

49. Mielcarek N, Alonso S, Loch C (2001) *Nasal vaccination using live bacterial vectors.* Adv Drug Del Rev 51: 55-69.

50. Lyon RS, Engle JT, Goldman WE. Manuscript in preparation

51. Simon R, Priefer U, Puhler A (1983) *A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria.* Bio/Technology 1: 784–791.

52. Stibitz S (1994) *Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange.* Methods Enzymol 235: 458–465.

53. Antoine R, Huvent I, Chemlal K, Deray I, Raze D, et al. (2005) *The periplasmic binding protein of tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction.* J Mol Biol 351: 799-809.

54. Sato H, Ito A, Chiba J, Sato Y (1984) *Monoclonal antibodies against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections.* Infect Immun 46: 422-428.

55. Sato H, Sato Y, Ito A, Ohishi I (1987) *Effect of monoclonal antibody to pertussis toxin on toxin activity.* Infect Immun 55: 909-915.

56. Tuomanen, E. e Weiss A. (1985) *Characterization of two adhesions of Bordetella pertussis for human ciliated respiratory epithelial cells.* J.

Infect. Dis. 152:118-125.

57. Locht, C., Antoine, R., Veithen A. e Raze D. 2000. *Pertussis Toxin: Structure-Function-Relationship*. In Aktories K. Just I editors. Handbook of Experimental Pharmacology, Bacterial Protein Toxins, Springer, volume 145, páginas 167-185.

58. Horiguchi Y, Matsuda, H. Koyama H, Nakai T e Kume K. (1992) *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin suppreeses *in vivo* antibody responses *in mice*. FEMS Microbiol. Lett. 69:229-234.

59. Bordet e Genysa (1909) *L'endotoxine coquelucheuse*; Ann.Inst. Pasteur 23: 415-419.

60. Iida & Okonogi (1971) *Lieno toxicity of Bordetella pertussis in mice*; J. Med. Microbiol. 4: 51-61.

61. R. Parton (1985) *Effect of prednisone on the toxicity of Bordetela pertussis in mice*, J. Med. Microbiol. 19: 391-400.

62. Magyar *et al* (1988) *The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by Bordetella bronchiseptica*, Vet. Microbiol. 3 : 1719-1728.

63. Roop *et al* (1987) *Virulence factors of Bordetella bronchiseptica associated with the production of infectious atropic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine*, Infect. Immun. 55 : 217-222.

64. Weiss & Goodman (1989) *Lethal infection by Bordetella pertussis mutants in the infant mouse model*, Infect. Immun. 57 : 3757-3764.

65. Allan & Maskell (1996) *The identification, cloning and mutagenesis of a genetic lócus required for lipopacysaccharide biosynthesis in Bordetella pertussis*, Mol. Microbiol. 19 : 37-52.

66. Alonso *et al* (2002) *Eighty kilodalton N-terminal moiety of Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: adherence, immunogenicity, and protective role*, Infection & Immunity, 70, 4142-4147.

67. Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman D.A. e Miller J.F.

(2006) *Species-and Strain-specific Control of a Complex, Flexible Regulon by Bordetella BvgAS*. J. Bacteriol. 188:1775-1785.

68. Kashimoto T., Katahira J, Cornejo WR, Masuda M, Fukuoh A, Matsuzawa T, Ohnishi T, Horiguchi Y. (1999) *Identification of functional domains of Bordetella dermonecrotizing toxin*. Infect. Immun. 67(8) 3727-32.

### REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, caracterizada por compreender uma linhagem viva atenuada e mutante de *Bordetella pertussis*, compreendendo pelo menos:

um gene (*ptx*) mutante de toxina *pertussis* (SEQ ID NO: 1), em que a porção S1 do gene *ptx* mutado codifica para uma toxina que é enzimaticamente inativa, mas imunologicamente não afetada;

um gene (*dnt*) dermonecrótico deletado ou mutante (SEQ ID NO: 2), em que dito gene *dnt* mutante é mutado por deleção gênica completa, ou por inserção de uma sequência genética ou plasmídeo interrompendo o quadro aberto de leitura (*open reading frame*) do gene *dnt*, ou por mutação pontual substituindo Cys-1305 por Ala-1305, de modo que dito gene *dnt* mutante codifica para uma proteína DNT inativa enzimaticamente; e

um gene *ampG* heterólogo de *E. coli* (SEQ ID NO: 4), substituindo o gene *ampG* *Bordetella*, tal que a linhagem viva atenuada e mutante de *Bordetella* secreta menos que 5% de citotoxina traqueal (CTC) residual,

em que a linhagem viva atenuada e mutante de *Bordetella* é BPZE1, uma linhagem de *Bordetella* depositada na Coleção Nacional de Culturas de Microorganismos (CNCM) sob número CNCM I-3585.

2. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela sequência de aminoácido da toxina *pertussis* mutada (SEQ ID NO: 1) compreender uma lisina na posição 9 e uma glicina na posição 129.

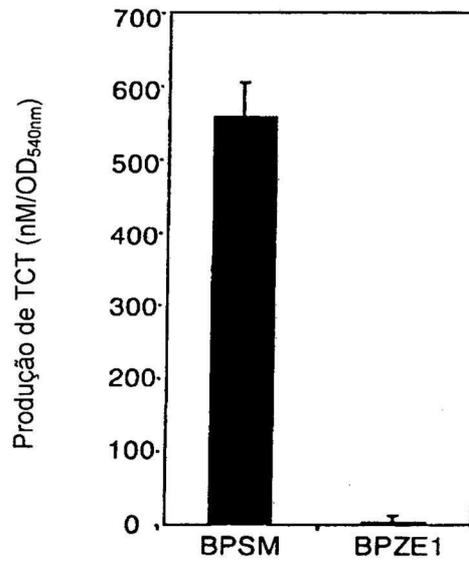
3. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela sequência de aminoácido da toxina dermonecrótica mutada (SEQ ID NO: 2) compreender uma cisteína na posição 1305.

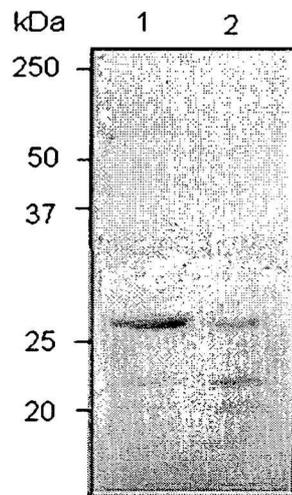
4. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender adicionalmente um carreador farmacologicamente aceitável.

5. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pela dose da linhagem viva atenuada e mutante de *Bordetella pertussis* e o carreador farmacologicamente aceitável serem compreendidos dentro de uma garrafa de spray ou de um inalador nasal.

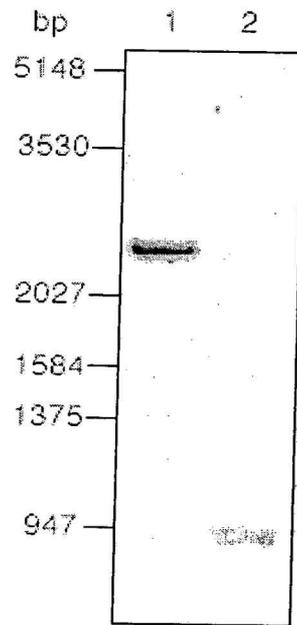
6. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pela dose da linhagem viva atenuada e mutante de *Bordetella pertussis* e o carreador farmacologicamente aceitável serem formulados como um pó seco.

7. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pela dose da linhagem viva atenuada e mutante de *Bordetella pertussis* e o carreador farmacologicamente aceitável serem compreendidos dentro de um líquido na forma de aerossol.

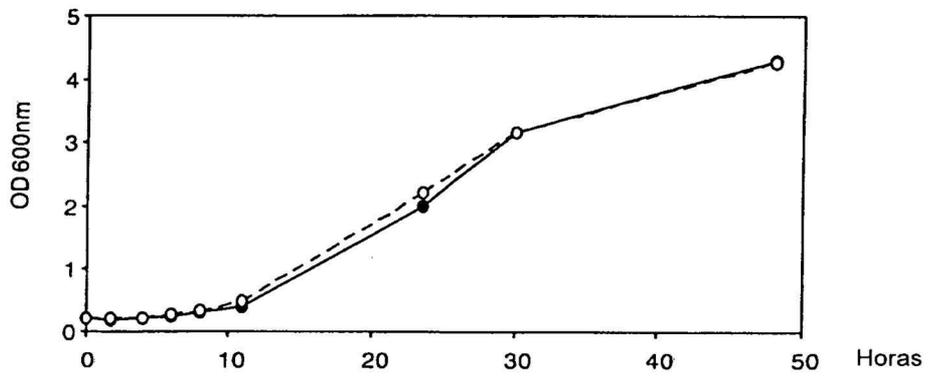




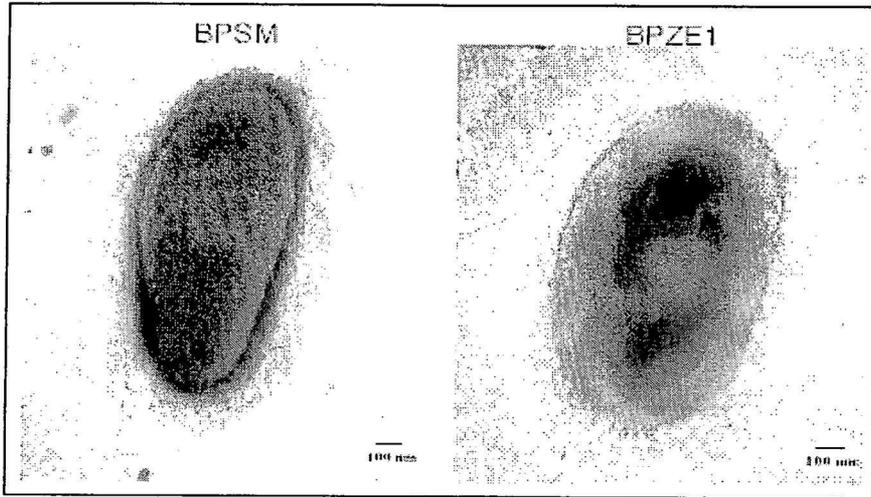
**Fig. 2**



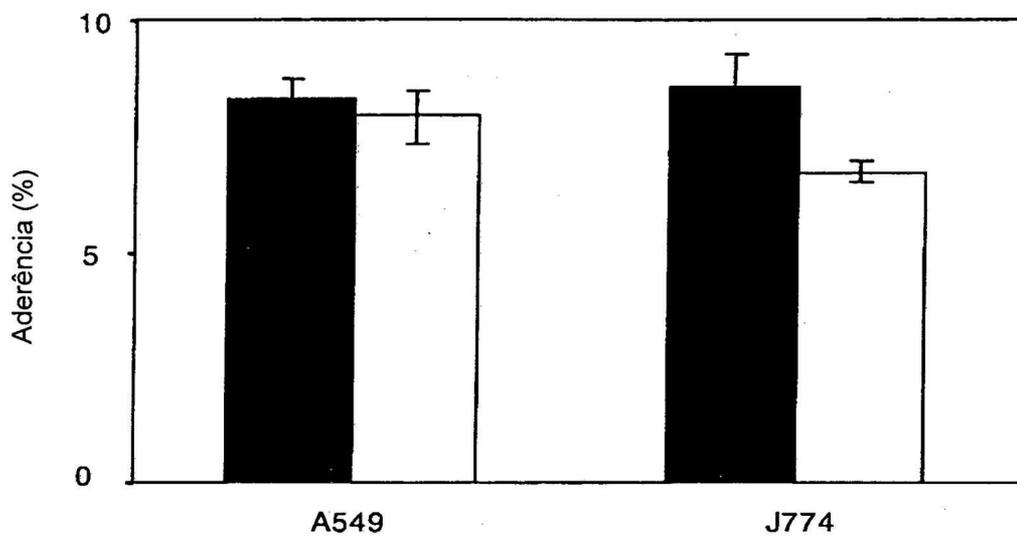
**Fig. 3**



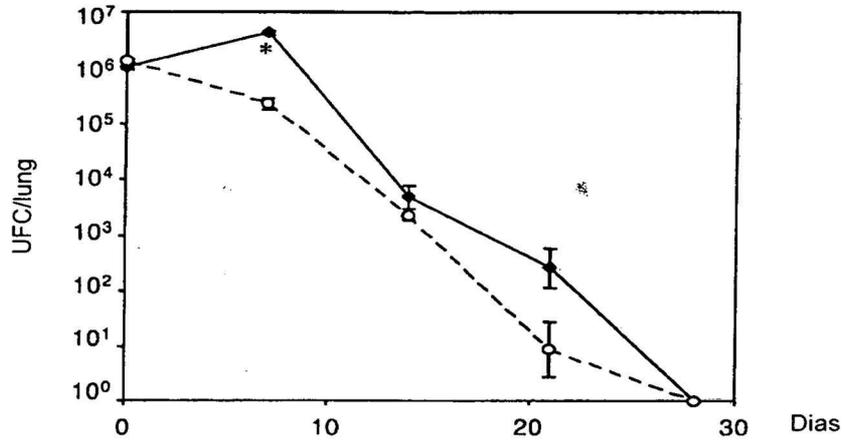
**Fig. 4**

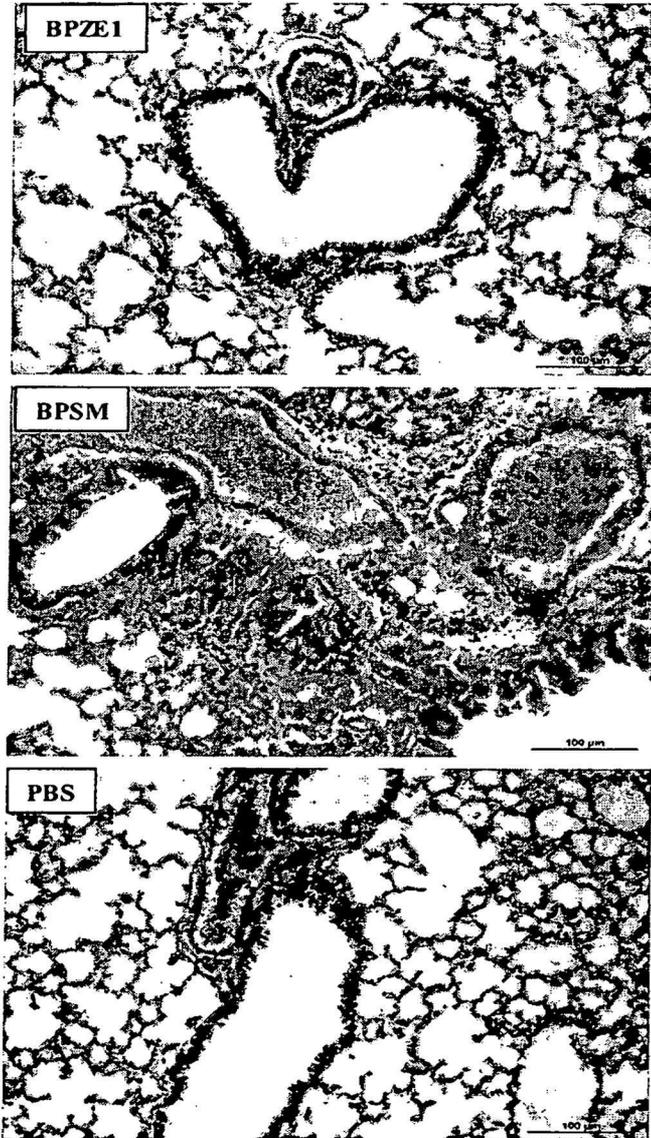


**Fig. 5**

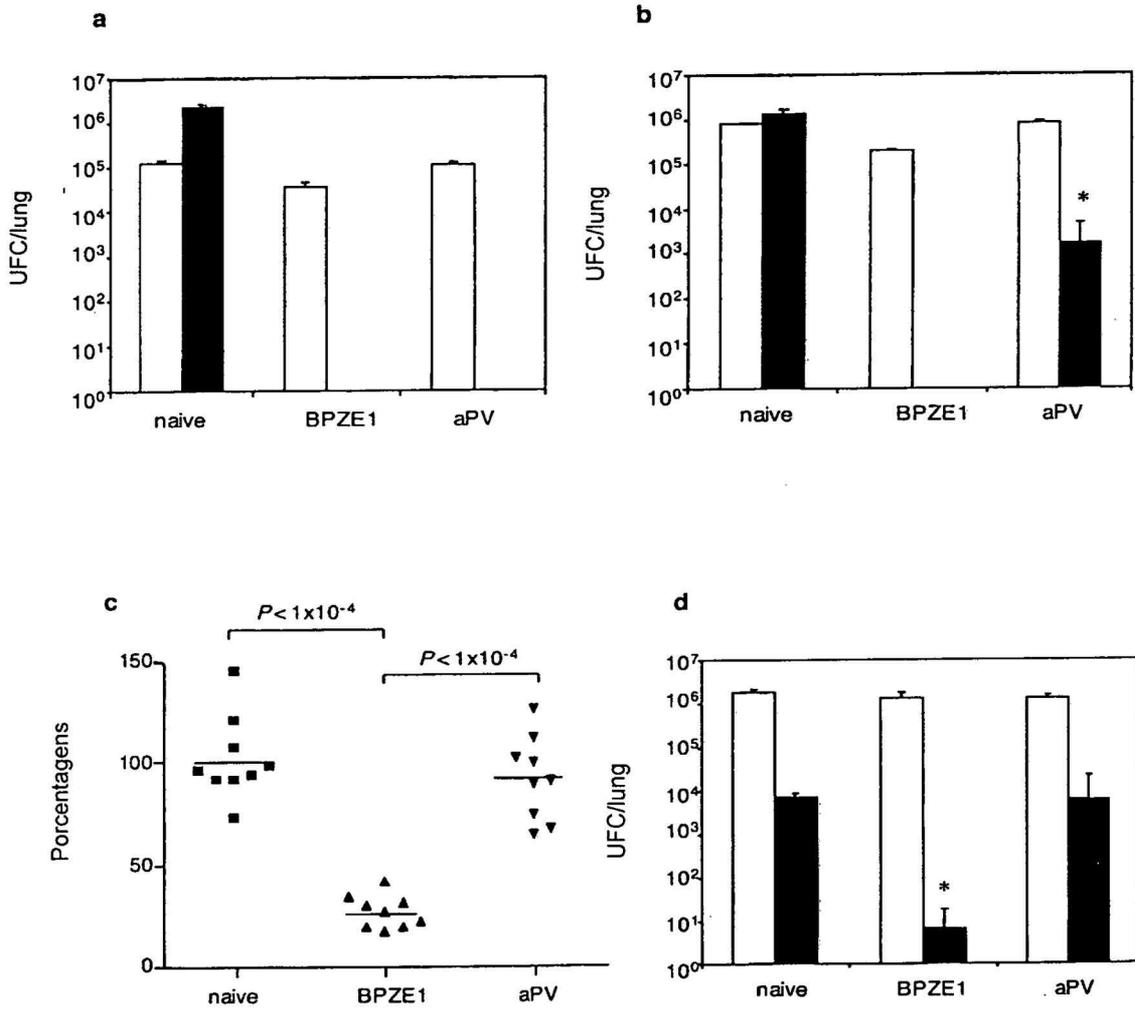


**Fig. 6**

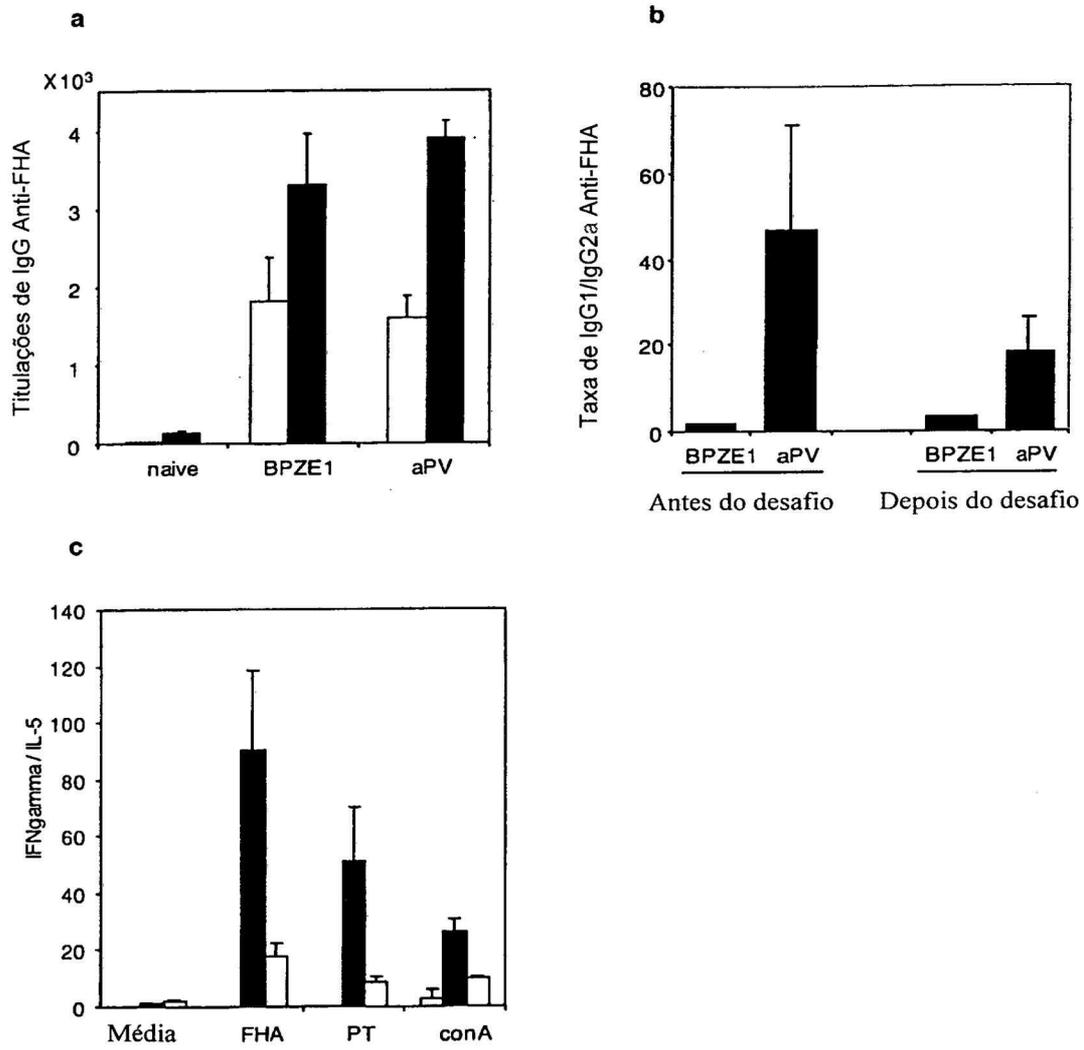
**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**

**Proteína S1 ativada por ilhota (NP\_882282)**

MRCTRAIRQTARTGWLTWLA I LAVTAPVTSPA WADDPPATVYRYDSRPPEDVF  
QNGFTAWGNNDNVLDHLTGRSCQVGSNSAFVSTSSRRYTEVYLEHRMQEAV  
EAERAGRGTGHFIGYIYEVRADNNFYGAASSYFEYVDTYGDNAGRILAGALAT  
YQSEYLAHRRI PPENIRRVTRVYHNGITGETTTTEYSNARYVSQQTRANPNPY  
TSRRSVASIVGTLVRMAPVIGACMARQAESSEAMA AW SERAGEAMVLVYYESI  
AYSF

**Fig. 11**

**Toxina Dermonecrótica (NP\_881965)**

MDKDESALRQLVDMALVGYDGVVEELLALPSEESGDLAGGRAKREKAEFALFS  
 EAPNGDEPIGQDARTWFYFPKYRPVAVSNLKKMQVAIRARLEPESLILQWLIA  
 LDVYLGVLIAALSRTVISDLVFEYVKARYEIIYLLNRVPHPLATAYLKRRRQR  
 PVDRSGRLGVSFEHPLWFAYDELAGTVDLADADIEQALAESIERRMDGEPDDG  
 SLDTAEHDVWRLCRDGINRGEQAI FQASGPYGVVADAGYMRTVADLAYADALA  
 DCLHAQLRIRAQGSVDS PGDEM PRKLD AWEI AKFH LAATQ QARVDLLEAA FAL  
 DY AALRDVRVYGDYRNALALRFI KREALRLLGARRGNASTMPAVAAGEYDEIV  
 ASGAANDAAYVSM AALIAGVLC DLESAQRTLPVVLARFRPLGVLARFRRLEQ  
 ETAGMLLDGQEP EPRGFISFTDFRDSDAFASYAEYAAQFNDYIDQYSILEAQR  
 LARILALGSRMTVDQWCLPLQKVRHYKVLTSQPGLIARGIENHNRGIEYCLGR  
 PPLTDLPLGFTMFQLHDSWLLVSNINGELWSDVLANAEVMQNPTLAALAEPO  
 GRFRTGRRTG GWF LGGPATEG PSLRDNYLLKLRQSNPGLDVKKCWYFGYRQEY  
 RLPAGALGVPLFAVSV ALRHS LDDLA AHAKSALYKPSEWQKFAFWIVPFYREI  
 FFSTQDRSYRVDVGSIVFDSISLLASVFSIGGKLSFTRTQYGNLRFVVRQR  
 IAGLSGQRLWRSVLKELPALIGASGLRLSRLLVDLYEIFEPVPIRRLVAGFV  
 SATTVGGRNQAF LRQAFSAASSAGRTGGQLASEWRMAGVDATGLVESTSGGR  
 FEGIYTRGLGPLSECTEHFIVESGNAYRVIWDAYTHGWRVVNGRLPPRLTYTV  
 PVRLNGQGHWETHLDVPGRGGAPEIFGRIRTRNLVALAAEQAAPMRLLNQAR  
 RVALRHIDTCRSRLALPRAESMDAAIRIFFGEPDAGLRQRIGRRLQEVRAI  
 GDLSPVNDVLYRAGYDLDDVATL FNAVDRNTSLGRQARMELYLDAIVDLHARL  
 GYENARFVDLMAFHLLSLGHAATASEVVEAVSPRLLGNVFDISNVAQLERGIG  
 NPASTGLFVMLGAYSESSPAIFQS FVNDIFPAWRQASGGGPLVWNFGPAAISP  
 TRLDYANTDIGLLNHGDISPLRARPP LGRRDIDLPPGLDISFVRYDRPVRMS  
 APRALDASVFRPVDG PVHGYIQSWTGAEIEYAYGAPAAAREVMLTDNVRIISI  
 ENGDEGAIGVRVRLDTPVATPLIILTGGSLSGCTTMVGVKEGYLAFYHTGKST  
 ELGDWATAREGVQALYQAHLAMGYAPISIPAPMRNDDLVSIAATYDRAVIAYL  
 GKDVPPGGGSTRITRHDEGAGSVVSFDYNAAVQASAVPRLGQVYVLI SNDGQGA  
 RAVLLAEDLAWAGSGSALDVLNERLVTLPAPV

**Fig. 12**

**Proteína AmpG (NP\_878961.1)**

MAPLLVLGFASGLPLALSSGTLQAWATVENVSLQSIGFLTLAGTAYTLKFLWA  
PLIDRYVPPFLGRRRGWMLLTQVLLAAAIMVMGMLSPGSALLPLALVAVLVAF  
LSASQDIAFDAYSTDVLRQEERGAGAAAMRVMGYRLAMIVSGGLALIVADRWL  
WGNTYVLMGGLMLACALGTLWAPEPERPANPPRDLGAAVVEPFREFFSRRGAI  
DMLLLIVLYKLGDAFAGALSTTFLLRGAGFSATEVGTVNKVLGLAATIVGALA  
GGSIMTRWGLYRSLMAFGLLQAVSNLGYWLI AVSPKNLYLMGLAVGVENLCGG  
LGTASFVALLMAMCRQQFSATQFALLSALAAVGRTYLAGPLTPVLVEWLDWPG  
FFIVTVLIALPGLWLLRLRRNVIDELDAQAR

***Fig. 13***

**Proteína AmpG (NP\_752478.1)**

MSSQYLRI FQQPRSA ILLILGFASGLPLALTS GTLQAWMTVENIDLKTIGFFS  
LVGQAYVFKFLWSPLMDRYTPPFFGRRRGWLLATQ ILLLVAIAAMGFLEPGTQ  
LRWMAALAVVIAFCSASQDIVFDAWKTDVLP AEERGAGAAISVLGYRLGMLVS  
GGLALWLADKWLGWQGMWYWLMAALLIPCI IATLLAPEPTDTI PVPKTLEQAVV  
APLRDFFGRNNAWL ILLIVLYKLGDAFAMSLTTT FLIRGVGFDAGEVGVVVK  
TLGLLATIVGALYGGILMQRLSLFRALLIFGILQ GASNAGYWLLSITDKHLYS  
MGAAVFFENLCGGMGTS AFVALLMTLCNKSF SATQFALLSALS AVGRVYVGPV  
AGWFVEAHGWSTFYLF SVAAAVPGL ILLLVCRQTLEYTRVNDNFISRTEYPAG  
YAFAMWTLAAGISLLAVWLLLLTMDALDLTHFSFL PALLEVGVLVALSGVVLG  
GLLDYLALRKTHLM

**Fig. 14**