



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

(21) BR 102015032903-2 A2

(22) Data do Depósito: 29/12/2015

(43) Data da Publicação: 19/09/2017



* B R 1 0 2 0 1 5 0 3 2 9 0 3 A

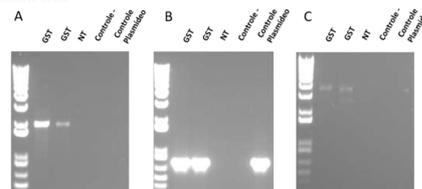
(54) Título: CEPA RECOMBINANTE DE UM MICROORGANISMO PATOGÊNICO, E UMA VACINA DUPLA

(51) Int. Cl.: C12N 1/11; C12N 15/54; C12R 1/90; A61K 39/018; A61P 33/14

(73) Titular(es): AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

(72) Inventor(es): ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR; DAIANE PATRICIA OLDIGES; CARLOS TERMIGNONI; CARLOS E. SUAREZ; DONALD P. KNOWLES JR.; JACOB LAUGHERY

(57) Resumo: CEPA RECOMBINANTE DE UM MICROORGANISMO PATOGÊNICO, E UMA VACINA DUPLA. A presente invenção descreve uma cepa recombinante de um microorganismo patogênico que compreende um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças e uma vacina dupla compreendendo tal cepa recombinante. Especificamente, a presente invenção compreende uma vacina dupla compreendendo uma cepa modificada de Babesia bovis expressando glutatona S-transferase de carrapato. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, Medicina Veterinária e Medicina.



CEPA RECOMBINANTE DE UM MICROORGANISMO PATOGÊNICO, E UMA VACINA DUPLA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve uma cepa recombinante de um microorganismo patogênico e uma vacina dupla compreendendo tal cepa recombinante. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, Medicina Veterinária e Medicina.

Antecedentes da Invenção

[0002] O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita de bovinos importante devido aos prejuízos que causa à produção pecuária. Os danos gerados não ocorrem apenas pela infestação dos animais pelo artrópode, mas também por este parasito ser vetor de microorganismos patogênicos, como por exemplo, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma spp.* Esta espécie de carrapato é o principal problema parasitário para a pecuária bovina no Brasil, em partes do Uruguai, na Argentina e na Austrália. A necessidade de substituição dos métodos de controle baseados no uso de acaricidas químicos é cada vez mais premente devido (i) ao aparecimento de populações de carrapatos resistentes às drogas disponíveis; (ii) ao tempo de desenvolvimento de novas drogas ser inferior ao tempo de aparecimento e resistência a elas e (iii) ao crescimento das exigências dos mercados consumidores por alimentos produzidos por métodos que não permaneçam traços de resíduos químicos originários do processo de produção.

[0003] Já há algum tempo há o consenso de que a melhor alternativa para substituir o controle químico é o controle imunológico. Embora já faça mais de três décadas desde que foram lançadas no mercado duas vacinas para este carrapato elas apresentam um grau de proteção ainda insuficiente para substituir o uso de acaricidas. Esta primeira proteína imunoprotetora apresenta grande variabilidade entre as populações de *R. microplus*, fato que explica porque essas vacinas apresentam eficácia muito variável nas diversas regiões. Na Austrália e em Cuba apresentam certo grau de proteção e seu uso

é indicado em associação com acaricidas químicos. Nas populações de carrapato na América do Sul elas são ineficazes. Devido a isso a procura por novos antígenos para vacina contra *R. microplus* e outras espécies de carrapato tem continuado. Até o momento, vários antígenos foram identificados sendo que alguns deles no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O grau de proteção conferido por estes antígenos é muito variável, sendo que poucos apresentam um grau de proteção superior a 80%.

[0004] Uma característica importante dos antígenos de vacinas comerciais anticarrapato é que todos eles são antígenos ocultos. O conceito de antígeno oculto foi introduzido quando se identificou a proteína Bm86, o primeiro antígeno com atividade imunoprotetora contra um ectoparasita e que é o antígeno no qual se baseiam as vacinas comerciais anticarrapato. Antígeno oculto é definido como aquele antígeno do parasita que em condições naturais não entra em contato com o sistema imune do hospedeiro, mas que quando inoculado artificialmente o hospedeiro monta uma resposta contra ele e em condições naturais de infestação anticorpos atingem o antígeno. A proteína Bm86 é uma proteína da membrana do epitélio do tubo digestivo do *R. microplus* com papel no mecanismo de exocitose. Em condições naturais esta proteína é inacessível ao sistema imune do bovino. Entretanto, uma vez que o hospedeiro tenha desenvolvido anticorpos por meio de inoculação artificial com esta proteína estes anticorpos, presentes no tubo digestivo em decorrência da alimentação sanguínea, atingem a proteína. A demonstração de que anticorpos funcionais do hospedeiro circulam na hemolinfa do carrapato abriu a perspectiva de que antígenos de outros tecidos, além daqueles do tubo digestivo, fossem investigados quanto a uma possível atividade imunoprotetora. Supõe-se que o longo tempo de evolução conjunta dos carrapatos com seus hospedeiros levou a situação atual na qual os carrapatos estão tão bem adaptados aos seus hospedeiros que conseguem evitar uma resposta as suas moléculas que entram em contato com o hospedeiro. Daí a relevância dos antígenos ocultos na busca para vacina anticarrapato.

[0005] Se por um lado o uso de antígenos ocultos abriu a perspectiva de obter uma vacina contra carrapato por outro lado traz o inconveniente de que o tempo pós-imunização passa a ser um fator limitante para a proteção, uma vez que reinfestações não são capazes de atuar como um reforço vacinal. Uma proteção efetiva só seria possível com administrações frequentes da vacina, o que pelo custo e condições de manejo dos animais limitam, ou mesmo, inviabilizam o uso de vacinas.

[0006] Se a imunidade dos bovinos, obtida por infestações naturais, ao carrapato é muito pequena e se manifesta por uma pequena diminuição do número de carrapatos ao longo de sucessivas infestações, a imunidade contra os hemoparasitas *Babesia spp* e *Anaplasma spp* (causadores da tristeza parasitária dos bovinos) é duradoura desde que os bovinos recebam reforço constante que é feito pelas sucessivas infestações por carrapatos. Infecções contínuas por estes organismos mantém um equilíbrio enzoótico. Nas condições predominantes de criação bovina no Brasil, onde praticamente todas as populações de carrapato estão infectadas por estes patógenos, a reinfecção contínua dos bovinos é responsável por manter a imunidade contra *Babesia spp* e *Anaplasma spp*. Por outro lado, bovinos provenientes de zonas livres de carrapato, ou que são mantidos totalmente isentos de carrapatos por algum tempo, ao serem infestados com carrapato desenvolvem babesiose e anaplamose, pois as populações de carrapato de praticamente todas essas regiões estão infectadas por *Babesia spp* e *Anaplasma spp*. A mortalidade é alta no caso destes bovinos não serem tratados com drogas babesicidas e antibióticos. Portanto, o uso de vacinas contra carrapato muito eficientes pode trazer este problema para regiões infestadas por *R. microplus*. Neste caso é necessário proteger os bovinos utilizando a metodologia de premunicação (basicamente inocular os agentes e controlar os níveis de parasitemia por meio de drogas) com os microrganismos virulentos ou vacinação com os microrganismos atenuados. É previsto que uma vacina muito eficaz contra carrapato poderá levar a perda da estabilidade enzoótica e, conseqüentemente, a um aumento dos casos de tristeza parasitária.

Sumário da Invenção

[0007] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de uma cepa recombinante de um microorganismo patogênico compreendendo um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças, e uma vacina compreendendo esta cepa recombinante, agindo na prevenção de doenças e controle de parasitas ou vetores de doença.

[0008] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma cepa recombinante de um microorganismo patogênico compreendendo um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças.

[0009] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma vacina dupla, que compreende uma cepa recombinante atenuada de um microorganismo patogênico compreendendo um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças.

[0010] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados é a cepa recombinante de um microorganismo patogênico compreendendo um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças.

[0011] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0012] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

[0013] A figura 1 mostra o gel de avaliação da integração do DNA exógeno ao DNA do protozoário através da técnica de PCR. O DNA genômico obtido de parasitas submetidos à transfecção com o plasmídeo contendo a sequência da GST-HI (GST), bem como de parasitas não transfectado (NT) foram utilizados como molde para realização do PCR. Como controles foram

utilizados uma reação sem presença de DNA (Controle -), e um controle contendo apenas o plasmídeo usado na transfecção GST (Controle Plasmídeo). Os grupos de primers usados foram: A- GST primer x primer genômico babesia. B-GST primers. C-GFP primer x primer genômico babesia.

[0014] A figura 2 mostra o resultado (filme) de um Southern blot das linhagens de GST mista e clonal. DNA genômico obtido dos parasitas da linhagem clonal (GST Clonal) ou mista (GST Mista), bem como um controle transfectado com um plasmídeo não relacionado a este trabalho (Não Relacionado - NR) e um controle não submetido à transfecção foram sondados com sondas para região do fator de alongação. A diferença de tamanho entre o grupo GST clonal ou mista e não transfectado mostra que efetivamente houve inserção na região de interesse no genoma do protozoário.

[0015] A figura 3 mostra o resultado (filme) da expressão de GST nas linhagens de interesse. O western blot feito com extrato de proteínas obtido a partir do cultivo da linhagem GST mista (GST Mista) ou clonal (GST Clonal), de parasitas transfectados com plasmídeo não relacionado a este trabalho (Não Relacionado – NR) ou de parasitas não submetidos à transfecção (Não Transfectado – NT). Tais amostras foram sondadas com soro de coelho imunizado com GST (α GST) e com soro de coelho pré-imune como controle. Podemos verificar que efetivamente há expressão de GST nos dois primeiros grupos da membrana sondada com α GST, e que os demais pontos reconhecidos são também visualizados no material sondado com soro pré-imune, confirmando que não se trata de GST, mas de uma interação inespecífica.

[0016] A figura 4 mostra os gráficos de hematócrito e temperatura retal aferidos nos animais experimentalmente infectados. GST: animal infectado com a linhagem clonal de babesia expressando GSTHI. Controle GFP: animal infectado com a linhagem clonal controle que não é capaz de expressar GSTHI.

[0017] A figura 5 mostra o resultado (filme) do ensaio de Western blot feito com a proteína GSTHI, sondada com soro dos animais infectados experimentalmente.

Descrição Detalhada da Invenção

[0018] Dentro deste contexto a presente invenção descreve uma vacina dupla utilizando uma cepa atenuada de um microorganismo patogênico transformada de forma a expressar a proteína de um parasita ou um vetor de doenças, no caso a proteína se comportaria como um antígeno. Desse modo, a vacina compreendendo a dita cepa é dupla, porque atua contra o microorganismo patogênico e contra o parasita ou vetor de doença. Em uma concretização, ocorreria a manutenção de estabilidade enzoótica de *Babesia bovis* e ainda faria com que a população bovina estivesse sempre sendo estimulada por antígenos ocultos ou não ocultos de carrapato o que, por sua vez, manteria a população de carrapato em baixo nível.

[0019] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma cepa recombinante de um microorganismo patogênico compreendendo um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças.

[0020] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta uma vacina dupla, que compreende uma cepa recombinante atenuada de um microorganismo patogênico compreendendo um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças.

[0021] Em uma concretização, o dito antígeno é oriundo de um parasita ou vetor de doenças.

[0022] Em uma concretização, o dito antígeno é uma proteína fusionada a um peptídeo sinal.

[0023] Em uma concretização, o dito antígeno é a glutathione S-transferase fusionada a um peptídeo sinal MSA-1.

[0024] Em uma concretização, a dita glutathione S-transferase é da espécie *Haemaphysalis longicornis*.

[0025] Em uma concretização, o dito microorganismo patogênico é *Babesia bovis*.

[0026] Em uma concretização, o dito parasita ou vetor de doenças é um carrapato.

[0027] Em uma concretização, a dita vacina compreende adjuvantes, conservantes, antibióticos, estabilizadores ou uma combinação dos mesmos.

[0028] Em uma concretização, a dita vacina é uma vacina de reforço.

[0029] Em uma concretização, a dita vacina é uma vacina viva.

[0030] Em uma concretização, a dita vacina compreende adicionalmente outros antígenos e/ou microorganismos patogênicos.

[0031] Técnicas de transfecção permitem a incorporação de um DNA não pertencente ao organismo e expressão de proteínas heterólogas. Esse tipo de metodologia é comumente usado para estudar mecanismos de regulação gênica e caracterização de genes, mas também pode ser utilizado para outros fins como melhoramento do organismo transfectado, bem como preencher necessidades experimentais ou biotecnológicas, como é o caso do desenvolvimento de vacinas. O processo de transfecção pode ser dividido em dois processos: a transfecção transiente e transfecção estável. No primeiro caso a sequência de DNA externa não é inserida no DNA do organismo receptor, sendo muitas de curta duração. Na segunda condição temos inserção do DNA no organismo receptor.

[0032] Em uma concretização utilizamos a transfecção estável, uma vez que a babesia transfectada necessita ser capaz de se propagar mantendo a característica desejada. Para efetivamente realizar o processo de transfecção estável precisamos de um plasmídeo que contenha todos os componentes necessários a tal condição, sendo estes: promotor, sinal de terminação, agente de seleção, gene repórter, região para integração ao genoma. O prévio estudo da região responsável pela expressão do fator de alongação forneceu informações importantes que culminaram na seleção do promotor bidirecional responsável pela produção de tal proteína e também para a seleção do local de inserção. É importante ressaltar que o local onde ocorre a integração vai sofrer uma interrupção em sua sequência codificadora, podendo resultar em “*knock out*” do gene. Sendo assim o local de inserção deve ser muito bem estudado, de forma que mesmo a interrupção não inviabilize o desenvolvimento do parasita.

[0033] A capacidade de inserir DNA exógeno em um organismo é uma atividade essencial para a biologia molecular e a engenharia genética. O processo de inserção da informação genética é viável em função de diferentes técnicas de transformação que muitas vezes são dependentes do organismo que será transformado. Abaixo citamos as principais técnicas utilizadas para transformação/transfecção.

[0034] Em bactéria a forma mais comum é a utilização de plasmídeos circulares que não se integrarão ao genoma da bactéria, mas sim irão coexistir com o DNA circular deste procaríoto. A forma mais utilizada para a entrega do DNA exógeno é via transformação química, onde a célula é tornada competente através de lavagens com diferentes soluções que serão responsáveis por aumentar a fluidez da membrana da bactéria e facilitar a inserção do DNA. A célula competente é incubada com o plasmídeo e ambos submetidos a um passo de choque térmico, onde ocorre uma despolarização da membrana e permitindo a entrada do DNA plasmidial. Outra forma de desestabilizar a membrana e permitir a inserção do DNA plasmidial é através da utilização de um pulso elétrico, onde a interação do campo elétrico gerado e da camada lipídica da célula permite a permeabilização da membrana aumentando assim o transporte dos ácidos nucleicos através dela. Apesar de ser muito comum em bactéria a eletroporação pode ser utilizada em outros tipos celulares, como protozoários unicelulares por exemplo.

[0035] A biobalística envolve a utilização de pequenas partículas recobertas com DNA que são aceleradas a altas velocidades. Ao serem aplicadas em tecidos são capazes de penetrar nas células sem promover a lise celular. Essa técnica é mais utilizada em organismos maiores como plantas e animais, mas há descrição de seu uso em bactéria e em cultivos celulares eucariotos também.

[0036] Em plantas outro método bastante característico de transfecção é o uso do patógeno intitulado *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria gram negativa que afeta plantas. Essa bactéria apresenta um plasmídeo que contém genes indutores de tumor em plantas, para poder utiliza-lo o plasmídeo é

modificado de forma a manter a região responsável pela integração ao genoma e adicionar a esta as sequências de DNA que querem ser estudadas/adicionadas ao genoma das células afetadas.

[0037] Podemos citar também como um processo de transfecção bastante relevante a transfecção mediada por vírus, onde um retrovírus é modificado de forma a conter as sequências de interesse do pesquisador e então utilizado para infectar a linhagem celular de interesse. Dada a natureza deste tipo de vírus o integra seu DNA ao DNA da célula hospedeira.

[0038] O vetor de expressão pode compreender um promotor, sinal de terminação, agente de seleção, gene repórter, região para integração ao genoma, terminador e outras regiões comuns ao estado da técnica.

[0039] O processo de transformação da cepa pode ser realizado por técnicas comuns ao estado da técnica, como por exemplo, eletroporação.

[0040] Na presente invenção define-se “microorganismos patogênicos” como microorganismos capazes de se multiplicar no organismo do seu hospedeiro, podendo causar infecções e outras complicações.

[0041] Na presente invenção define-se “vetor de doença” como uma espécie capaz de transmitir um agente infeccioso a um hospedeiro, em que a espécie é diferente da espécie selecionada do microorganismo patogênico.

[0042] Na presente invenção o parasita é selecionado de uma espécie diferente da espécie selecionada do microorganismo patogênico. Exemplos não extensivos de parasitas são nematoides , cestoides , artrópodes.

[0043] Na presente invenção define-se “peptídeo sinal” como uma extensão N-terminal de uma recém sintetizada proteína de membrana ou proteína a ser secretada. Tais sequências apresentam usualmente um tamanho em torno de 16 a 30 aminoácidos que contém: uma região hidrofílica (geralmente positivamente carregada), um domínio hidrofóbico na região central, e uma região C-terminal contendo um sítio de clivagem para uma peptidase. Em eucariotos (como é o caso da babesia) as sequências sinal direcionam a inserção das proteínas na membrana do retículo endoplasmático, sendo o peptídeo sinal clivado e, na maior parte das vezes, rapidamente

degradado. Em uma concretização, a adição de um peptídeo sinal de uma proteína da protozoário *Babesia bovis* à sequência codificante da GSTHI permite que a quimera seja efetivamente reconhecida pela maquinaria celular da *Babesia* e então possibilite seu encaminhamento para a superfície da membrana celular.

Exemplos - Concretizações

[0044] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1

[0045] Um método para transformar *Babesia bovis* é através de um procedimento de eletroporação, onde é possível induzir a inserção de material genético exógeno (proveniente de um plasmídeo) no genoma da babesia. Abaixo está descrito em detalhes o processo de construção do plasmídeo e posterior transfecção de forma a estabelecer a linhagem de babesia recombinante de interesse. Como sinais de terminação foram escolhidas as regiões de terminação das proteínas RAP e MSA 1. Com relação aos genes reporter foi escolhida a ORF da proteína verde fluorescente (GFP) que confere a coloração verde ao parasita quando este é estimulado com luz ultravioleta. De forma a possibilitar a seleção dos agentes transfectados foi inserido no plasmídeo a sequência codificadora da enzima blasticidina deaminase, que confere ao parasita transfectado a capacidade de sobreviver em meio contendo o antibiótico blasticidina.

[0046] Para a construção do plasmídeo a ser utilizado para a transfecção de *Babesia bovis* e desenvolvimento de uma vacina carrapaticida, o plasmídeo GFP-BSD foi usado como base na construção do plasmídeo MSASignal-GSTHI-GFP-BSD, por já conter em sua estrutura a região promotora, a região codificante para as proteínas repórter verde fluorescente (Green-GFP) e de resistência à blasticidina, e as regiões de terminação e de endereçamento para inserção no genoma do protozoário. Inicialmente, para o desenvolvimento do

plasmídeo, foi feita a construção da sequência quimérica contendo a região codificante para MSA I e GST HI. Para isto a sequência codificante para o peptídeo sinal da proteína MSA I contendo os sítios de restrição para as enzimas BamHI, NotI e SacII foi obtida por síntese química e posteriormente amplificado com iniciadores baseados nas regiões 5' e 3' da sequência quimérica. O amplicon obtido foi clonado no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO, e este material utilizado para transformação de *E. coli* Top 10. Os plasmídeos obtidos foram extraídos através da técnica de minipreparação e as sequências de ácidos nucleicos analisadas, por sequenciamento, para garantir a ausência de erros de síntese. O plasmídeo selecionado ao fim deste processo foi denominado MSASignal-TOPO.

[0047] O plasmídeo MSASignal-TOPO foi submetido a hidrólise com a enzima de restrição BamHI para liberação do inserto MSASignal e ligação deste no vetor pBlueScript. Para isto o plasmídeo MSASignal-TOPO e o plasmídeo pBlueScript foram hidrolizados com a enzima BamHI a 37 °C por 4 (quatro) horas, após o plasmídeo pBlueScript foi desfosforilado e ambos submetidos ao processo de eletroforese em gel de agarose e purificado. O MSASignal foi clonado em pBlueScript utilizando a enzima DNA ligase. O plasmídeo resultante foi utilizado para transformação de *E. coli* Top 10. O plasmídeo obtido foi extraído através da técnica de minipreparação e as sequências de ácidos nucleicos analisadas para garantir a ausência de mutações. O plasmídeo obtido ao fim deste processo foi denominado MSASignal-pBlue.

[0048] Após a obtenção do plasmídeo MSASignal-pBlue a região codificante da GSTHI foi amplificada utilizando iniciadores específicos para a região 5'e 3' da sequência codificadora de GSTHI. Como molde da reação foi utilizado o plasmídeo pET43a-GSTHI. Foram adicionados, via primer, os sítios de restrição das enzimas BamHI, SacII e PstII. Além disso, foi realizada, via primer, uma mutação pontual 657G>A onde não houve alteração no aminoácido a ser codificado. O amplicon gerado com os primers designados foi clonado em pCR2.1-TOPO, obtendo-se assim o plasmídeo GSTHI-TOPO.

Este plasmídeo foi hidrolizado com as enzimas de restrição SacII e PstI para liberação do inserto GSTHI, sendo tal processo realizado a 37 °C por 4 (quatro) horas, e após este período, submetido ao processo de eletroforese e purificados a partir do gel de agarose. Este inserto foi clonado no plasmídeo MSASignal-pBlue, previamente tratado com as mesmas enzimas de restrição e purificado. A ligação entre os dois materiais foi realizada utilizando a enzima DNA ligase, e este material utilizado para transformação de *E. coli* Top 10. Os plasmídeos obtidos foram extraídos através da técnica de minipreparação e as sequências de ácidos nucleicos analisadas para garantir a ausência de mutações. O plasmídeo obtido ao fim deste processo foi denominado MSASignal-GSTHI-pBlue.

[0049] O plasmídeo MSASignal-GSTHI-pBlue foi submetido à hidrólise com as enzimas de restrição NotI e PstI para liberação do inserto correspondente à quimera formada pelas sequências codificantes do peptídeo sinal de MSA I e da proteína GSTHI. O plasmídeo GFP-BSD também foi submetido ao mesmo procedimento de clivagem, e após a hidrólise foi desfosforilado com a enzima CIAP por uma hora. A quimera foi clonada no vetor GFP-BSD utilizando a enzima DNA ligase. Este material foi utilizado para transformação de *E. coli* Top 10. Os plasmídeos obtidos foram extraídos através da técnica de minipreparação e as sequências de ácidos nucleicos analisadas para garantir a ausência de mutações. Assim obteve-se o plasmídeo de transfecção denominado MSASignal-GSTHI-GFP-BSD.

[0050] Para realização do procedimento de transfecção 20 µg do plasmídeo MSASignal-GSTHI-GFP-BSD foram desidratadas e então ressuspendidas em tampão contendo 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.6, 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, final pH 7.6. A solução contendo o plasmídeo foi adicionada a uma solução contendo hemácias infectadas e então submetidas à eletroporação utilizando cubetas de 0,2 cm em eletroporador com os seguintes ajustes: 1,2 kV, 200 Ω e capacitância fixa de 25. Logo após o processo de eletroporação o material foi incubado em placa de cultivo de 24 poços, contendo em cada poço 1 mL de

meio HL-1 e 100 µL de hemácias, em estufa a 37 °C/5% de CO₂. Depois de 4 horas o meio de cultura foi trocado e adicionado ao novo meio o agente de seleção, a blasticidina, a uma concentração de 4 µg/mL, e as placas sempre mantidas em estufa a 37 °C/5% de CO₂. Após isto o meio passou a ser trocado em dias intercalados, sempre em presença do agente de seleção. A parasitemia da cultura foi avaliada duas vezes por semana através da técnica de esfregaço sanguíneo utilizando 4 µL do cultivo celular. A lâmina foi corada com panótico rápido e a contagem realizada em microscópio ótico.

[0051] A partir das culturas positivas para infecção por babesia foram feitos os ensaios para verificar se estas eram efetivamente capazes de expressar GST. Para isto, inicialmente foi confirmada a inserção do material proveniente do plasmídeo de transfecção no genoma do protozoário através de PCR utilizando um par de primers onde um deles é capaz de se anelar a uma sequência genômica e outro capaz de se anelar na sequência de GST proveniente do plasmídeo. Como molde para esta reação foi utilizado DNA genômico obtido a partir de um poço de cultivo celular contendo 450 µL de meio de cultivo e 50 µL de hemácias infectadas. O material foi centrifugado 400 g por 5 minutos, sobrenadante descartado e hemácias lavadas com 500 µL de PBS. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez e a papa de hemácias obtida foi congelada por 16 h a -20 °C para lise. Após a lise as células foram lavadas com 500 µL de PBS, centrifugadas a 2000 g para sedimentar as merozoítos e o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido até a remoção total da pigmentação avermelhada, obtendo-se merozoítos para o processo de extração de DNA. Os merozoítos foram lisados e adicionados a 25 µL de uma solução 20mg/mL de proteinase K. Esta mistura foi incubada por 16 h a 56 °C e então resfriada em gelo a realizada a precipitação proteica com 200 µL de solução de precipitação (protein precipitation solution – Qiagen). O material foi centrifugado e o sobrenadante coletado e precipitado com isopropal por 16 h a -20 °C. O material foi então centrifugado 12.000 g por 10 minutos, sobrenadante descartado e pellet ressuspendido em 10 µL de solução

de hidratação. O material ressuspendido já se trata do DNA para uso em técnicas de PCR ou Southern blot.

[0052] A figura 1 mostra o resultado do PCR comprovando a amplificação com os primers específico e confirmando a inserção de uma sequência. Para confirmar a identidade da inserção do amplicom obtido foi clonado em vetor pCR2.1-TOPO e sequenciado.

[0053] A inserção também foi verificada pela técnica de Southern blot. Para isto, 500 ng de DNA genômico foram digeridos com a enzima de restrição BglII a 37 °C por 4 (quatro) horas e submetido a separação dos fragmentos em eletroforese em gel de agarose. O DNA foi transferido para uma membrana e esta analisada com sondas para o local de inserção (fator de alongação) e para o gene repórter (GFP). A figura 2 mostra a que houve alteração no tamanho da região correspondente ao fator de alongação o que indica a inserção genômica e a presença da região correspondente ao gene repórter no material transfectado.

[0054] Para verificar a expressão de GST amostras foram resolvidas em eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido de análise por Western-blot, sondado com soro de coelho imunizado com GST. O material testado foi obtido a partir de um poço de cultivo celular contendo 450 µL de meio de cultivo e 50 µL de hemácias infectadas. O material foi centrifugado 400 g por 5 minutos, sobrenadante descartado e hemácias lavadas com 500 µL de PBS. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez e a papa de hemácias obtida foi congelada por 16 h a -20 °C para lise. Após a lise as células foram lavadas com 500 µL de PBS, centrifugadas a 2000 g para precipitar as merozoítos e o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido até a remoção total de qualquer pigmentação avermelhada, obtendo-se assim um pool de merozoítos. O pool de merozoítos foi misturado a um tampão de amostra com redução e submetido aos processos de sonicação e fervura, ficando assim pronto para aplicação em gel de poliacrilamida. A figura 3 mostra a expressão da proteína de interesse no material testado.

[0055] Para a obtenção de uma linhagem homogênea o cultivo celular foi submetido à clonagem através de um citometro de fluxo FACS Vantage SE. Para isto 50 µL de um cultivo em crescimento foi lavado em meio de cultura HL-1 e utilizado para o plaqueamento de 1 célula por poço em placa de 96 poços. 4 placas foram preparadas com 200 µL de meio de cultura e 20 µL de hemácias. Estas placas foram incubadas em estufa a 37 °C/5% CO₂/3% O₂ por 21 dias e então testadas para presença de hemácias infectadas por PCR.

[0056] Uma linhagem clonal capaz de expressar GST foi selecionada e utilizada para testar a capacidade da babesia transfectada de induzir uma resposta imunológica contra a proteína heteróloga (GST) por ela produzida. Para isto três terneiros da raça holstein foram inoculados por via intravenosa com 5x10⁶ parasitas. Os inóculos foram preparados com a quantidade de hemácias infectadas indicadas diluídas em 5 mL de meio de cultivo HL-1.

[0057] Os animais foram acompanhados para verificar se os parasitas transfectados continuavam capazes de levar ao desenvolvimento do quadro clínico característico de babesiose. Para isto foram aferidos temperatura e hematócrito diariamente nos primeiros 15 dias após a infecção, e depois de restabelecidos da doença tais parâmetros passaram a ser aferidos 2 (duas) vezes por semana. A figura 4 apresenta os dados aferidos nos animais infectados, mostrando que houve de fato a infecção dos animais, mas que estes se recuperaram da doença em sua fase aguda.

[0058] O desenvolvimento de resposta humoral foi analisado pela da técnica de western blot, e foram detectados anticorpos anti-GST no 12º dia após a imunização. Na figura 5 mostra o resultado de Westen-blot com o reconhecimento da proteína GSTHI por anticorpos presentes no soro de animais imunizados com linhagem clonal de babesia expressando GSTHI e o não reconhecimento pelos animais controle, imunizados com babesia sem expressa GST.

[0059] A cepa recombinante compreendendo o vetor de expressão contendo região codificadora para glutathione S-transferase de *H. longicornis* (GSTHI) fusionada à sequência codificadora do peptídeo sinal da proteína

antígeno de superfície de merozoíto 1 (MSA-1), região codificadora da proteína verde fluorescente e região codificadora da blasticidina desaminase, cuja expressão é controlada via promotor bidirecional do fator de alongação 1 alfa. Esta construção permite a expressão da GST de *H. longicornis* fusionada ao peptídeo sinal de MSA-1, bem como das proteínas verde fluorescente (GFP) e a blasticidina desaminase, sendo as duas últimas, respectivamente, proteína repórter e enzima responsável pela resistência ao agente de seleção. A GSTHI é uma proteína sem funções biológicas completamente conhecidas e originalmente isolada de tecidos de carrapato *H. longicornis*. Ao ser inoculada em animais foi capaz de induzir uma resposta imune protetora contra o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. Após o processo de transfecção o parasita mantém a sua capacidade de infecção e reprodução nos animais que são expostos ao hemoparasito. Além disso, ao usar este protozoário como vetor de vacina viva, foi possível induzir a geração de anticorpos contra a proteína GST-HI.

[0060] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. CEPA RECOMBINANTE de um microorganismo patogênico **caracterizada por** compreender um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças
2. CEPA RECOMBINANTE de um microorganismo patogênico de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** compreender um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças
3. CEPA RECOMBINANTE de um microorganismo patogênico de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo dito antígeno estar fusionado à um peptídeo sinal
4. Cepa recombinante de um microorganismo patogênico de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo dito antígeno ser glutathione S-transferase e pelo dito peptídeo sinal ser MSA-1
5. CEPA RECOMBINANTE de um microorganismo patogênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizada** pelo dito microorganismo patogênico ser *Babesia bovis*
6. CEPA RECOMBINANTE de um microorganismo patogênico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelo dito parasita ou vetor de doenças ser um carrapato.
7. VACINA DUPLA **caracterizada por** compreender a dita cepa recombinante conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a dita cepa recombinante está atenuada
8. VACINA DUPLA de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** compreender adjuvantes, conservantes, antibióticos, estabilizadores ou uma combinação dos mesmos
9. VACINA DUPLA de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** ser uma vacina de reforço
10. VACINA DUPLA de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** ser uma vacina viva

11. VACINA DUPLA de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** compreender adicionalmente outros antígenos e/ou microorganismos patogênicos

FIGURAS

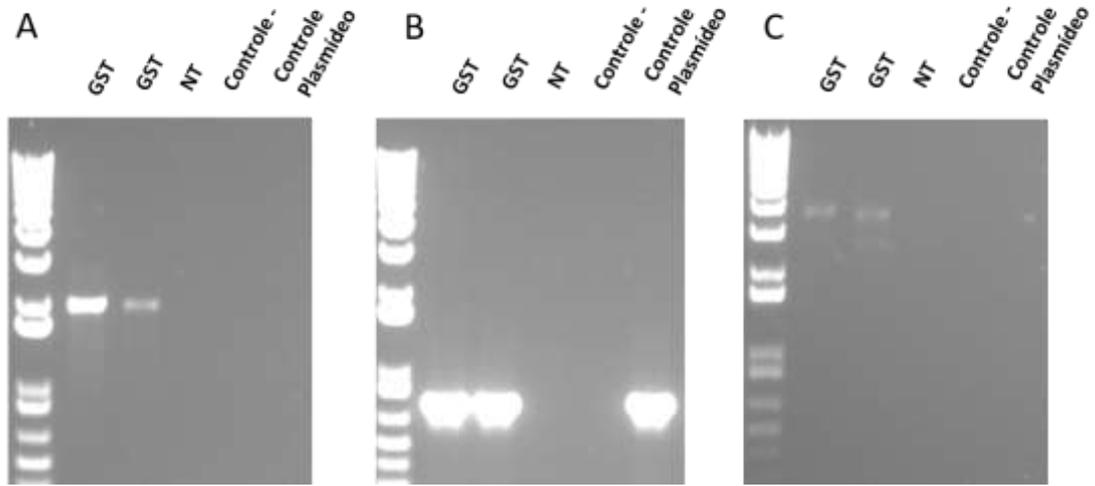


Figura 1

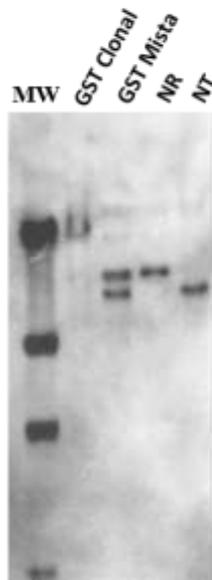


Figura 2

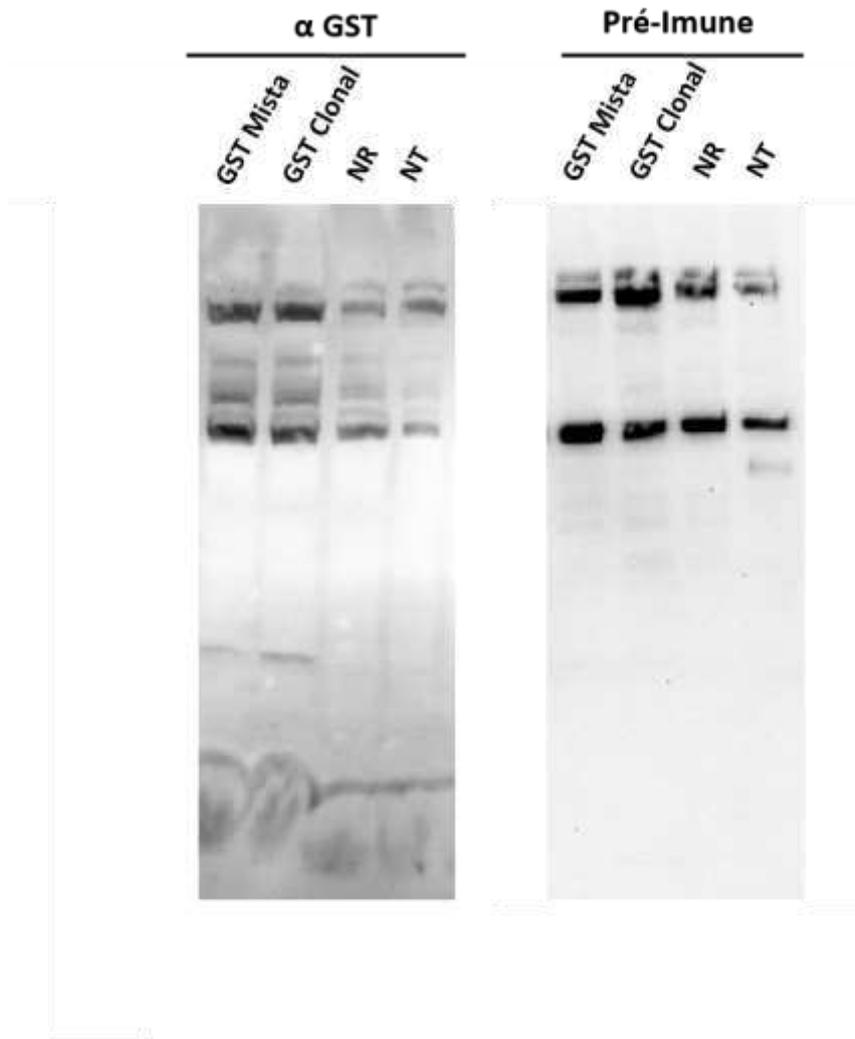


Figura 3

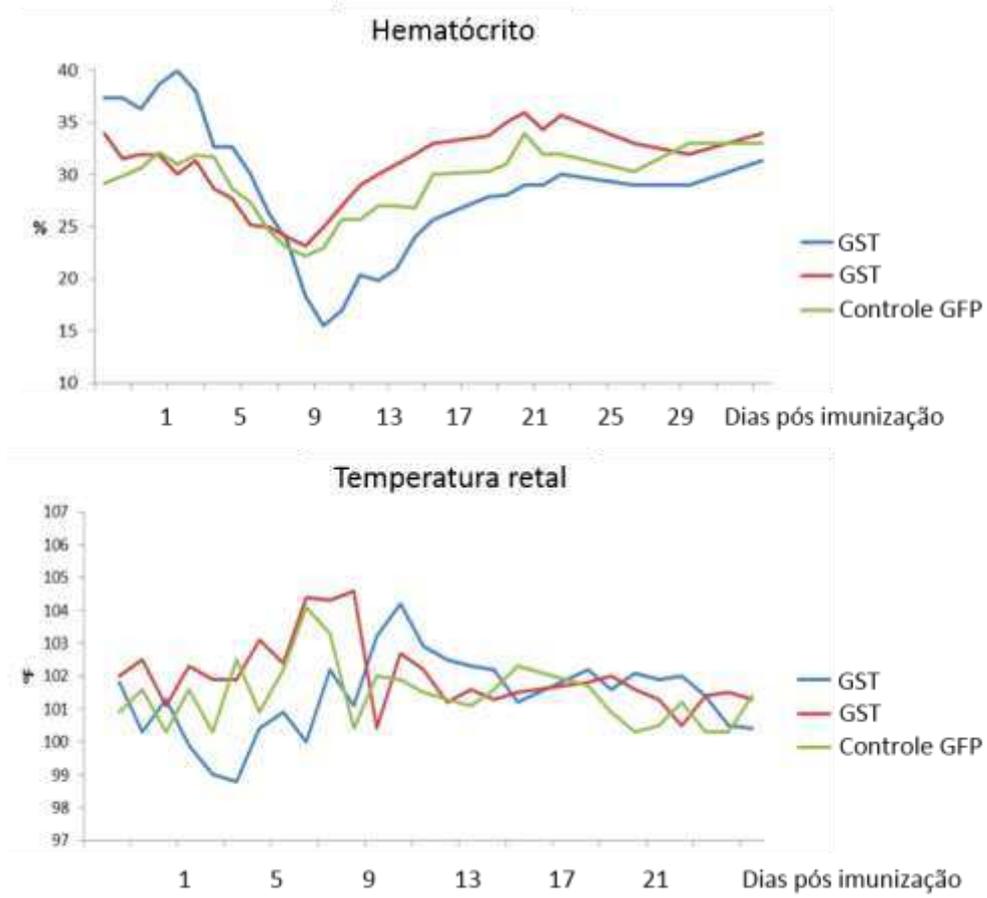


Figura 4

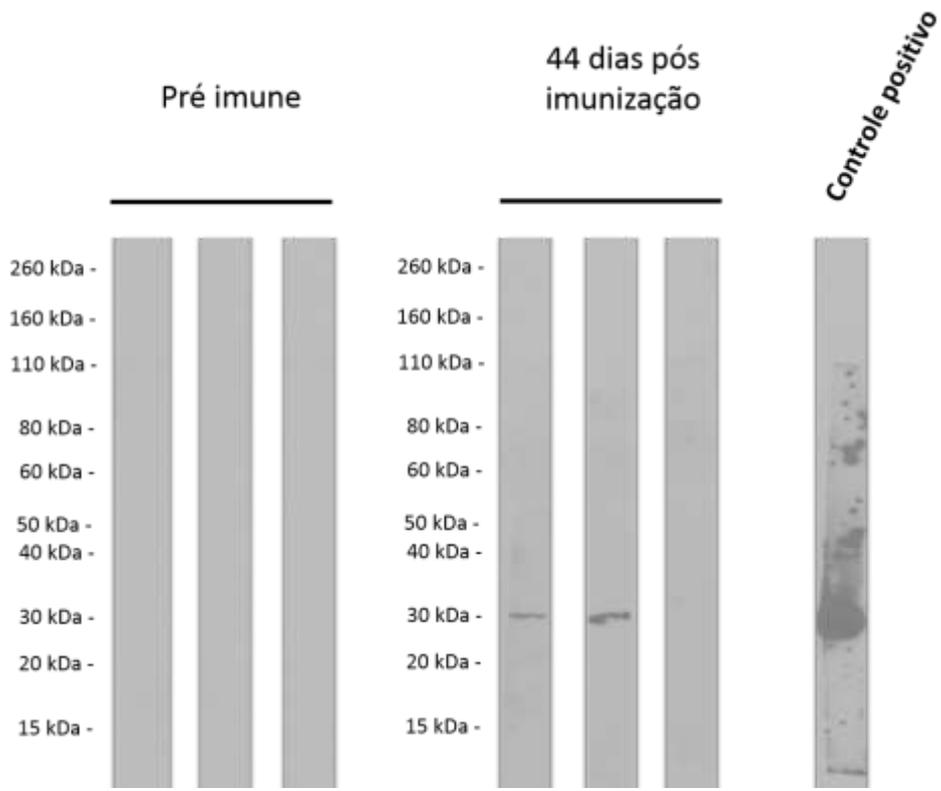


Figura 5

RESUMO

CEPA RECOMBINANTE DE UM MICROORGANISMO PATOGÊNICO, E UMA VACINA DUPLA

A presente invenção descreve uma cepa recombinante de um microorganismo patogênico que compreende um vetor de expressão de um antígeno oriundo de um parasita ou vetor de doenças e uma vacina dupla compreendendo tal cepa recombinante. Especificamente, a presente invenção compreende uma vacina dupla compreendendo uma cepa modificada de *Babesia bovis* expressando glutathione S-transferase de carrapato. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, Medicina Veterinária e Medicina.