

Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector

Robert J. Moore*¹, Linda Rothel², Jolanta Krywult, Anthony J. Radford³,
Kim Lund⁴, Adrian L.M. Hodgson¹

CSIRO Division of Animal Health, Animal Health Research Laboratory, Private Bag 1, Parkville, Victoria 3052, Australia.

Received 20 November 1998; accepted 10 May 1999

Abstract

A defined phospholipase D mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, designated Toxminus, was used as a live vector to express and deliver a range of candidate vaccine antigens to sheep. Expression levels of the foreign genes in Toxminus were evaluated when directed from a number of different promoters, both constitutively expressed and inducible, as fusions with expressed genes including a signal sequence, and from chromosomal and episomal loci. In general expression levels were low and it appeared that some of the recombinant proteins were tolerated by *C. pseudotuberculosis* Toxminus better than others. Gene expression was however sufficiently high for three of the genes to elicit antibody responses specific to the recombinant protein following a single dose of the live Toxminus vector vaccine. This work suggests that *C. pseudotuberculosis* Toxminus has potential for development as a live veterinary vaccine vector. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Vaccine vector; Gene expression

1. Introduction

Live vaccine vectors are being developed as an effective means of delivering protective antigens to the immune system. Notable successes have been achieved in expressing antigens from disease causing organisms, important to humans, in the live tuberculosis vaccine strain, *Mycobacterium bovis*, bacille calmette-guerin (BCG) [1–3]. *Salmonella* strains have also been exten-

sively investigated as potential vectors [4,5]. We are interested in developing a live bacterial vaccine vector suitable for veterinary use. BCG is not appropriate for such a use as it would seriously complicate diagnosis of bovine tuberculosis and hence compromise control and eradication campaigns. In the veterinary setting little work has been reported using *Salmonella* as a vaccine vector. However, considerable effort has gone into the development of specific attenuated strains for use as live vaccines. It is probable that some of these attenuated strains could be adapted as vaccine vectors.

An attenuated mutant of *Corynebacterium pseudotuberculosis* has been identified as having the potential to be used as a live vector for the delivery of veterinary vaccine antigen genes [6]. *C. pseudotuberculosis* is a gram-positive bacterium that causes the disease caseous lymphadenitis (CLA) in sheep and goats. A secreted phospholipase D (PLD) exotoxin has been shown to be a major virulence factor [6–10]. PLD causes an increase in vascular permeability. The resulting increased fluid in the tissue washes *C. pseudotuber-*

* Corresponding author. Tel.: +61-3-5227-5760; fax: +61-3-5227-5790.

E-mail address: robert.moore@dah.csiro.au (R.J. Moore)

¹ Present address: CSIRO Division of Animal Health, Australian Animal Health Laboratory, Private Bag 24, Geelong, Vict. 3220, Australia

² Present address: CSL Ltd., 45 Poplar Road, Parkville, Vict. 3052, Australia

³ Present address: AMRAD Corporation, 17 Cotham Road, Kew, Vict. 3101, Australia

⁴ Present address: Pfizer Pty. Ltd., 158 Chesterville Road, Highett, Vict. 3190, Australia

Table 1
Brief description and sources of plasmids used in this study

Plasmid	Description	Source
pEP2	Corynebacterium vector, encodes kanamycin resistance	[15]
pEP3	Corynebacterium vector, encodes hygromycin resistance	[15]
pTrc99A	P _{Trc} expression vector	[38]
pML3	18 kDa antigen from <i>M. leprae</i> cloned in pUC18	21
pGEX2T45WB/X	Stable GST-45W fusion protein	[22]
pGEM7zfpApA	<i>A. marginale</i> antigen	25
pTZ19UPLD-Ser	Mutant PLD gene	[18]
pTB50	PLD gene cloned into pEP2	This study
pTB58	Erythromycin resistance (ErmR) gene cloned into PLD gene in pTB50	[6]
pTB62	18kDa gene cloned into pEP2 vector	This study
pTB73	PLDpromoter/signal sequence-45W	This study
pTB114	18 kDa gene inserted into ErmR of pTB58	This study
pTB175	18K-45W inserted into ErmR of pTB58	This study
pTB177	2 copies of 18K-45W inserted in tandem into ErmR of pTB58	This study
pTB214	18 kDa-Protease fusion	This study
pTB241	Aph gene cloned into pEP2	This study
pTB253	His-20→ Tyr mutant PLD gene	[12]
pTB294	P _{18K} -lacI in pEP3	This study
pTB305	P _{18K} -lacI in pEP2	This study
pTB309	45W inserted into pTrc99A	This study
pTB313	pTB305 and pTB309 fusion plasmid	This study
pTB327	11C5 inserted into pTrc99A	This study
pTB330	pTB327 and pTB305 fusion plasmid	This study
pTB332	pTB327 and pEP2 fusion plasmid	This study
pTB333	lacI ^q gene deleted from pTB332	This study

culosis through the lymphatic system to the superficial draining lymph nodes. In the lymph nodes the bacteria proliferate within pyogranulomas to cause characteristic abscesses [11]. Inactivation of the PLD gene results in an attenuated mutant (Toxminus) that no longer causes disease but can elicit a protective immune response against CLA when delivered subcutaneously or orally [6,12]. Both humoral and cell-mediated immune responses are seen [12,13]. A rationally attenuated strain, produced by mutating the *aroQ* gene, has also been investigated for its potential as a live vaccine [13]. The *aroQ* deleted strain is so strongly attenuated that it is not as useful as the Toxminus strain in generating protective antibodies against *C. pseudotuberculosis* [14].

The details of the biology of infection, plus the ability of the Toxminus attenuated strain of *C. pseudotuberculosis* to induce strong humoral and cellular immune responses, suggested that it could have utility as a vector for the delivery of recombinant protective antigen genes from other organisms. The first requirement in adapting *C. pseudotuberculosis* Toxminus for use as a vaccine vector is to establish methods for heterologous gene expression. The basic methods needed to investigate heterologous gene expression have been developed. For example, plasmid vectors are available [15] and the introduction of DNA by electroporation is well established [16]. A further positive aspect of *C. pseudotuberculosis*, in considering its commercial po-

tential as a veterinary vaccine vector, is that it is already grown on a commercial scale for production of a toxoid vaccine [9,10].

To demonstrate the utility of *C. pseudotuberculosis* Toxminus as a vaccine vector we have attempted to express a variety of putative protective antigen genes in the strain. Here we describe the successful expression of five heterologous genes plus a genetically inactivated analogue of PLD. Expression has been achieved from both plasmid-borne and chromosomally integrated expression cassettes. Three expression constructs used to vaccinate sheep elicited humoral antibody responses to the recombinant protein. These findings are encouraging steps in the development of *C. pseudotuberculosis* Toxminus as a veterinary vaccine vector.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and media

Escherichia coli DH5 α (Bethesda Research Laboratories) was the host for all plasmid constructs. The *C. pseudotuberculosis* strain C231 or the attenuated strain Toxminus [6] were used as the hosts for all the *C. pseudotuberculosis* expression analysis. The *E. coli*-*Mycobacterium*-*Corynebacterium* shuttle plasmid pEP2 [15] was used as the starting vector for the con-

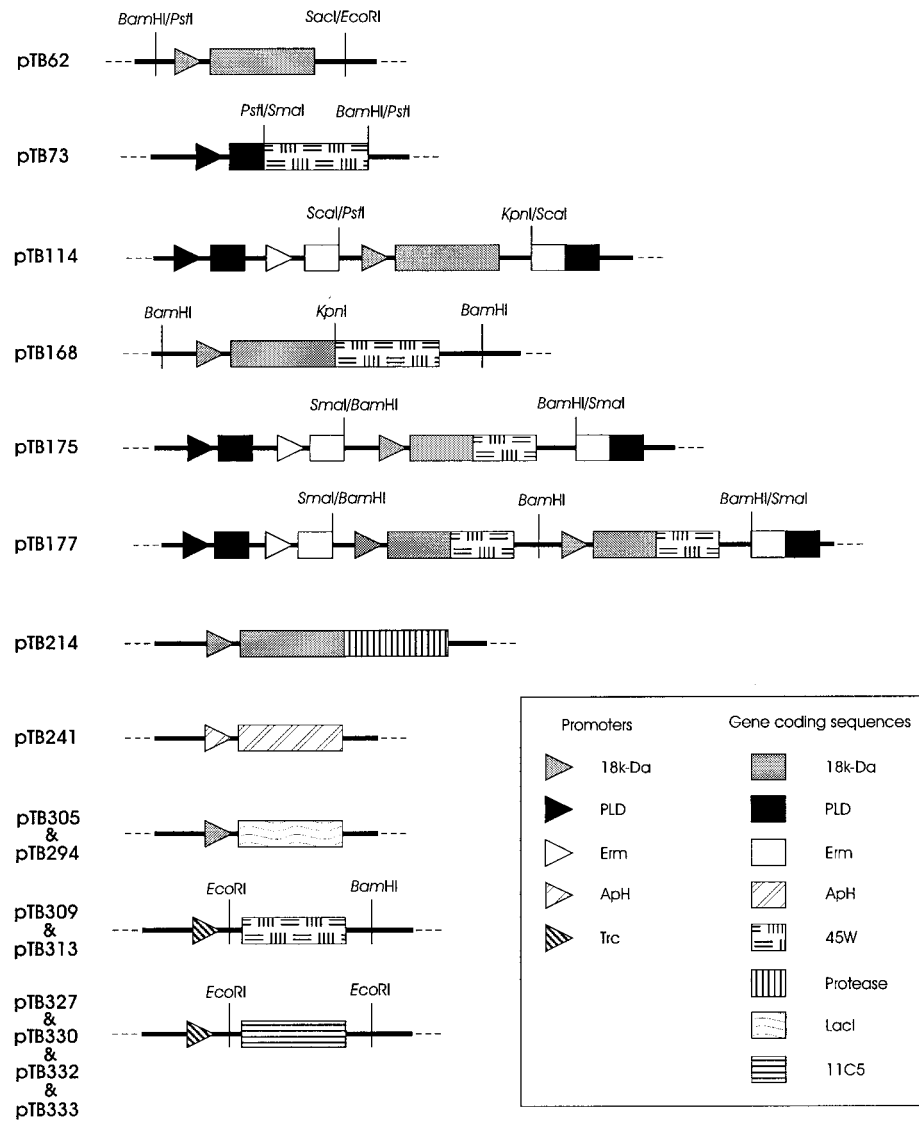


Fig. 1. Diagrammatic representation of gene expression constructs used in this study. The origin of each of the fragments used for the construction of the plasmids is detailed in Materials and methods. Only the restriction enzyme sites used in clone construction are shown. The elements of each construct are not drawn to scale.

struction of the expression plasmids and integration cassettes. The plasmids used in this study are listed in Table 1 and the structures of the relevant expression cassettes are illustrated in Fig. 1. The erythromycin resistance gene used in a number of constructs has been described previously [17]. Media used for the growth of *E. coli* and *C. pseudotuberculosis* strains have been described previously [6]. The preparation of electro-competent *C. pseudotuberculosis* strains was also as previously reported [16,18].

2.2. DNA techniques

All DNA manipulations were conducted using standard protocols [19]. Genomic DNA was isolated from *C. pseudotuberculosis* as described previously [20].

2.3. Construction of plasmids expressing foreign antigens

The *Mycobacterium leprae* 18-kDa antigen was cloned as a *KpnI/PstI* fragment from pML3 [21]. The ends of the fragment were modified with T4 polymerase and the blunt-ended fragment was inserted into pEP2 (*BamHI/EcoRI* digested and ends made blunt by treatment with Klenow enzyme) and the *ScaI* site within the erythromycin resistance gene of pTB58 to produce the expression plasmids pTB62 and pTB114. The gene was inserted so that transcription of the 18-kDa antigen gene was in the same orientation as the kanamycin, erythromycin and *repA* genes of the vectors. These plasmids should express a recombinant protein of 18 kDa.

A fusion between the *M. leprae* 18 kDa antigen gene and the *Taenia ovis* 45W gene [22] was constructed by cloning a *Bam*HI/*Kpn*I fragment containing the 18-kDa antigen gene into pGEX2T-45W (*Kpn*I/*Bam*HI (partial)). The fused 18-kDa-45W gene in which transcription from the native 18k-Da promoter leads to expression of a fusion protein was then subcloned on a *Bam*HI fragment. The fragment was end-filled with Klenow enzyme and inserted within the erythromycin resistance gene in pTB58 (partial *Sma*I digest) to give the constructs pTB175 (single insert) and pTB177 (two tandem copies of 18-kDa-45W insert). The fusion protein has an expected molecular weight of 45 kDa consisting of 18 kDa of the 18-kDa antigen and 27 kDa of the 45W antigen.

A plasmid expressing a secreted form of 45W was made by inserting the 45W gene downstream of the PLD promoter and secretion signal sequence. This plasmid was constructed by cloning the 45W gene on a *Sma*I/*Bam*HI fragment from pGEX2T45WB/X into pTB50 which had been digested with *Pst*I, blunt-end repaired with T4 polymerase and then digested with *Bam*HI. The resulting plasmid was called pTB73 and was expected to encode for a processed and secreted 27 kDa recombinant protein.

Regulated expression of the 45W gene was achieved by cloning an *Eco*RI/*Bam*HI fragment of the gene into pTrc99A to produce pTB309. Plasmid pTB309 was then fused with pTB305, using each plasmids unique *Pst*I sites, to produce pTB313, a plasmid carrying the *P*_{18k}-*lacI* gene, the *lacI*^q gene from pTrc99A, and a Trc promoter directing transcription of the 45W gene.

Our previous work (unpublished) had demonstrated that the *lacI*^q gene was not expressed sufficiently in *C. pseudotuberculosis* to regulate Lac, Tac or Trc promoters. Hence a gene was constructed in which the *M. leprae* 18-kDa antigen gene promoter, which we show in this paper to be active in *C. pseudotuberculosis*, was linked to the *lacI* gene to produce *P*_{18k}-*lacI* (pTB305). The *P*_{18k}-*lacI* was also introduced into the hygromycin resistance encoding plasmid pEP3 to give pTB294.

The *Babesia bovis* 11C5 antigen [23] gene (kindly provided by Dr. Kevin Gale, CSIRO Division of Tropical Agriculture) was cloned on a 2.3 kb *Eco*RI fragment into the *Eco*RI site of pTrc99A to produce pTB327, a plasmid in which expression of the 11C5 gene was from the Trc promoter. The pEP2 based plasmid carrying the *P*_{18k}-*lacI* gene (pTB305) was then fused to pTB327, using the unique *Pst*I sites, to give pTB330. In a second construct pTB327 was fused with pEP2, using the plasmids unique *Bam*HI sites, to produce pTB332. The *lacI*^q gene present on pTB332, derived from pTrc99A, was inactivated by digesting with *Nar*I, filling in with Klenow enzyme, and religating to produce pTB333.

The *D. nodosus* gene coding for mature basic pro-

tease (*bprV*) [24] was cloned using the polymerase chain reaction (PCR) and inserted downstream of a PCR cloned version of the *M. leprae* 18-kDa antigen gene. The resultant pEP2 based clone, named pTB214, was structured such that a fusion protein was produced which consisted of an almost full length 18-kDa sequence fused to the mature basic protease to produce a recombinant protein with an expected molecular weight of 62 kDa.

A clone expressing the *Anaplasma marginale* ApH antigen [25] was constructed by fusing the plasmid carrying the complete gene, pGEM7zfpApH, (*Apa*I digested and blunt-end repaired) with the *C. pseudotuberculosis* vector plasmid pEP2 (*Pst*I digested and blunt-end repaired) to produce pTB241. In this clone the foreign antigen gene was cloned intact and expression was directed from the native *A. marginale* promoter. A product of 45 kDa is expected.

A vaccine strain expressing a mutant form of PLD was constructed by electroporating the plasmid pTB253, carrying a PLD gene in which the His-20 residue was substituted with Tyr [12], into *C. pseudotuberculosis* Toxminus. The PLD protein has a molecular weight of 31 kDa.

2.4. Chromosomal integration

Integration cassettes consisted of the foreign gene to be moved to the chromosome flanked by PLD gene sequences (Fig. 1). A number of the expression vectors described above were designed to contain the expressed gene within PLD sequences so that they could be utilised not only for plasmid based expression but also used to generate chromosomal integrants. Thus the plasmids pTB177 and pTB114 were used to insert the expression cassettes for the 45W antigen and 18-kDa antigen, 18 respectively. The plasmid pTZ19UPLD-Ser, described in Tachedjian et al. [18] was used to replace the chromosomal PLD gene with the His20 → Ser PLD inactive mutant.

The integration cassette plasmids, carrying a kanamycin resistance gene, were introduced into the wild-type *C. pseudotuberculosis* strain C231 along with the hygromycin resistance encoding, counter-selective plasmid pEP3 [15]. Initially, to ensure that both plasmids were present, antibiotic selection was applied for both plasmids. Antibiotic selection for the integration cassette plasmid was then relaxed and only the counter-selective plasmid was selected. The bacteria were subcultured a number of times (5–7) until significant loss (80–90%) of the integration cassette plasmid marker (Kan^R) was observed. Cultures demonstrating such a level of plasmid loss were plated onto sheep blood plates and colonies which did not produce zones of haemolysis were analysed by Southern blotting using the approach previously detailed [6], to determine if

the expected homologous recombination event had occurred within the PLD gene.

2.5. Induction of gene expression

All expression constructs that incorporated the expressed genes native promoter or the PLD, 18-kDa or Erm gene promoters were constitutively expressed in both *E. coli* and *C. pseudotuberculosis* and hence did not require induction for gene expression. The plasmids incorporating expression cassettes using the Trc promoter (pTB313 and pTB330) and carrying the P_{18k}-*lacI* gene were induced with isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). *C. pseudotuberculosis* Toxminus transformants were grown overnight in media supplemented with kanamycin. Subcultures (1:100) were grown for 2 h then induced for 4 h or overnight with 5 mM IPTG. Control cultures were not induced.

Induction was also achieved by placing the P_{18k}-*lacI* gene and the P_{Trc} expressed 11C5 gene on different plasmids (pTB294 and pTB333 respectively) and then allowing plasmid segregation. Both plasmids were electroporated into *C. pseudotuberculosis* Toxminus and maintained by culturing in media containing both kanamycin and hygromycin. Loss of pTB294, by segregation, was accomplished by subculturing in broth supplemented with kanamycin and not hygromycin. Plasmid loss was measured over time by comparing the number of colonies arising on solid media supplemented with kanamycin (total number of bacteria) and kanamycin plus hygromycin (number of cells retaining both plasmids). The difference between the two populations is the number of cells retaining only pTB333, the fraction of the cell culture in which repression by *lacI* has been removed.

2.6. Analysis of gene expression

The methods used to analyse gene expression (SDS-PAGE, Coomassie staining, western blotting) have been described previously [12,18]. The antigen-specific antisera used to detect 45W expression was supplied by Dr Marshal Lightowlers, Melbourne University; and those used to detect ApH and 11C5 expression were supplied by Dr Kevin Gale, CSIRO Tropical Agriculture.

2.7. Sheep vaccination trials

Nine-month old Merino ewes were used in the sheep vaccination trials. Groups of four sheep were vaccinated subcutaneously behind the right ear with a 1 ml dose of the vaccine strains containing approximately 10⁸ viable bacteria. The bacteria were prepared by growing for 24 h in Brain Heart Infusion broth, centrifuged to pellet the bacteria and then the pelleted bac-

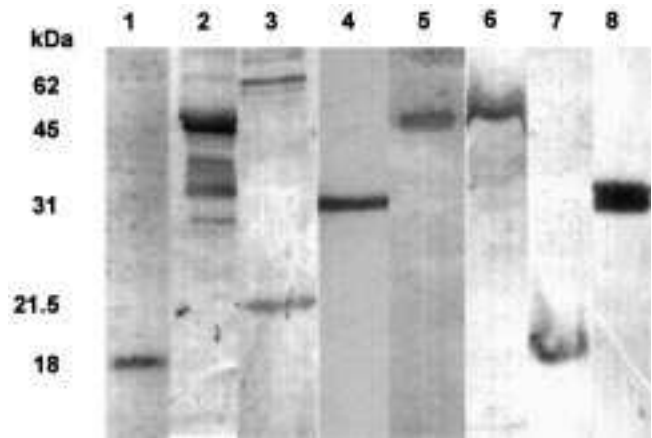


Fig. 2. Western blot showing expression of foreign antigens in *C. pseudotuberculosis*. Individual strips were probed with the appropriate antibody. Lane 1, Toxminus(pTB114) probed with anti-18kDa antibody, 18 kDa band; lane 2, Toxminus(pTB177) probed with anti-45W antibody, 45 kDa band; lane 3, Toxminus(pTB214) probed with anti-protease antibody, 62 kDa band; lane 4, Toxminus(PLD mutant) probed with anti-PLD antibody, 31 kDa band; lane 5, Toxminus(pTB241) probed with anti-ApH antibody, 45 kDa band; lane 6, C231 chromosomal integrant of 18 kDa-45W cassette probed with anti-45W antibody, 45 kDa band; lane 7, C231 chromosomal integrant of 18 kDa cassette probed with anti-18 kDa antibody, 18 kDa band; lane 8, C231 chromosomal integrant of PLD mutant probed with anti-PLD antibody, 31 kDa band. Total cell lysates were electrophoresed. As negative controls each antibody was also used to probe strips carrying lysate from Toxminus(pEP2) — no reactions were seen. The sizes of molecular mass markers are indicated.

teria were washed once in phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in PBS at a concentration of 10⁸ cfu/ml. The cultures containing P_{Trc} expressed genes (pTB313 and pTB330) were induced with 5 mM IPTG for 4 h prior to harvesting. A control group of six sheep was used, two unvaccinated and four vaccinated with the Toxminus (pEP2) strain. Because recombinant strains of *C. pseudotuberculosis* were used, all sheep in these trials were housed in a PC2 containment facility. At the end of the trials the animal carcasses were incinerated.

2.8. Antibody assays

The humoral immune responses to both the *C. pseudotuberculosis* antigens and the recombinant antigens were measured in blood samples taken before vaccination and then at regular intervals after vaccination, for the duration of the experiments. Serum IgG was measured using indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The relevant antigens were used to coat microtitre plates (0.5 µg per well) and dilutions of the various sera were added, washed, and then detected with an enzyme conjugated antibody directed

against sheep IgG. Titres were determined as the reciprocal of the dilution that gave half the maximum optical density obtained. Mean group titres are expressed as geometric means. The *C. pseudotuberculosis* PLD antigen used to coat plates was prepared by harvesting a fresh stationary phase culture of *E. coli* carrying a glutathione S-transferase/PLD fusion expressing plasmid. The harvested cells were resuspended in phosphate buffered saline and then sonicated to disrupt the cells. The PLD containing fusion protein was purified on a glutathione sepharose column [26]. The basic protease protein used in the ELISA was prepared as previously described [27]. The soluble native ApH protein was supplied by Dr Kevin Gale. The protein level in antigen preparations was determined by Bradford dye-binding assays [28].

3. Results

3.1. Constitutive expression of foreign antigens in *C. pseudotuberculosis*

Western blot analysis of total cell extracts from *C. pseudotuberculosis* cultures carrying the expression plasmids constructed for each potential vaccine antigen gene showed that all constructs directed expression of the expected protein as evidenced by the specific reaction of an appropriately sized product to the antibody probes used (Fig. 2). Control lanes of Toxminus (pEP2) protein extract were negative in all cases indicating that the fainter bands below the 45 kDa band in lane two and the 21.5 kDa band in lane 3 are either breakdown products of the full length protein or products of premature termination of transcription or translation.

The *M. leprae* 18-kDa antigen was constitutively expressed from the expression plasmids pTB62 and pTB114 (Fig. 2, lane 1) and also from the *C. pseudotuberculosis* clone in which the pTB114 expression cassette had been inserted into the chromosome via a double homologous cross-over event within the PLD gene (Fig. 2, lane 7). In the plasmid pTB62 the 18-kDa antigen is transcribed from its own promoter. In the pTB114 construct there are addition promoter elements from the PLD and erythromycin genes. Densitometric scanning of western blots indicated that a stronger western signal was generated by the plasmid with the tandem promoters. Even though the gene copy-number for the chromosomal insert is approximately 100-fold less than for the plasmid [29] it still produced a strong western blot signal.

The *T. ovis* 45W antigen was expressed as a fusion with the 18-kDa antigen (Fig. 2, lane 2). Constructs were made in which either 1 or 2 copies of the expression cassette were inserted into the plasmid vector.

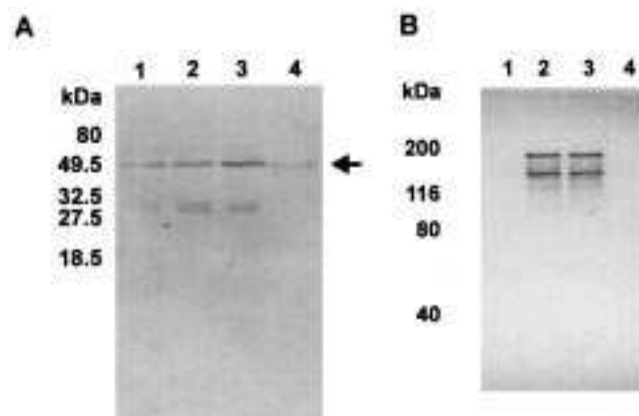


Fig. 3. Regulated expression of foreign antigens. Total cellular proteins were western blotted using foreign antigen specific antibodies. In each case the expression plasmid is a fusion plasmid containing both the foreign antigen expression cassette and the *lacI*^{18k} gene which control expression. Panel A; expression of 45W driven by the Trc promoter. Lane 1, Toxminus(pTB313) uninduced; lane 2, Toxminus(pTB313) induced 4 h; lane 3, Toxminus(pTB313) induced overnight; lane 4, Toxminus plasmidless negative control. The arrow indicates the position of the recombinant 45W protein. Panel B; expression of 11C5 antigen driven by the Trc promoter. Lane 1, Toxminus(pTB330) uninduced; lane 2, Toxminus(pTB330) induced 4 h; lane 3, Toxminus(pTB330) induced overnight; lane 4, Toxminus plasmidless negative control.

Western blot signal strength consistently showed that pTB177, the plasmid with the tandem copies, directed more protein expression than the single copy plasmid, pTB175. A chromosomal integrant of the expression cassette containing tandem copies of the fusion protein also produced sufficient recombinant protein to be detected by western blotting (Fig. 2, lane 6). The 45W antigen was also expressed from the plasmid pTB73. In this plasmid the 45W antigen gene is fused to the PLD promoter and secretion signal sequence region. Low level expression of a secreted form of 45W was detected as weak specific positive signals from dot blots of 100-fold concentrated culture extracts.

The *D. nodosus* basic protease was also expressed as a fusion between the 18-kDa antigen and the mature protease. Constitutive expression of the fusion protein could be detected by western blotting using either 18-kDa or protease specific antisera (Fig. 2, lane 3).

It was found that the *A. marginale* ApH antigen gene could be constitutively expressed from its native promoter in the plasmid fusion pTB241 (Fig. 2, lane 5).

The cloned PLD gene was previously mutated by site directed mutagenesis to change the histidine residue at position 20 of the mature protein to a serine residue [18]. This mutation inactivates the phospholipase activity of the molecule producing a genetically inactivated analogue PLD. In the present study the plasmid-borne mutated gene was expressed at high

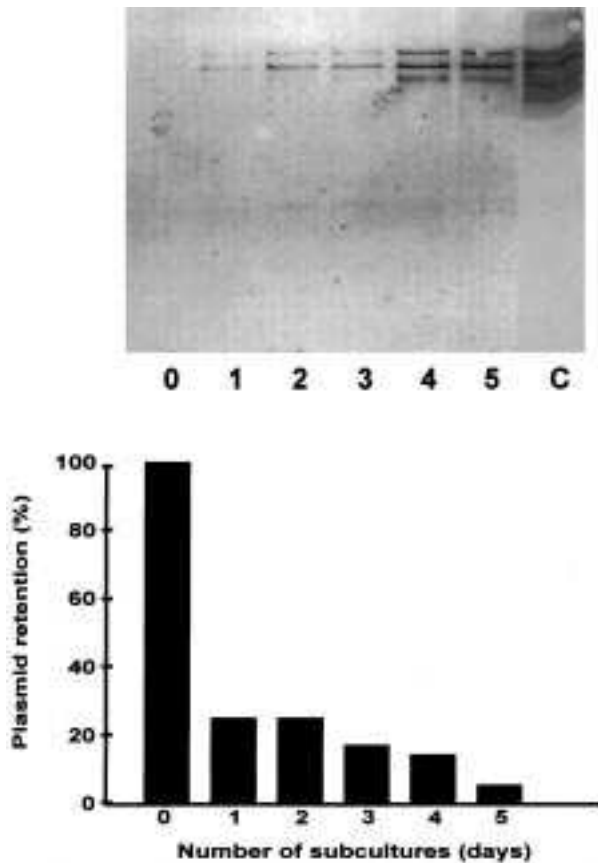


Fig. 4. Regulated gene expression by plasmid segregation. A Toxminus carrying both pTB332 (11C5 expression cassette) and pTB294 (*lacI*^{18k}) was constructed and maintained by selecting for both plasmids using kanamycin and hygromycin. When hygromycin was removed the repressor plasmid was lost (bottom panel) and this lead to a concomitant increase in the expression of the 11C5 antigen as demonstrated by the western blot of total cell lysates (upper panel). Lane C is a control lane in which expression was induced by addition of IPTG. The two major bands that appear early have molecular weights of approximately 130 and 160 kDa.

level in *C. pseudotuberculosis* Toxminus; it was easily detected using Coomassie blue staining of SDS-PAGE gels of culture supernatant (data not shown) and by western blotting (Fig. 2, lane 4). A mutated PLD gene was inserted into the *C. pseudotuberculosis* chromosome by homologous recombination. The recombinant strain of *C. pseudotuberculosis* had no PLD activity and the correct insert structure was confirmed by Southern blot analysis. The mutant protein, expressed from the chromosome, was detected by both Coomassie staining of SDS-PAGE and by western blotting (Fig. 2, lane 8), and was estimated by densitometric scanning of the Coomassie stained gels to be expressed to about 25% of the level made by the Toxminus strain carrying the plasmid borne copy of the gene. The plasmid free Toxminus strain produces no PLD product.

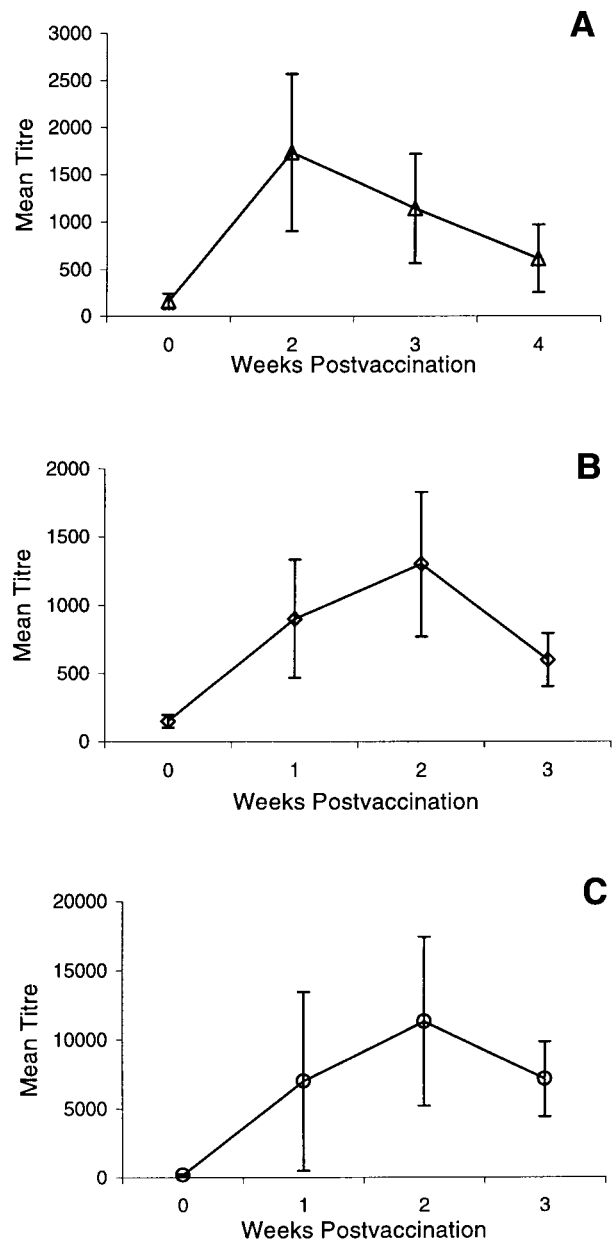


Fig. 5. Antibody responses induced by *C. pseudotuberculosis* Toxminus strains carrying foreign antigen expressing plasmids. Plasmids in vaccine strains were pTB241 expressing the *A. marginale* ApH antigen (panel A, △), pTB214 expressing the *D. nodosus* protease (panel B, ◇), and pTB253 expressing the genetically toxoided PLD (panel C, ○). The control group of sheep used for the experiment included two unvaccinated sheep and four sheep vaccinated with the Toxminus(pEP2) strain. When titred against the different antigens the control sera reacted only at background levels (<150).

3.2. Regulated expression of foreign antigens in *C. pseudotuberculosis*

Regulated expression of 45W was seen with the construct pTB313 (Fig. 3A, indicating not only that 45W was expressed but also the *lacI* gene. Many other 45W expression constructs that were designed and con-

structed either did not express the 45W antigen at a detectable level or could not be recovered in an intact form. It appears that high level expression of the 45W antigen may have a deleterious effect on the *C. pseudotuberculosis* host strain. This conclusion is supported by the finding that the P_{Trc}-45W construct could not be stably introduced into *C. pseudotuberculosis* strains not carrying a *lacI* gene or only carrying the *lacI*^q gene; the more highly expressed P_{18k}-*lacI* was required in order to recover transformants.

The P_{Trc} promoter was effective in directing expression of the 11C5 antigen gene. Expression was repressed in the presence of the P_{18k}-*lacI* gene and induced on addition of IPTG (Fig. 3B). Repression could also be relaxed by segregating out the plasmid carrying the expressed *lacI* gene (Fig. 4). The data show that with time the proportion of cells in culture containing the repressor plasmid reduces and there is a concomitant rise in the expression level of 11C5 protein from the P_{Trc} promoted gene.

3.3. Immunological response of sheep vaccinated with recombinant strains of *C. pseudotuberculosis* expressing foreign antigens

Recombinant strains of *C. pseudotuberculosis* Toxminus expressing vaccine antigens were used to vaccinate sheep. A single vaccination of *A. marginale* ApH, *D. nodosus* basic protease, or PLD toxoid expressing strains was sufficient to produce a serum IgG antibody response to the recombinant antigen expressed by each vaccine strain (Fig. 5). Sera from sheep vaccinated with Toxminus(pEP2) gave background ELISA levels equivalent to that seen with unvaccinated sheep. This indicates that the antibody response to the antigens was specific for the antigen and not a result of antibodies to *C. pseudotuberculosis* antigens cross-reacting with the recombinant antigens. The antibody response, in all cases, peaked two weeks after vaccination. In each group vaccinated with these antigens all four sheep mounted an antibody response to the recombinant antigen, but sheep to sheep variation in titre level was high, as reflected in the error bars. This high degree of variation in antibody response may result from the fact that an outbred sheep population was used. Vaccination with the recombinant strains expressing *T. ovis* 45W and *B. bovis* 11C5 antigens did not produce a detectable serum antibody response to the foreign antigen although antibody response to the vaccine vector (*C. pseudotuberculosis* Toxminus) was measured (data not shown).

4. Discussion

A variety of heterologous genes have been success-

fully expressed in *C. pseudotuberculosis* using a number of different strategies. The *A. marginale* ApH and *M. leprae* 18-kDa antigen genes were both successfully expressed from their native promoters, demonstrating that these promoters are functional in *C. pseudotuberculosis*. In the case of the *M. leprae* 18-kDa promoter, this activity was used to express two other foreign genes, the *T. ovis* 45W antigen and the *D. nodosus* basic protease.

The P_{Trc} promoter has been shown to be active in *C. pseudotuberculosis* and by linking the *lacI* gene to the 18-kDa promoter sufficient repressor could be produced to repress the P_{Trc} promoter. The *lacI*^q gene did not give a measurable level of repression in *C. pseudotuberculosis*, presumably because of poor expression. The repression by P_{18k}-*lacI* could be released by adding chemical inducer or by segregating out the plasmid carrying the expressed *lacI* gene. In a practical in vivo use of such strains addition of chemical inducer is obviously not feasible but it is possible that induction by plasmid segregation could be utilised as a means of obtaining in vivo gene expression. The ability to use a repressible promoter is important when the gene to be expressed is deleterious to the growth of the host bacteria. It allows growth of the bacteria without the deleterious gene being expressed and then subsequent removal of repression (induction) to allow expression. In other live bacterial vaccine vector systems in vivo inducible promoters such as *nirB* have been used to direct expression of foreign antigens [30] and it would be useful, in the future, to determine if such promoters or their analogues could be used in *C. pseudotuberculosis*.

After successfully expressing a range of potential vaccine antigens the next goal was to determine if the expressed antigens could elicit an immune response in vaccinated animals. Five of the strains expressing vaccine antigens were used to vaccinate sheep. In three cases the animals raised serum antibodies to the *C. pseudotuberculosis* vector and also the recombinant antigen. In the two other cases antibodies were induced to the vector but not the recombinant antigen. In the case of the 45W antigen this was not surprising, as the expression level of the antigen was very low. However, expression of the 11C5 antigen was considerably higher, being detectable in Coomassie stained gels, and this also did not produce an IgG response. At this stage we can only speculate on the reasons for this lack of response. Amongst the reasons for lack of immunogenicity are (a) the antigen is not as antigenic as the proteins that do elicit immune responses, (b) it may have been presented in a less suitable form, for example its solubility or folding may have been different, or (c) the plasmid may be unstable in vivo hence leading to lower than expected levels of antigen. Further work is required to investigate and define the

optimal way to deliver particular antigens. Another possible explanation for the lack of immune response to the 11C5 antigen is that although expression was induced in vitro, prior to inoculation of the strain (Toxminus(pTB330)) into the sheep, without the exogenous inducer (IPTG) the expression may be quickly repressed in vivo, thus reducing the level of antigen available to elicit an immune response. It will be interesting to investigate whether the strain (Toxminus(pTB332,pTB305)) carrying the repressor on a separate plasmid (pTB305) which can segregate away from the expression plasmid (pTB332) to relieve repression in vitro will function similarly in vivo and produce sufficient antigen to induce an immune response. Such an approach to the control of in vivo expression has been demonstrated in a *Salmonella*/mouse model [31].

The 18-kDa antigen from *M. leprae* has been identified as a potential vaccine candidate [21]. This antigen is not of veterinary importance. However, we were interested in attempting its expression because it is derived from the same large group of bacteria as the vector we are developing (the *Mycobacterium-Corynebacterium-Norcadia* grouping) and it was thought that it may therefore have a better chance of successful expression than the other antigens which are derived from unrelated organisms. The 18-kDa antigen promoter was indeed found to be active in *C. pseudotuberculosis* and now can be used as a useful tool in the expression of other genes.

The 45W antigen from *T. ovis* [22] was the first purified recombinant antigen, derived from a complex parasite, that was found to consistently give very high levels of protection in vaccination trials [32]. Expression of the 45W antigen appeared to be deleterious to *C. pseudotuberculosis* and hence it was difficult to express. This difficulty was addressed by three different approaches: (a) fusion of the 45W and 18-kDa reading frames to produce an 18-kDa/45W fusion protein; (b) secretion of 45W out of the cell by utilising the PLD secretion signal sequence; and (c) the use of the repressible P_{Trc} promoter. Each of these methods resulted in some low level expression. In this study it was not possible to achieve high level expression of the 45W antigen in *C. pseudotuberculosis* and the vaccination trial with the poorly expressing strain did not produce a detectable IgG response. In other systems it has been demonstrated that even when humoral and secretory antibodies cannot be detected good levels of protection can be induced [30], presumably because of the induction of cell-mediated immunity. Hence, although antibodies levels can be easily monitored and in some circumstances may be indicative of vaccine efficacy, the most important readout of an experimental vaccines potential is protective efficacy.

Dichelobacter nodosus is the causative agent of footrot in sheep [33]. The basic protease secreted by *D. nodosus* has been purified and when used in vaccinations has been shown to induce an immune response in sheep which can lead to high levels of protection against footrot [34]. We have expressed a recombinant version of this protein as an intracellular form fused to the 18-kDa antigen. This recombinant was capable of inducing an antibody response in vaccinated sheep. In *D. nodosus* the basic protease is secreted and it may be interesting, in the future, to manipulate the gene by the addition of secretion signal sequences, as has been done with the 45W antigen, to achieve secretion from *C. pseudotuberculosis*. The ability to present antigens in both secreted and intracellular forms may be important in optimising the presentation of selected antigens. It has been shown in other live bacterial vector systems that secretion and surface presentation [3,35,36] can enhance the immune response to some antigens, whereas other antigens are not significantly more immunogenic when presented in this way.

The ApH antigen from *A. marginale* is believed to offer some level of protection when purified native antigen is used to vaccinate cattle [25]. The work presented here demonstrates that the *A. marginale* ApH promoter is functional in *C. pseudotuberculosis* and directs sufficient antigen production to elicit an immune response when used in vaccination trials.

The 11C5 antigen from *Babesia bovis*, a tick-transmitted, haemoprotozoan pathogen of cattle, was chosen as a suitable antigen for this study because, like 45W, it had been characterised and shown to give good levels of protection when used in a recombinant form in vaccination experiments [23]. Expression of the antigen from the P_{Trc} promoter resulted in the highest level of expression seen for any of the antigens used in this study but when used in a vaccination trial did not produce a humoral immune response. In other systems there are precedents for well expressed antigens not inducing humoral responses [37].

In order to develop live recombinant vaccines acceptable to commercial partners and regulatory authorities it is necessary to produce strains that stably express the foreign antigen and do not contain antibiotic resistance genes. To address these two issues several of the antigen gene expression cassettes were integrated into the host vector chromosome at the PLD locus. The final products of the integration method that has been developed do not contain an intact antibiotic resistance gene and the expressed foreign antigen is stably maintained. This is in contrast to plasmid based systems which carry antibiotic resistance genes and can be somewhat unstable, particularly in vivo in vaccinated animals (data not shown). The ease with which chromosomal recombinants can be obtained in *C. pseudotuberculosis*, without any anti-

biotic resistance genes present, is a major advantage over other bacteria which are being investigated for use as live vaccine delivery vehicles.

The potential of *C. pseudotuberculosis* Toxminus for use as a live vaccine vector for the delivery of antigens of veterinary significance has been demonstrated. The expression systems developed offer a range of alternative approaches to antigen gene expression. Antigens can be expressed intracellularly or secreted, constitutively expressed or inducible, and as fusion proteins or in a native form. This flexibility offers the opportunity to express antigen genes in whichever form is most appropriate for the particular antigen. Further work is now required to enhance the level of foreign antigen expression and further evaluate the immune responses that are elicited by vaccination.

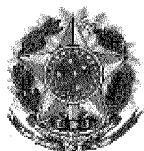
Acknowledgements

We would like to thank Dr Kevin Gale (CSIRO Tropical Agriculture) for supplying the 11C5 and ApH genes, purified native ApH protein, and anti-ApH antisera and Dr Marshal Lightowlers (University of Melbourne) for the supplying the 45W gene and antisera. The basic protease antisera and native protein was supplied by Dr David Stewart (CSIRO Animal Health). This work was supported in part by the Meat Research Corporation and the Cooperative Research Centre for Vaccine Technology.

References

- [1] Aldovini A, Young RA. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* 1991;351:479–82.
- [2] Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991;351:456–60.
- [3] Stover CK, Bansal GP, Hanson MS, et al. Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. *J Exp Med* 1993;178:197–209.
- [4] Curtiss R. 3. Attenuated *Salmonella* strains as live vectors for the expression of foreign antigens. In: Woodrow GC, Levine MM, editors. *New Generation Vaccines*. New York, NY: Marcel Dekker Inc, 1990. p. 161–88.
- [5] Roberts M, Chatfield SN, Dougan G. *Salmonella* as carriers of heterologous antigens. In: O'Hagan DT, editor. *Novel delivery systems for oral vaccines*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p. 27–58.
- [6] Hodgson AL, Krywult L, Corner LA, et al. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect Immun* 1992;60:2900–5.
- [7] Batey RG. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust Vet J* 1986;63:269–72.
- [8] Burrell DH. Caseous lymphadenitis vaccine. *NSW Vet Proc* 1983;19:53–7.
- [9] Eggleton DG, Doidge CV, Middleton HD, Minty DW. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: efficacy of monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Aust Vet J* 1991;68:320–1.
- [10] Eggleton DG, Haynes JA, Middleton HD, Cox LC. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid content and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Aust Vet J* 1991;68:322–5.
- [11] Pepin M, Paton M, Hodgson ALM. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Curr Top Vet Res* 1994;1:63–82.
- [12] Hodgson AL, Tachedjian M, Corner LA, Radford AJ. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 1994;62:5275–80.
- [13] Simmons CR, Hodgson AL, Strugnell RA. Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 1997;65:3048–56.
- [14] Simmons CR, Dunstan SJ, Tachedjian M, et al. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun* 1998;66:474–9.
- [15] Radford AJ, Hodgson AL. Construction and characterization of a *Mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector. *Plasmid* 1991;25:149–53.
- [16] Songer LG, Hilwig RW, Leeming MN, et al. Transformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by electroporation. *Am J Vet Res* 1991;52:1258–61.
- [17] Hodgson AL, Krywult J, Radford AJ. Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene from the *Corynebacterium* plasmid pNG2. *Nucleic Acids Res* 1990; 18.
- [18] Tachedjian M, Krywult L, Moore RJ, Hodgson AL. Caseous lymphadenitis vaccine development: sitespecific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine* 1995;13:1785–92.
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] Hodgson AL, Bird P, Nisbet IT. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 1990;172:1256–61.
- [21] Booth RL, Harris DR, Love LM, Watson JD. Antigenic proteins of *Mycobacterium leprae*. Complete sequence of the gene for the 18-kDa protein. *J Immunol* 1988;140:597–601.
- [22] Johnson KS, Harrison GB, Lightowlers MW, et al. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature* 1989;338:585–7.
- [23] Wright IG, Casu R, Commings MA, et al. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet Parasitol* 1992;44:3–13.
- [24] Lilley GG, Stewart DJ, Kortt AA. Amino acid and DNA sequences of an extracellular basic protease of *Dichelobacter nodosus* show that it is a member of the subtilisin family of proteases. *Eur J Biochem* 1992;210:13–21.
- [25] Riddles PW, Wright IG. Control of intraerythrocytic parasites. In: Yong WK, editor. *Animal parasite control utilizing biotechnology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992. p. 221–40.
- [26] Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988;67:31–40.
- [27] Kortt AA, Caldwell LB, Lilley GG, et al. Characterization of a basic serine proteinase (pI approximately 9.5) secreted by virulent strains of *Dichelobacter nodosus* and identification of a distinct, but closely related, proteinase secreted by benign strains. *Biochem J* 1994;299 (Pt 2):521–5.
- [28] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quanti-

- tation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [29] Zhang Y, Praszciec L, Hodgson A, Pittard AJ. Molecular analysis and characterization of a broad-host-range plasmid, pEP2. *J Bacteriol* 1994;176:5718–28.
- [30] Chatfield SN, Charles IG, Makoff AJ, et al. Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Biotechnology* 1992;10:888–92.
- [31] Ervin SE, Small Jr PA, Gulig PA. Use of incompatible plasmids to control expression of antigen by *Salmonella typhimurium* and analysis of immunogenicity in mice. *Microb Pathog* 1993;15:93–101.
- [32] Rickard MD, Harrison GB, Heath DD, Lightowlers MW. *Taenia ovis* recombinant vaccine — ‘quo vadit’. *Parasitology* 1995;110:5–9.
- [33] Thomas JH. The bacteriology and histopathology of foot rot in sheep. *Aust J Agric Res* 1962;13:725–32.
- [34] Stewart DJ, Kortt AA, Lilley GG. New approaches to footrot vaccination and diagnosis utilising the proteases of *Bacteroides nodosus*. In: von Tscharner C, Halliwell REW, editors. *Advances in veterinary dermatology*. London: Baillière Tindall, 1990. p. 359–69.
- [35] Hess L, Gentschev I, Miko D, et al. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1458–63.
- [36] Langemann S, Palaszynski SK, Burlein JE, et al. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J Exp Med* 1994;180:2277–86.
- [37] Anderson R, Dougan G, Roberts M. Delivery of the Pertactin/R69 polypeptide of *Bordetella pertussis* using an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain: expression levels and immune response. *Vaccine* 1996;14:1384–90.
- [38] Amann E, Ochs B, Abel KJ. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 1988;69:301–15.



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

(11) (21) **PI 0504782-0 A**



(22) Data de Depósito: 01/11/2005
(43) Data de Publicação: **18/09/2007**
(RPI 1915)

(51) Int. Cl⁷ .:
C12N 15/861 (2007.01)
C12N 15/10 (2007.01)
A61K 39/002 (2007.01)
A61P 33/02 (2007.01)

(54) Título: **ADENOVÍRUS RECOMBINANTES, PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DE ADENOVÍRUS RECOMBINANTES, COMPOSIÇÃO DE VACINA CONTRA TOXOPLASMOSE, E MÉTODO DE IMUNIZAÇÃO CONTRA INFECÇÕES CAUSADAS PELO PARASITA T. GONDII**

(71) Depositante(s): Fundação Oswaldo Cruz (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Ricardo Tostes Gazzinelli, Oscar Bruna-Romero, Bráulia Costa Caetano

(74) Procurador: Bhering, Almeida & Associados

(57) Resumo: Adenovírus recombinantes, Processo de construção de adenovírus recombinantes, Composição de Vacina contra toxoplasmose, e Método de imunização contra infecções causadas pelo parasita T.gondii. A presente invenção refere-se a construção dos adenovírus recombinantes com os genes que codificam para as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 do T.gondii, por meio da técnica de recombinação homóloga entre dois vetores. Um primeiro vetor que serve como vetor de transferência dos genes e um segundo vetor que possui o genoma adenoviral receptor desses genes. Utilização dos adenovírus recombinantes em uma composição de vacina de modo a se obter imunização contra infecções causadas pelo parasita T.gondii.

Adenovírus recombinantes, Processo de construção de adenovírus recombinantes, Composição de Vacina contra toxoplasmose, e Método de imunização contra infecções causadas pelo parasita *T.gondii*.

5 **CAMPO DA INVENÇÃO:**

Refere-se a presente invenção a um adenovírus recombinante e a um processo de construção de adenovírus recombinantes com os genes que codificam para as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 do parasita *T.gondii*, por meio da técnica
10 de recombinação homóloga entre dois vetores de transferência. Adicionalmente a presente invenção descreve uma composição de vacina utilizando adenovírus recombinantes e um método de imunização contra infecções causadas pelo parasita *T.gondii*.

15 **TÉCNICAS RELACIONADAS:**

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Dito protozoário é um parasita intracelular obrigatório, o qual pertence ao filo Apicomplexa. Dito protozoário é capaz de infectar qualquer
20 tipo de célula nucleada do organismo, principalmente as células do sistema nervoso central, endotélios e dos músculos estriados, como por exemplo, as células dos músculos esqueléticos e do coração (miocárdio).

O protozoário *T. gondii* apresenta um ciclo de vida
25 heteroxeno facultativo e possui como hospedeiros definitivos os felídeos, entretanto, o dito protozoário é bastante promíscuo em relação a seu hospedeiro intermediário, pois o hospedeiro intermediário pode ser o homem ou demais animais de sangue quente (homeotermos).

O ciclo do protozoário *T. gondii* inicia-se com a invasão das células do intestino delgado dos felinos, local no qual ocorre o ciclo enteroepitelial, caracterizado pela reprodução sexuada do parasita, denominada gametogônica, ou também conhecida como ciclo gametogônico. No dito ciclo aparece as células diferenciadas em gametas masculinos e femininos, os quais dão origem aos oocistos que são liberados nas fezes dos felinos.

Os oocistos, para se tornarem infectantes para outros animais, sofrem processo de esporulação, de modo que cada um dos oocistos origina dois esporocistos, os quais por sua vez dão origem cada um a quatro esporozoítos. Tais oocistos infectantes são capazes de sobreviver à digestão gástrica, ao ácido sulfúrico na concentração de 1%, ao dicromato de potássio a 2,5% e ao hipoclorito na concentração de 2,5%, e de manterem-se viáveis muitos meses em ambiente úmido e arejado.

Após a ingestão de água ou alimentos contaminados pelos oocistos infectantes pelo hospedeiro intermediário ou pelo próprio felídeo, o parasita é liberado da célula sob a forma de esporozoítos e estes penetram na mucosa intestinal, na qual se reproduzem rapidamente. Uma vez na mucosa intestinal, os esporozoítos sofrem diversas divisões celulares, de modo a gerar os taquizoítos, os quais invadem outras células, inclusive as células de defesa do organismo, como por exemplo os macrófagos.

Os macrófagos por serem células móveis e circularem junto com o sangue, levam o parasita em seu interior para os gânglios linfáticos regionais, nos quais o processo de

multiplicação tem continuidade. Desta forma, o parasita pode ser disseminado pela via linfática e sanguínea por todo organismo.

Os taquizoítos são a forma assexuada do parasita, a qual prolifera rapidamente, de forma a se disseminar pela circulação sanguínea ou outros tecidos do organismo, nos quais invadem as células nucleadas. Os taquizoítos apresentam diversas estruturas comuns às demais células animais, como por exemplo, as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, além de apresentarem organelas características do filo, como por exemplo, os anéis polares, conóide, roptrias e micronemas. Alguns taquizoítos, após a invasão da célula hospedeira desenvolvem-se mais lentamente de modo a formar os bradizoítos, os quais irão formar os cistos teciduais.

Os cistos intactos não causam nenhum dano ao hospedeiro intermediário e podem persistir por longos períodos ou por toda a vida do hospedeiro intermediário sem causar a este nenhuma resposta inflamatória ou despertar resposta tecidual significativa.

O destino dos cistos teciduais não é totalmente conhecido, mas se propõe que às vezes os cistos se rompem durante o seu ciclo de vida, de modo a liberar os bradizoítos, os quais podem ser destruídos pelo sistema imune do hospedeiro intermediário ou formar novos cistos.

A parede do cisto é dissolvida por enzimas digestivas do organismo humano e os bradizoítos liberados são capazes de penetrar nas células epiteliais do intestino, de modo a disseminar-se por todo o indivíduo no caso dos hospedeiros

intermediários e no caso dos hospedeiros definitivos, ocorrer a formação de oocistos, os quais são excretados nas fezes, de forma a contaminar assim o ambiente e outros animais.

5 Humanos adquirem a infecção por *T. gondii* principalmente através da ingestão de oocistos presentes em água e alimentos contaminados acidentalmente por fezes de felídeos, ou por meio da ingestão de carne e vísceras cruas ou mal cozidas de animais cronicamente infectados e
10 portadores de cistos teciduais.

Outras formas menos freqüentes de contaminação pelo parasita *T. gondii* ocorrem por meio de transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais e transfusão de sangue de indivíduos na fase aguda da infecção.

15 A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns em inúmeras regiões no mundo com importância médica e veterinária. Acredita-se que um terço da população mundial esteja infectada com o *T. gondii*. Apesar da alta freqüência de infecção dentro das populações, a ocorrência
20 de sinais clínicos de toxoplasmose é baixa, já que a infecção adquirida (pós-natal) em indivíduos imunologicamente competentes leva ao desenvolvimento de uma resposta imune eficaz no controle do parasita. No entanto, existem relatos da ocorrência de lesões oculares em
25 indivíduos sabidamente infectados na fase adulta.

A toxoplasmose adquirida possui um maior impacto nos indivíduos com comprometimento do sistema imune. A toxoplasmose em pacientes imunocompetentes geralmente é benigna, entretanto, devido ao comprometimento do sistema

imune, uma infecção crônica pode ser reativada e se manifestar de forma grave.

Em pacientes soropositivos, o protozoário é o responsável pelo desenvolvimento de uma variedade de sintomas da doença, entretanto, o sintoma mais freqüente é a encefalite, onde a rápida multiplicação dos taquizoítos resulta na destruição dos tecidos neurais. Nestes pacientes, um aspecto importante é a possível reativação da infecção devido a presença de cistos latentes. Estima-se que 40% dos pacientes portadores do vírus do HIV desenvolvem encefalite por toxoplasma, sendo que 10 a 30% destes pacientes atingem ao óbito.

A toxoplasmose disseminada também pode ser uma complicação em transplantes de órgãos e medula óssea, de modo a resultar tanto do transplante de órgãos de doadores infectados com *T. gondii* para um doador susceptível, quanto da reativação da infecção latente nos receptores devido à terapia imunossupressora.

Entretanto, as maiores complicações relacionadas à toxoplasmose decorrem da infecção congênita ou pré-natal. A transmissão transplacentária do protozoário *T. gondii* ocorre quando a gestante entra em contato pela primeira vez com o dito protozoário durante a gestação.

Se a infecção primária se der antes da gravidez, a imunidade adquirida impede a transmissão do protozoário ao feto em exposições subseqüentes. No entanto, se a gestante sofrer um comprometimento da função imune, pode haver infecção do feto. Nas últimas três décadas, a incidência de infecção pré-natal tem sido estimada entre 1 a 100 por cada

10.000 nascimentos em diferentes países. O risco de transmissão aumenta com o tempo de gestação, de 14% no primeiro trimestre para 59% no último.

Em contrapartida, os efeitos da infecção sobre o feto são reduzidos durante o avanço da gestação, de modo que a maioria dos neonatos é assintomática ao nascimento, mas freqüentemente apresentam seqüelas devido a infecção congênita no decorrer da vida.

A toxoplasmose também tem sido freqüentemente diagnosticada em pacientes comprometidos com câncer, os quais estão sob intenso tratamento com quimioterápicos. Dentre as complicações diagnosticadas em pacientes com câncer estão o aparecimento de coriorretinite associada com encefalite, bem como complicações em outros órgãos.

Um segundo aspecto relevante da toxoplasmose são as perdas econômicas na pecuária. Principalmente na suinocultura e ovinocultura, a infecção com *T. gondii* causa grandes perdas, devido a aborto, natimortos e malformações fetais. Portanto, a transmissão congênita da toxoplasmose tem impacto importante também nos índices de produção de rebanhos suínos e ovinos.

Com a instalação do parasita no organismo hospedeiro têm início o processo de resposta imunológica produzida pelo sistema imune do indivíduo. Dito processo compreende uma resposta imunológica primária, a qual consiste em uma imunidade inata não específica, mediada por macrófagos e células "natural killer" (NK). Adicionalmente, dita resposta primária é caracterizada pelo aparecimento dos primeiros anticorpos circulantes, sendo estes

imunoglobulinas do tipo M (IgM) de elevado peso molecular (19S), as quais podem mediar mecanismos de aglutinação, líticos ou fixação de complemento. Em seguida, o sistema produz uma imunidade retardada, a qual é mediada por células do sistema retículo endotelial, caracterizada pelo aparecimento dos anticorpos denominados de IgG, de baixo peso molecular (7S).

As células NK são ativadas diretamente por produtos do parasita e secretam interferon gama (IFN- γ). Os macrófagos também são estimulados diretamente por produtos do parasita e secretam interleucina 12 (IL-12). A IL-12 juntamente com um fator de necrose tumoral (TNF) atuam em conjunto com as interleucinas, IL-1 β e IL-15, sobre as células NK e adicionalmente, estimulam a produção de IFN- γ .

O IFN- γ age nos próprios macrófagos, de modo a aumentar a sua capacidade microbicida e de síntese de IL-12. Uma outra propriedade do IFN- γ é ativar a síntese de quimiocinas envolvidas no recrutamento de linfócitos T e atuar como co-fator da IL-12 na diferenciação de células Thp em células efetoras Th1.

A regulação da intensidade da resposta imunológica e da inflamação causada pelo parasita *T. gondii* é realizada pelos próprios macrófagos do sistema imunológico, os quais também produzem citocinas do tipo 2 de ação anti-inflamatória, como por exemplo, a IL-10 que inibe a síntese de IL-12 pelos macrófagos e a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos Th1, e a IL-4, a qual potencializa os efeitos da IL-10 sobre os macrófagos e induz a

diferenciação de precursores Thp em células efetoras com perfil Th2.

Na medida em que a resposta imune se desenvolve pelo sistema imune do hospedeiro, ocorre a eliminação das formas
5 taquizoítos, o aparecimento das formas bradizoítos e a formação de cistos teciduais.

Entretanto, as formas císticas do parasita persistirão por muitos anos e mesmo toda a vida do hospedeiro infectado, caso o mesmo não venha a perecer do mal. Nestas
10 situações, o indivíduo torna-se um portador assintomático do parasita, com alto título de anticorpos em seu organismo. Caso os cistos se multipliquem no interior das células de forma lenta, o estímulo antigênico é mantido, e somente no caso de ocorrerem doenças intercorrentes ou
15 medicação imunossupressora, poderá acontecer a reativação da toxoplasmose, com rompimento de tais cistos e extravasamento dos mesmos para o tecido pericístico vizinho.

Na fase crônica da infecção, os níveis de citocinas
20 são reduzidos e a manutenção do controle da infecção passa a depender do desenvolvimento da imunidade adquirida por meio da ativação de células T específicas.

Peptídeos derivados do parasita *T. gondii* são apresentados aos linfócitos, associados a moléculas do
25 Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) e moléculas co-estimulatórias, num ambiente rico em citocinas do tipo 1.

O resultado desta apresentação de peptídeos é a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em células

produtoras de IFN- γ , de modo que os linfócitos efetores T CD8⁺ também desenvolvem uma atividade citolítica sobre as células infectadas pelo parasita *T. gondii*.

De maneira semelhante ao que acontece na fase aguda da
5 infecção, o IFN- γ possui um papel importante na fase crônica da infecção. Na fase crônica da infecção nos macrófagos, essa citocina (IFN- γ) ativa o gene da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a síntese de níveis moderados de intermediários reativos de nitrogênio (RNI), o
10 que resulta em um aumento da capacidade microbicida dos macrófagos.

O IFN- γ ainda auxilia na diferenciação dos linfócitos T citotóxicos; aumenta a expressão de MHC em células infectadas e favorece a diferenciação de linfócitos B em
15 células produtoras de IgG1 (humanos) ou IgG2a (camundongos). Os anticorpos, a despeito de não possuírem papel importante na resposta inicial ao patógeno, podem exercer diferentes funções na fase crônica, tais como opsonização, fixação do complemento ou mediação de efeito
20 citotóxico dependente de anticorpos.

Atualmente, a prevenção e o controle da toxoplasmose dependem de medidas de vigilância epidemiológica, manejo sanitário e inspeção. Essas ações têm como objetivo identificar e eliminar fontes de infecção, de modo a
25 reduzir a taxa de transmissão do *T. gondii* dentro dos grupos de risco, como as mulheres em idade fértil e os pacientes imunocomprometidos.

As medidas para prevenção da infecção causada pelo *T. gondii* não são suficientes para evitar a ocorrência de

surtos de toxoplasmose, e a despeito da doença ser tratável com antibióticos, o rápido desenvolvimento de resistência as bases químicas pelo parasita restringe a quantidade de medicamentos disponíveis para o tratamento.

5 Dessa forma, a utilização de vacinas anti-toxoplasma se constitui em uma alternativa importante para o controle da doença. O principal objetivo de uma vacina contra *T. gondii* é gerar uma resposta imunológica nos diversos hospedeiros, de modo a controlar a replicação do parasita e
10 sua transmissão dentro de uma população.

Os estudos de resposta imune mediante a infecção com cepas atenuadas de *T. gondii* levaram ao desenvolvimento da primeira vacina comercial contra o parasita, para uso em ovinos. Essa vacina é composta das formas taquizoítos
15 modificadas da cepa S48, que após a inoculação subcutânea em ovelhas não imunes, faz com que os taquizoítos multipliquem-se em linfonodos locais, de modo a causar uma resposta febril benigna. O pico dos títulos de anticorpos é alcançado em cerca de seis semanas. A imunidade conferida
20 por essa vacina envolve provavelmente uma resposta celular com ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, com um perfil Th1.

Outras cepas atenuadas por irradiação - como a ts-4, um mutante sensível à temperatura - se mostraram eficientes
25 na geração de resposta imune celular e proteção contra desafio com cepas patogênicas de *T. gondii* em camundongos. No entanto, o uso de tais imunógenos em humanos é improvável, dado ao fato de que os taquizoítos presentes em

sua composição estão vivos e podem reverter a um estado patogênico e causar a doença.

Um exemplo de um método de produção de anticorpos para a infecção causada pelo *T. gondii*, encontra-se descrito no documento EP 638.316 (correspondente ao PI9403202). No dito documento é descrito um método de produção de anticorpos ou imunidade mediada por célula a um organismo infeccioso em um mamífero de sangue quente que compreende administrar, ao dito mamífero de sangue quente, intranasalmente, intramuscularmente ou subcutaneamente, adenovírus recombinantes vivos em que a proteína estrutural viriônica está inalterada em relação àquela do adenovírus nativo a partir do qual o adenovírus recombinante é produzido, e que contêm o gene que codifica para o antígeno correspondente aos ditos anticorpos ou de maneira a induzir a dita imunidade mediada por célula.

Uma composição vacinal também é descrita no documento WO 01/43768. No dito documento é descrito uma composição vacinal, a qual compreende uma proteína de toxoplasma, SAG3 com uma sequência (S) de 385 aminoácidos, ou seu derivado imunogênico, em combinação com um adjuvante adequado e/ou de suporte. No dito documento, é descrito que uma proteína truncada de toxoplasma - SAG3, preferivelmente purificada, na qual especialmente uma região âncora da SAG3 é ausente. O termo "derivado imunogênico" compreende qualquer molécula, como por exemplo, um truncado ou um outro derivado da proteína, a qual retém a habilidade de induzir uma resposta imune da proteína devido à administração interna em humanos, ou em um animal, ou o qual retém a

habilidade de reagir com anticorpos presentes no soro ou em uma outra amostra biológica de *Toxoplasma gondii* infectante de humanos e animais. Estes derivados imunogênicos podem ser preparados pela adição, deleção, substituição ou rearranjo do aminoácido ou por modificações químicas deste.

Uma vacina eficaz proporciona o desenvolvimento da imunidade prévia à infecção causada pelo parasita, de modo a impedir a liberação dos oocistos pelos hospedeiros definitivos. Além disso, dita vacina eficaz pode prevenir a formação de cistos teciduais nos hospedeiros intermediários e sua transmissão oral via ingestão de alimento contaminado. Uma vacina também poderia impedir a toxoplasmose aguda em gestantes e a transmissão transplacentária.

Construir um adenovírus recombinante requer técnicas diferenciadas de biologia molecular, de forma que dois adenovírus recombinantes com capacidade de expressão da mesma proteína podem ser absolutamente diferentes, bem como suas capacidades de proteção contra a correspondente infecção devido à forma de sua construção molecular.

Outra particularidade, está no fato de que o que faz um determinado adenovírus recombinante funcionar como ferramenta terapêutica não é só o fato do vírus ser gerado, mas sim, um conjunto de fatores que incluem o correto desenho do genoma viral artificial construído, o tipo de vírus recombinante gerado e a inclusão das seqüências de DNA que podem codificar o antígeno na correta posição no genoma viral.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO:

Em linhas gerais, a invenção apresenta a construção dos adenovírus recombinantes com os genes que codificam para as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 do *T.gondii*, por meio da técnica de recombinação homóloga entre dois vetores de transferência.

Um primeiro objetivo da presente invenção é proporcionar adenovírus recombinantes com os genes que codificam para as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 do *T.gondii*.

Um outro objetivo da invenção se refere a um processo de construção de adenovírus recombinantes com os genes que codificam para as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 do parasita *T.gondii*, por meio da técnica de recombinação homóloga entre dois vetores de transferência.

Ainda um outro objetivo da invenção é apresentar uma composição de vacina utilizando adenovírus recombinantes.

Um outro objetivo da invenção é proporcionar um método de imunização contra infecções causadas pelo parasita *T.gondii*.

O mecanismo de ação das vacinas baseadas em adenovírus recombinantes consiste na infecção de células do hospedeiro e expressão intracitoplasmática dos antígenos heterólogos pelas células infectadas, que pode ou não ser acompanhada da secreção do antígeno produzido. Os adenovírus recombinantes são capazes de infectar células imunes especializadas na apresentação de antígenos, como as células dendríticas, o que torna estes vetores altamente imunogênicos.

Além disso, algumas proteínas que compõem o capsídeo viral têm efeito imuno-estimulador, ou seja, são capazes de potencializar a resposta imune, bem como ajudar no direcionamento do perfil de citocinas produzidas pelas células efectoras para um tipo Th1, importante na proteção contra agentes parasitários como o *Toxoplasma gondii*.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS:

A Figura 1 mostra o esquema geral do processo de construção dos vírus recombinantes.

10 A Figura 2A mostra os iniciadores da reação desenhados para amplificação dos genes sem a porção 3'.

A Figura 2B mostra os iniciadores da reação de amplificação da proteína SAG3.

15 A Figura 3 mostra a presença do gene recombinante e a expressão das proteínas SAG1 e SAG2.

A Figura 4 mostra as etapas de clonagem da SAG3, com a substituição do peptídeo sinal original do gene por um peptídeo sinal viral.

20 A Figura 5 mostra a expressão das diferentes proteínas SAGs com os adenovírus recombinantes.

A Figura 6A mostra uma comparação dos resultados dos testes de ELISA dos soros dos animais imunizados com a AdSAG1 frente aos antígenos do protozoário *T. gondii*, relacionado a presença do anticorpo IgG.

25 A Figura 6B mostra uma comparação dos resultados dos testes de ELISA dos soros dos animais imunizados com a AdSAG2 frente aos antígenos do protozoário *T. gondii*, relacionado a presença do anticorpo IgG.

A Figura 6C mostra uma comparação dos resultados dos testes de ELISA dos soros dos animais imunizados com a AdSAG3 frente aos antígenos do protozoário *T. gondii*, relacionado a presença do anticorpo IgG.

5 A Figura 6D mostra uma comparação dos resultados dos testes de ELISA dos soros dos animais imunizados com uma mistura de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 frente aos antígenos do protozoário *T. gondii*, relacionado a presença do anticorpo IgG.

10 A Figura 7A mostra os resultados da contagem do número de cistos presentes no cérebro de camundongos BABLB/c no experimento com AdSAG1, no experimento com AdSAG2, e no experimento com a mistura dos dois vetores.

15 A Figura 7B mostra os resultados da contagem do número de cistos presentes no cérebro de camundongos BABLB/c no experimento AdSAG3 e no experimento com a mistura dos três vetores.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO:

20 A presente concretização, descreve um processo de construção dos adenovírus recombinantes com genes que codificam para as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 do *T.gondii*. Dito processo de construção ocorre por meio da técnica de recombinação homóloga entre dois vetores (plasmídeos). Dita técnica de recombinação homóloga utiliza:

25 - um vetor de transferência, o qual pode ser qualquer plasmídeo que contenha um cassete de expressão adaptado a células eucariotas flanqueado por seqüências homólogas de adenovírus humano preferencialmente do tipo 5. Adicionalmente, plasmídeos que possuam seqüências de outros

adenovírus humanos, tais como os adenovírus 1, 2, 4 e 7, e plasmídeos que possuam seqüências de adenovírus de macacos como SA7P, 1, 22, 23, 24 e 25 também poderiam ser empregados na técnica de recombinação homóloga, pois os

5 adenovírus exemplificados apresentam um alto grau de similaridade com o adenovírus humano tipo 5, o qual foi empregado na presente concretização; e

- um vetor contendo o genoma completo do adenovírus humano, preferencialmente do tipo 5, como por exemplo, o pJM17.

10 Na presente concretização, os plasmídeos pCMVlink1 e pMV60 foram empregados alternativamente como vetores de transferência. Cada um desses plasmídeos apresenta um cassete de expressão, dentro do qual existem sítios de clonagem múltiplos. No plasmídeo pCMVlink1, o dito cassete

15 é composto de um promotor de citomegalovírus e uma seqüência de poliadenilação do vírus SV40. No plasmídeo pMV60 o cassete de expressão é composto de um promotor de citomegalovírus e uma seqüência de poliadenilação de citomegalovírus.

20 Os vetores de transferência (plasmídeos) também possuem seqüências do adenovírus, preferencialmente do tipo 5 flanqueando o cassete de expressão e um gene de resistência à ampicilina.

O plasmídeo pJM17 consiste no genoma do adenovírus

25 humano tipo 5 modificado. Dita modificação ocorre devido a inserção de um segmento de DNA exógeno, como por exemplo o plasmídeo pBRX, em uma região do genoma viral, especificamente, a região E1. Nessa região E1 estão contidos os genes que codificam as proteínas responsáveis

pela replicação do genoma viral e a inserção do DNA exógeno rompe com estes genes da região E1. Portanto, a inserção do plasmídeo pBRX na região E1 torna o pJM17 deficiente em replicação.

5 O plasmídeo pJM17 só pode ser replicado especificamente em células da linhagem HEK293. Ditas células foram transformadas com fragmentos de DNA de adenovírus humano do tipo 5 derivados da região E1 do genoma viral. Dessa forma, as células HEK293 expressam as
10 proteínas responsáveis pelo controle da replicação viral e pode fornecer tais proteínas de forma complementar, o que permite a replicação do genoma viral modificado.

Adicionalmente, a inserção do plasmídeo pBRX à região E1 faz com que o tamanho do genoma do adenovírus exceda a
15 capacidade de empacotamento de material genético do capsídeo viral. Desta forma, mesmo que um genoma viral modificado pJM17 seja introduzido numa célula permissiva, como por exemplo a célula, HEK293A e mesmo que o genoma viral seja replicado e expresso, não haverá montagem de
20 novas partículas virais pelo excesso de tamanho de genoma.

No processo de recombinação homóloga entre os vetores de transferência e o plasmídeo pJM17, o cassete de expressão do vetor de transferência, o qual contém o gene da proteína SAG, é transferido para o plasmídeo pJM17, de
25 forma a substituir toda a região E1. Dita substituição da região E1 resulta em um genoma viral, o qual pode ser replicado numa célula permissiva e pode ser empacotado no capsídeo para montagem de novas partículas virais, uma vez que a eliminação da região E1 reduz o tamanho do genoma.

A Figura 1 mostra o esquema geral do processo de construção dos vírus recombinantes. Dito processo de construção dos vírus recombinantes compreende as etapas de:

- clonagem dos genes de adenovírus que codificam as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 no vetor de transferência,
- co-transfecção dos vetores de transferência e do genoma do adenovírus,
- recombinação homóloga intracelular entre os vetores de transferência e o genoma do adenovírus,
- amplificação do genoma viral recombinante
- purificação das partículas virais em um gradiente adequado, como por exemplo, em um gradiente de césio, e
- caracterização da expressão das proteínas de interesse.

Na etapa de clonagem, os genes das proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e a partir do DNA genômico de uma cepa de *T. gondii* e na forma de taquizoítos. A cepa de *T. gondii* utilizada na presente concretização foi à cepa RH.

No caso das proteínas SAG1 e SAG2, os iniciadores da reação, representados esquematicamente na Figura 2A, foram desenhados para um pareamento em uma posição interna nas seqüências de SAG1 e SAG2 e amplificação genes da SAG 1 e da SAG2 sem a porção 3'. Dita porção 3' do gene SAG1 corresponde aos últimos 69 nucleotídeos da seqüência do dito gene e a dita porção 3' do gene SAG2 corresponde aos 51 últimos nucleotídeos do dito gene. Esses nucleotídeos codificam, nas respectivas proteínas, o motivo de adição de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Um motivo de adição de âncora de GPI consiste dos 23 e 17 últimos aminoácidos da porção carboxi-terminal das proteínas SAG1 e SAG2, respectivamente, os quais servem de sinal demarcatório para adição de uma molécula de GPI. Dita molécula de GPI é uma estrutura lipídica, a qual é ligada às proteínas SAG1 e SAG2 logo após a síntese das ditas proteínas.

A função da âncora de GPI é mediar a ligação das proteínas SAG1 e SAG2 na membrana plasmática do parasita *T. gondii*. A adição de âncora de GPI nas proteínas SAG1 e SAG2 é um mecanismo peculiar do *T. gondii*, que pode não ser reproduzido fielmente numa célula de hospedeiro mamífero (onde se pretende expressar as citadas proteínas). Dessa forma a presença do dito motivo de adição de GPI nos genes SAG1 e SAG2 poderia ativar mecanismos errôneos de processamento das proteínas SAG1 e SAG2 logo após a sua síntese dentro das células de mamífero. Para evitar que possíveis erros de processamento acontecessem e prejudicassem a expressão de SAG1 e SAG2 nas células dos hospedeiros mamíferos, optou-se na presente concretização por clonar os respectivos genes sem o motivo de adição de GPI.

Nos iniciadores diretos da reação de PCR para amplificação dos genes SAG1 e SAG2 foram inseridos sítios de restrição para a endonuclease BglII e a sequência de reconhecimento ribossomal de Kozac. Nos iniciadores reversos, foram inseridos sítios de restrição para HindIII e códon de parada TGA.

Para amplificação do gene SAG3 foram empregados os iniciadores representados na Figura 2B. Ditos iniciadores foram projetados para permitir um pareamento em posições internas do gene SAG3 e amplificação do dito gene sem a
5 extremidade 5' e sem a porção 3'. A dita porção 3' corresponde aos 69 últimos nucleotídeos do gene SAG3 e tem as suas características e suas funções similares as dos genes SAG1 e SAG2. A retirada dessa porção obedece aos mesmos critérios utilizados para a retirada da porção dos
10 genes SAG1 e SAG2.

A dita porção 5' corresponde ao 105 primeiros nucleotídeos do gene SAG3, os quais codificam, na proteína SAG3, o peptídeo sinal de endereçamento ao retículo endoplasmático (PS). Dito peptídeo é responsável pelo
15 transporte da proteína SAG3 para o retículo endoplasmático rugoso logo após a síntese da proteína SAG3.

O processo de reconhecimento do peptídeo sinal e endereçamento intracelular da proteína SAG3 é um mecanismo peculiar do *T. gondii*, que pode não ser reproduzido
20 fielmente pelas células de um hospedeiro mamífero (onde se deseja expressar a proteína). Isso pode acarretar erros de processamento da proteína SAG3 logo após a sua síntese em células de mamífero. Para evitar possíveis erros e prejuízo da expressão da proteínas SAG3, optou-se por clonar o gene
25 SAG3 sem o citado peptídeo sinal.

Os iniciadores diretos da reação de amplificação da proteína SAG3 possuem um sítio de restrição para endonuclease EcoRI e os iniciadores reversos da reação possuem um sítio de BamHI e um códon de parada TGA.

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose a aproximadamente 1%, e as bandas do gel correspondentes a cada gene foram eluídas de fragmentos de gel com o uso de um "kit" de purificação comercial.

Após a eluição dos produtos da reação de PCR, ditos produtos e os vetores de transferência foram submetidos ao processo de digestão por meio da reação com as suas correspondentes endonucleases, numa proporção preferencial de 10 unidades de enzima/ μ g de DNA, a uma temperatura aproximada de 37°C, durante cerca de 3 horas.

Após o procedimento de digestão, foram realizadas reações de ligação entre os produtos da reação de digestão com uma enzima adequada, como por exemplo a enzima T4-ligase, a uma temperatura aproximada de 16 °C durante cerca de 3 horas, de modo a manter preferencialmente a proporção molar 3:1 de inserto/plasmídeo, e preferencialmente 10 unidades de enzima por reação.

Os produtos da reação de ligação foram empregados na transformação da bactéria *Escherichia coli*. Na presente concretização se utilizou a linhagem XLI-Blue quimiocompetente da bactéria *Escherichia coli*.

As bactérias transformantes foram crescidas em cultivo adequado, o qual continha um meio de cultura adequado, como por exemplo, o meio LB. Ao meio LB foi adicionado aproximadamente 100 μ g/ml de ampicilina. Preferencialmente, dito cultivo ocorreu no período de 16-18 horas e os plasmídeos recombinantes foram purificados com "kits" comerciais de isolamento de plasmídeos. Os plasmídeos podem

ser alternativamente purificados por meio de lise alcalina das bactérias recombinantes com tampão contendo hidróxido de sódio e dodecil sulfato de sódio, seguida de neutralização do lisado bacteriano com tampão composto de
5 ácido acético glacial e acetato de potássio e posterior filtração do lisado e precipitação dos plasmídeos com isopropanol.

Os genes SAG1 e SAG2 foram clonados de maneira orientada no plasmídeo pCMVlink1. A presença do gene
10 recombinante foi confirmada pela observação do perfil de digestão do plasmídeo purificado, e a expressão das proteínas SAG1 e SAG2 foi determinada por meio da técnica de transfecção de células eucariotas, como por exemplo a HEK293, com os plasmídeos recombinantes contendo os genes
15 SAG1 e SAG2, seguida da detecção das proteínas no lisado das células transfectadas por meio da técnica de "Western-blot", conforme mostrado na Figura 3.

O processo de clonagem do gene SAG3 foi diferenciado devido à realização de novas etapas durante o dito
20 processo. As novas etapas realizadas permitiram a substituição do peptídeo sinal original do gene por um peptídeo sinal viral, conforme mostrado na Figura 4.

Com a utilização dos iniciadores esquematizados na Figura 2B, o gene SAG3 foi amplificado, de modo a
25 excluir-se a região correspondente ao peptídeo sinal.

Em seguida o gene SAG3 foi inserido no plasmídeo pcDNA3.1. Antes de se realizar a clonagem do gene SAG3, dito plasmídeo pcDNA3.1 passou por um processo de preparação, o qual consistiu da introdução do fragmento de

DNA que codifica o peptídeo sinal da hemaglutinina do vírus influenza (HASS) dentro do cassete de expressão do citado plasmídeo.

Após essa preparação, o gene SAG3 também foi inserido
5 no cassete de expressão do plasmídeo pcDNA3.1, de maneira orientada. O dito gene SAG3 foi ligado em sequência ao fragmento de DNA HASS, seguindo o marco de leitura do referido fragmento.

A sequência híbrida HASS-SAG3 foi retirada do
10 plasmídeo pcDNA3.1, por meio de clivagem com a endonuclease BamHI. Em seguida, a molécula híbrida HASS-SAG3 foi clonada no cassete de expressão do plasmídeo pMV100.

O cassete de expressão completo, o qual contém a molécula HASS-SAG3 foi retirado do plasmídeo pMV100 por
15 meio de uma reação de digestão com uma enzima adequada, como por exemplo, a enzima HindIII.

Após a reação de digestão, o cassete de expressão completo contendo a molécula híbrida HASS-SAG3 foi clonado no plasmídeo pMV60, num sítio localizado entre duas regiões
20 de homologia nos adenovírus presentes no plasmídeo pMV60.

Em todas as etapas de clonagem, a presença do gene da proteína SAG3 foi avaliada por meio do perfil obtido durante as reações de digestão dos plasmídeos e a expressão da proteína SAG3 pela construção final da molécula pMV60-
25 HASS-SAG3 foi avaliada por meio de transfecção de células permissivas, como por exemplo, as células HEK293A e detecção da proteína no lisado celular em "Western-blot", conforme visto na Figura 4.

Para a recombinação homóloga e a construção dos adenovírus, o procedimento utilizado na presente invenção foi o método de co-transfecção ou transfecção simultânea de 2 plasmídeos, por meio da precipitação com cloreto de cálcio (CaCl_2), sobre monocamadas de células permissivas.

Para a geração do adenovírus recombinante com gene SAG1 (AdSAG1) foram co-transfectados o plasmídeo pJM17 e o vetor de transferência pCMVlink1-SAG1. Para a construção do adenovírus recombinante com gene SAG2 (AdSAG2) foram co-transfectados o pJM17 e o vetor de transferência pCMVlink1-SAG2. Para construção do adenovírus contendo o gene SAG3 (AdSAG3) foram co-transfectados o plasmídeo pJM17 e o vetor de transferência pMV60-HASS-SAG3.

Para que ocorresse a transfecção (co-transfecção), foi necessária a realização de um primeiro procedimento para preparação das células permissivas. Durante esse primeiro procedimento de preparação das células permissivas, como por exemplo, as células HEK293A foram semeadas preferencialmente em placas de 6 poços, numa densidade aproximada de 600.000 células/poço. A cada poço foi adicionado cerca de 3ml/poço da célula HEK293A, ditas células foram cultivadas cerca de 24 horas a uma temperatura preferencial de 37°C e em uma atmosfera com aproximadamente 5% de CO_2 , de um meio de cultura adequado, como por exemplo o meio DMEM, o qual estava suplementado com aproximadamente 5% de soro fetal bovino, bicarbonato de sódio a uma concentração preferencial de 5mM, HEPES a uma concentração preferencial de 25mM e cerca de 40mg/l de

gentamicina. Dito meio e cultura é denominado meio DMEM completo.

Para a geração de cada um dos adenovírus foi realizada pelo menos uma reação de co-transfecção. Cada reação de co-
5 transfecção foi realizada em um poço individual de uma placa de 6 poços, contendo uma monocamada de aproximadamente 600.000 células.

Após aproximadamente às 24 horas de cultivo, as monocamadas de células permissivas, presentes nos poços da
10 placa foram lavadas pelo menos uma vez com cerca de 1ml/poço de um meio de cultura adequado, como por exemplo o meio DMEM completo, de modo que todas as células mortas presentes nos poços fossem retiradas. Até o momento da
adição dos reagentes de transfecção e dos plasmídeos, as
15 placas de 6 poços contendo as monocamadas lavadas foram mantidas em cultivo com cerca de 3ml de meio DMEM completo/poço, a uma temperatura preferencial de 37° C e atmosfera de 5% de CO₂.

Para geração do AdSAG1 foi montada a seguinte reação
20 de co-transfecção: aproximadamente 5µg do plasmídeo pJM17 e cerca de 5µg do vetor de transferência pCMVlink1-SAG1 foram diluídos juntamente em água preferencialmente deionizada e estéril q.s.p. 450µl.

A essa mistura foram adicionados cerca de 50µl de uma
25 solução estéril de CaCl₂ em uma concentração preferencial de 2,5M. Em um tubo preferencialmente cônico de polipropileno foram adicionados cerca de 500µl de uma solução tampão adequada. Na presente concretização utilizou-se a solução tampão HeBS 2X, de modo a manter o

valor do pH na faixa de 7,05-7,12. Dita solução tampão é composta de cloreto de sódio na concentração preferencial de 280mM, HEPES na concentração preferencial de 50mM e fosfato de sódio dibásico preferencialmente a 1mM.

5 Cerca de 500µl da mistura contendo o vetor pJM17, o vetor pCMVlink1-SAG1 e CaCl₂ previamente preparada foram adicionados gota a gota nos 500µl do tampão HeBS aliqotado no tubo de polipropileno. O tampão HeBS foi mantido sob agitação constante, por meio de injeção de ar, durante todo
10 o processo de gotejamento da mistura de plasmídeo e CaCl₂. Aproximadamente 1000µl da mistura de plasmídeos, CaCl₂ e tampão HeBS, chamada de reação de transfecção, foram deixados em descanso durante aproximadamente 30 minutos em temperatura preferencial de 25°C para que houvesse a
15 formação do precipitado. Dito precipitado consiste de cristais de fosfato de cálcio associados a DNA plasmidial.

Após o período de incubação, a dita reação de transfecção foi agitada em equipamento adequado, como por exemplo um "vortex", e foram adicionados a referida reação
20 de transfecção cerca de 3ml do meio de cultura DMEM completo. Aproximadamente 4ml finais da reação de transfecção adicionada de DMEM completo foram imediatamente transferidos para um dos poço de uma placa de cultivo contendo aproximadamente 600.000 células permissivas
25 HEK293. O meio DMEM completo, no qual as células estavam sendo mantidas em cultivo foi devidamente retirado do poço antes da adição da reação de transfecção com meio novo.

Para geração do AdSAG2 foi montada a seguinte reação de co-transfecção: aproximadamente 5µg do plasmídeo pJM17 e

cerca de 5µg do vetor de transferência pCMVlink1-SAG2 foram diluídos juntamente em água preferencialmente deionizada e estéril q.s.p. 450µl.

5 A essa mistura foram adicionados cerca de 50µl de uma solução preferencialmente estéril de CaCl_2 em uma concentração preferencial de 2,5M. Em um tubo preferencialmente cônico de polipropileno foram adicionados cerca de 500µl da solução tampão adequada HeBS 2X.

10 Cerca de 500µl da mistura contendo o vetor pJM17, o vetor pCMVlink1-SAG2 e CaCl_2 previamente preparada foram adicionados gota a gota nos 500µl do tampão HeBS aliqotado no tubo de polipropileno. O tampão HeBS foi mantido sob agitação constante, por meio de injeção de ar, durante todo o processo de gotejamento da mistura de plasmídeo e CaCl_2 .

15 Aproximadamente 1000µl da reação de transfecção resultantes foram deixados em descanso durante cerca de 30 minutos em temperatura preferencial de 25°C para que houvesse a formação de um precipitado de cristais de fosfato de cálcio associados a DNA plasmidial.

20 Após o período de incubação da mistura, a mesma foi agitada em "vortex" e foram adicionadas cerca de 3ml do meio de cultura DMEM completo. Aproximadamente 4ml finais da reação de transfecção adicionada de DMEM completo foram imediatamente transferidos para um poço de uma placa de 25 cultivo contendo aproximadamente 600.000 células. O meio DMEM completo no qual as células estavam sendo mantidas em cultivo foi devidamente retirado do poço antes da adição da reação de transfecção com meio novo.

Para geração do AdSAG3 foi montada a seguinte reação de co-transfecção: aproximadamente 5µg do plasmídeo pJM17 e cerca de 5µg do vetor de transferência pMV60-HASS-SAG3 foram diluídos juntamente em água preferencialmente deionizada e estéril q.s.p. 450µl. A essa mistura foram adicionados cerca de 50µl de uma solução estéril de CaCl₂ em uma concentração preferencial de 2,5M.

Em um tubo preferencialmente cônico de polipropileno foram adicionados cerca de 500µl da solução tampão HeBS 2X. Cerca de 500µl da mistura contendo o pJM17, o pMV60-HASS-SAG3 e CaCl₂ previamente preparada foram adicionados gota a gota nos 500µl do tampão HeBS 2X aliqotado no tubo de polipropileno.

O tampão HeBS 2X foi mantido sob agitação constante, por meio de injeção de ar, durante todo o processo de gotejamento da mistura de plasmídeos e CaCl₂. Aproximadamente 1000µl da reação de transfecção resultantes deixados em descanso durante aproximadamente 30 minutos em temperatura preferencial de 25°C para que houvesse a formação do precipitado de fosfato de cálcio associado a DNA plasmidial.

Após a incubação, a dita reação de transfecção foi agitada em "vortex" e foi adicionada de cerca de 3ml de DMEM completo. Aproximadamente 4ml finais da reação de transfecção adicionada de DMEM completo foram imediatamente transferidos para um poço de uma placa de cultivo contendo aproximadamente 600.000 células. O meio DMEM completo no qual as células estavam sendo mantidas em cultivo foi

devidamente retirado do poço antes da adição da reação de transfecção com meio DMEM novo.

As placas de cultivo contendo as monocamadas de células permissivas adicionadas com as reações de transfecção foram cultivadas com as ditas reações durante o período preferencial de 16-18 horas, para que houvesse a capitação dos plasmídeos.

Após o período de cultivo preferencial de 16-18 horas, os poços da placa foram lavados preferencialmente 2 vezes com uma solução adequada, como por exemplo uma solução de PBS para que houvesse a retirada do excesso de precipitado.

As células permissivas foram tratadas com uma solução de tripsina, preferencialmente divididas na proporção de 1:3 e novamente cultivadas em um meio de cultura adequado, como por exemplo, em 4ml/poço de meio de cultura DMEM completo, a uma temperatura aproximada de 37°C e atmosfera preferencial com 5% de CO₂. As células permissivas foram preferencialmente cultivadas até o momento de desenvolvimento da recombinação homóloga intracelular dos plasmídeos em cerca de 4ml/poço de DMEM completo, a uma temperatura aproximada de 37°C e atmosfera preferencial com 5% de CO₂. Durante esse período, os 4ml meio DMEM completo dos poços foram substituídos por aproximadamente 4ml de meio DMEM completo novo, sendo esta troca realizada aproximadamente a cada 72 horas.

A formação e a replicação de adenovírus recombinantes no cultivo das células permissivas foi evidenciado pelo aparecimento do efeito citopático e formação de placas de lise na monocamada de células.

Após a recombinação homóloga, geração e replicação dos adenovírus recombinantes, ocorre a formação das placas de lise nas monocamadas de células permissivas e conseqüente liberação de partículas virais recombinantes para o meio de cultivo. Nesse ponto, tais cultivos de células permissivas infectadas passam a ser denominados de cultivos primários de adenovírus recombinantes. Aproximadamente 4ml de material sobrenadante dos ditos cultivos primários de adenovírus foram coletados e utilizados para a primeira amplificação dos adenovírus recombinantes.

Durante o período de preparação de células permissivas para primeira amplificação dos adenovírus, o dito material sobrenadante dos cultivos primários era estocado preferencialmente em alíquotas de 2ml, a cerca de -70°C , em tubos de polipropileno, sem adição de conservantes.

Para a primeira amplificação de cada adenovírus recombinante, 1 garrafa de cultivo de 25cm^2 foi semeada com células permissivas HEK293 em 7ml meio DMEM completo e cultivadas preferencialmente a 37°C e 5% CO_2 .

Quando a monocamada na garrafa atingia em torno de 90-95% de confluência, procedia-se o processo de infecção das células da monocamada com as partículas virais contidas no material sobrenadante dos cultivos primários.

Para a dita infecção, os 7ml meio DMEM completo antigo eram retirados da garrafa e substituído por aproximadamente 2ml de material sobrenadante obtido de um cultivo primário. A garrafa era então incubada por cerca de 60 minutos a uma temperatura de cerca de 37°C , sem ventilação.

Após esse período, o volume da garrafa era completado para aproximadamente 7ml, acrescentando-se cerca de 5ml de meio DMEM completo novo. As garrafas de 25cm² infectadas, chamadas aqui de cultivos secundários de adenovírus, eram
5 cultivadas durante cerca de 48 horas a uma temperatura de cerca de 37°C, sem ventilação.

Depois desse período, todas as células se encontravam infectadas e desprendiam-se do fundo das garrafas. O conteúdo das garrafas de cultivo secundário eram estocados
10 em alíquotas de cerca de 7ml, em tubos de polipropileno e sem adição de conservantes, preferencialmente a -70°C.

Para a segunda amplificação de cada adenovírus recombinante, 1 garrafa de cultivo de 175cm² foi semeada com células permissivas HEK293 em 35ml meio DMEM completo e
15 cultivadas preferencialmente a 37°C e 5% CO₂.

Quando a monocamada na garrafa atingia em torno de 90-95% de confluência, procedia-se o processo de infecção das células da monocamada com o material sobrenadante dos cultivos secundários.

20 Para a dita infecção, os 35ml meio DMEM completo antigo eram retirados da garrafa e substituídos por aproximadamente 7ml de material sobrenadante obtido dos cultivos secundários mais 7ml de meio de DMEM completo novo. A garrafa era então incubada por cerca de 60 minutos
25 a uma temperatura de cerca de 37°C, sem ventilação.

Após esse período, o volume da garrafa era completado para aproximadamente 40ml, acrescentando-se 25ml de meio DMEM completo novo. A garrafa infectada era cultivada

durante cerca de 48 horas a uma temperatura de cerca de 37°C, sem ventilação.

Depois desse período, todas as células se encontravam infectadas e desprendiam-se do fundo das garrafas. O material sobrenadante obtido numa garrafa de 175cm² era estocado preferencialmente em alíquotas de 40ml, a cerca de -70°C, em tubos de polipropileno, sem adição de conservantes.

Para a amplificação em larga escala de cada adenovírus e a produção de estoques virais purificados, as células permissivas HEK293A foram semeadas preferencialmente em 12 garrafas de cultivo de 175cm², as quais continham um meio de cultura adequado, como por exemplo, o meio DMEM completo. Ditas células permissivas foram cultivadas preferencialmente em 35ml de DMEM completo, a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ até atingirem aproximadamente 90-95% de confluência.

Após as células permissivas terem atingido cerca de 90-95% de confluência, foi realizada a infecção das ditas células.

Para o procedimento de infecção, 40ml do material sobrenadante obtido numa garrafa de cultivo de 175cm² previamente infectada eram diluídos em 140ml de meio DMEM completo novo. Aproximadamente 35ml de meio DMEM completo antigo era retirado das garrafas de cultivo de 175cm² e substituído por 15ml de material sobrenadante diluído.

As 12 garrafas eram incubadas por 60 minutos a cerca de 37°C, sem ventilação. Após esse período, o volume da garrafa era completado para aproximadamente 40ml,

acrescentando-se 25ml de meio DMEM completo novo. As garrafas infectadas eram cultivadas durante cerca de 48 horas a uma temperatura de cerca de 37°C, sem ventilação.

Após o período de incubação para aparição do efeito citopático e do descolamento das células permissivas, o conteúdo das garrafas de incubação foi coletado e centrifugado a aproximadamente 300g durante cerca de 10 minutos, a uma temperatura preferencial de 4°C.

Após a etapa de centrifugação, as células permissivas foram ressuspensas em uma solução tampão adequada, como por exemplo, uma solução tampão Tris 0,1M pH=8,0 e lisadas com preferencialmente com uma solução de deoxicolato de sódio 0,5%, durante cerca de 30 minutos, em banho de gelo.

Em seguida, o extrato de células permissivas obtido na etapa anterior, foi homogeneizado manualmente com aparelho homogeneizador de vidro e cerca de 10mL do dito extrato foi adicionado a um volume aproximado de 5,8mL de uma solução saturada preferencialmente de cloreto de cézio.

A nova mistura obtida foi centrifugada a aproximadamente 100.000g durante cerca de 16 horas para que houvesse bandeamento das partículas virais. Após a centrifugação da nova mistura, a suspensão de adenovírus foi coletada e realizada a sua dessalinização por meio de uma técnica adequada. Na presente concretização utilizou-se a técnica de diálise.

A diálise realizada foi feita contra uma solução tampão adequada, como por exemplo a solução tampão Tris 0,01M durante cerca de 4 horas, a uma temperatura preferencial de 4°C. Os vírus purificados obtidos após a

diálise foram congelados preferencialmente com 10% de glicerol a uma temperatura preferencial de -70°C .

Na etapa de titulação dos vírus em células HEK293A permissivas, ditas células foram semeadas preferencialmente em placas de 24 poços, numa densidade aproximada de 300.000 células/poço. Dita placa continha em seus poços um meio de cultura adequado, como por exemplo, o meio de cultura DMEM completo. As células foram cultivadas durante aproximadamente 24 horas, numa temperatura preferencial de 37°C e numa atmosfera com cerca de 5% de CO_2 .

Os estoques de vírus obtidos na etapa de replicação e na etapa de purificação foram preferencialmente diluídos em série, preferencialmente em placas de cultivo de 96 poços, com cerca de $225\mu\text{l}$ de meio DMEM completo por poço, com um fator de diluição preferencial igual a 10. Cada uma das diluições foi realizada em quadruplicata, e cerca de $200\mu\text{l}$ de cada uma das réplicas das diluições 10^{-7} a 10^{-12} foram utilizadas para infectar um poço com 300.000 células permissivas.

A infecção foi feita por meio de incubação das placas de cultivo de 24 poços, com cerca de $200\mu\text{l}$ por poço das citadas diluições de adenovírus, durante cerca de 60 minutos numa temperatura em torno 37°C , numa atmosfera preferencial de 5% de CO_2 . Após essa incubação o volume de meio de cada poço foi aumentado para 1,7ml por meio da adição de 1,5ml de DMEM completo novo.

Os cultivos foram mantidos a uma temperatura aproximada de 37°C e em cerca de 5% de CO_2 , durante cerca de 7 dias até o momento em que houvesse o aparecimento de

placas de lise na monocamada de células. O título foi calculado a partir da maior diluição de vírus, o qual levou a formação das placas de lise e dito título foi expresso em número de unidades formadoras de placa de lise por 5 mililitro de estoque viral (u.f.p./ml).

A expressão das diferentes proteínas SAGs com os adenovírus recombinantes foi avaliada "in vitro" por meio da técnica de "Western-blot" realizada para o extrato de células permissivas, HEK293A infectadas contra soro de 10 coelho imunizado com antígeno total de *T. gondii*. Como mostrado na Figura 5, observar-se que os vírus são capazes de induzir a expressão de proteínas únicas, as quais reagem prontamente com o soro do animal imunizado.

A seguir, a presente invenção será descrita 15 detalhadamente através de exemplo. É necessário frisar que a invenção não está limitada a esse exemplo, mas que também inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela funciona.

Exemplo: Avaliação da capacidade imunogênica dos adenovírus
20 com os genes das proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 em camundongos
BALB/c

Os adenovírus recombinantes com os genes das proteínas SAG1 (AdSAG1), SAG2 (AdSAG2) e SAG3 (AdSAG3) foram submetidos a uma avaliação da sua capacidade imunogênica em 25 camundongos BALB/c. Em um esquema de imunização, no qual envolve-se a iniciação e o reforço (prime/boost) homólogo. Em dito esquema de imunização, grupos preferenciais de 10 fêmeas com cerca de 6-8 semanas de idade receberam preferencialmente duas aplicações subcutâneas de cerca de

10⁹ p.f.u. de adenovírus preferencialmente com seis semanas de intervalo entre as aplicações.

Em cada experimento de imunização foram organizados 6 grupos vacinais: um primeiro grupo vacinado com AdSAG1, um
5 segundo grupo vacinado com AdSAG2, um terceiro vacinado com AdSAG3, um quarto grupo que recebeu a mistura dos adenovírus AdSAG1, AdSAG2 e AdSAG3 em quantidades equivalentes (AdMIX), um quinto grupo que recebeu um
10 os adenovírus aplicados ao grupo controle foram os adenovírus AdCS, o qual codifica para proteína CS de *Plasmodium yoelii* ou o adenovírus AdlacZ, o qual codifica para a β -galactosidase, e um grupo que não recebeu nenhum tipo de inóculo. Os experimentos de imunização com essa
15 composição de grupos foram repetidos duas vezes.

A produção de anticorpos IgG anti-SAG foi avaliada em amostras de soro obtidas em sangrias realizadas cerca de 10 dias após o esquema de imunização ter sido completado. Foram realizados testes de ELISA contra antígenos
20 purificados de membrana da forma taquizoítos e "western-blot" contra os extratos totais da forma taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*.

As Figuras 6A, 6B, 6C e 6D mostram uma comparação dos resultados dos testes de ELISA. Observar-se um aumento
25 significativo da reatividade (O.D.) dos soros dos animais imunizados frente aos antígenos do protozoário *T. gondii*, relacionado a presença do anticorpo IgG. Têm-se que para as Figuras 6A, 6B, 6C e 6D, a nomenclatura NI significa que os animais não foram imunizados; a nomenclatura AdLACZ

representa os animais imunizados com adenovirus que expressa β -galactosidade; a nomenclatura AdCS representa os animais imunizados com adenovirus que expressa a proteína CS do *Plasmodium yoelii*; a nomenclatura AdMIX representa ao

5 animais imunizados com a mistura de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3

Adicionalmente, detectou-se um maior nível de produção de anticorpos do subtipo IgG2a em relação ao anticorpo IgG1. Dito nível de produção é um indicativo da ativação de uma resposta imune do tipo Th1 contra os antígenos codificados

10 pelos do adenovirus. A especificidade desses anticorpos é confirmada por meio da reação de "Western-blot", na qual o soro dos animais imunizados reage com as formas nativas dos antígenos em extrato total de taquizoítos de *T. gondii*, conforme mostrado na Figura 6.

15 Dito esquema de imunização permite uma avaliação preliminar da capacidade protetora dos adenovirus recombinantes. Nesta avaliação os animais imunizados foram desafiados com a cepa P-Br de *T. gondii*, a qual se caracteriza por causar infecções crônicas em camundongos,

20 acompanhadas da formação de cistos teciduais nos ditos animais. A cepa P-Br é classificada pelas suas características como uma cepa cistogênica).

Neste procedimento para avaliação, preferivelmente no 14º dia após a imunização, cada um dos animais recebeu uma

25 dose oral de cerca de 20 cistos da cepa P-Br e cerca de 45 dias após ministrada dita dose, os animais foram sacrificados.

Após o sacrifício dos ditos animais, realizou-se a coleta do cérebro dos animais e uma contagem do número de

cistos presentes no cérebro. Para a realização da contagem de cistos, o cérebro de cada camundongo foi macerado individualmente em 1ml de tampão PBS. A maceração foi feita manualmente usando tubos cônicos de vidro de 5ml e bastões de vidro.

Para a contagem, duas alíquotas de 10 μ l de cada macerado de cérebro foram coladas sobre lâminas de vidro próprias para microscopia e cobertas com lamínulas de vidro com área preferencial de 22cm x 22cm. A contagem dos cistos foi feita em microscópio óptico, sob um aumento de 400x, em toda a área coberta pelas lamínulas.

Como resultado da dita contagem, observou-se que o esquema de imunização para o protozoário *T. gondii* utilizado proporcionou uma redução significativa na carga de cistos cerebrais. Em experimentos independentes, os níveis de redução nas cargas de cistos foram cerca de 50 a 60% para AdSAG1, cerca de 60 a 70% para AdSAG2, cerca de 70% para AdSAG3 (um único experimento até o momento) e cerca de 80% para a mistura dos 3 adenovírus (um único experimento até o momento). Os resultados da contagem do número de cistos presentes no cérebro obtidos no experimento com AdSAG1, no experimento com AdSAG2, no experimento com AdSAG3 e no experimento com a mistura dos três vetores é mostrado na Figura 7A e na Figura 7B.

A invenção aqui descrita, assim como os aspectos abordados devem ser considerados como uma das possíveis concretizações. Deve, entretanto ficar claro que a invenção não está limitada a essas concretizações e, aqueles com habilidade na técnica irão perceber que, qualquer

característica particular nela introduzida, deve ser entendida apenas como algo que foi descrito para facilitar a compreensão e não podem ser feitas sem se afastar do conceito inventivo descrito. As características limitantes do objeto da presente invenção estão relacionadas às reivindicações que fazem parte do presente relatório.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção dos adenovírus recombinantes com os genes que codificam para as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 do *T.gondii*, cepa RH, caracterizado por compreender as etapas:

- clonagem dos genes de adenovírus que codificam as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 sem motivo de adição de âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) no vetor de transferência;

- co-transfecção dos vetores de transferência e do genoma do adenovírus;

- recombinação homóloga intracelular entre os vetores de transferência e o genoma do adenovírus;

- amplificação do genoma viral recombinante;

- purificação das partículas virais em um gradiente adequado;

- caracterização da expressão das proteínas de interesse.

2. Processo de obtenção dos adenovírus recombinantes de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a presença do gene recombinante ser confirmada pelo perfil de digestão e posterior sequenciamento do plasmídeo purificado, a expressão das proteínas SAG1 e SAG2 ser determinada por meio da técnica de transfecção de células eucariotas, seguida da detecção das proteínas no lisado das células transfectadas por meio da técnica de "Western-blot".

3. Processo de obtenção dos adenovírus recombinantes de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o processo de clonagem do gene SAG3 ser diferenciado devido a

substituição do peptídeo sinal original do gene por um peptídeo sinal viral.

4. Processo de obtenção dos adenovírus recombinantes de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o
5 plasmídeo pcDNA3.1 receptor do gene da SAG3 ser preparado por meio da introdução do fragmento de DNA que codifica o peptídeo sinal da hemaglutinina do vírus influenza (HASS) dentro do cassete de expressão do dito plasmídeo.

5. Processo de obtenção dos adenovírus recombinantes
10 de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a presença do gene da proteína SAG3 ser avaliada por meio das reações de digestão e posterior seqüenciamento dos plasmídeos, a expressão da proteína SAG3 ser avaliada por meio de transfecção de células permissivas, detecção da
15 proteína no lisado celular por meio da técnica de "Western-blot".

6. Processo de obtenção dos adenovírus recombinantes de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a
geração do adenovírus recombinante com gene SAG1 (AdSAG1)
20 ocorrer por meio da co-transfecção do plasmídeo pJM17 e o vetor de transferência pCMVlink1-SAG1, o gene SAG2 (AdSAG2) ocorrer por meio da co-transfecção do plasmídeo pJM17 e o vetor de transferência pCMVlink1-SAG2 e o gene SAG3 (AdSAG3) ocorrer por meio da transfecção do plasmídeo pJM17
25 e o vetor de transferência pMV60-HASS-SAG3.

7. Composição de vacina utilizando os adenovírus recombinantes obtido conforme reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a estrutura viral ser modificada a partir da inserção de

fragmentos de DNA exógeno substituindo a região El original do genoma do adenovirus humano do tipo 5.

8. Composição de vacina utilizando os adenovirus recombinantes de acordo com a reivindicação 7,
5 caracterizado por a administração dos adenovirus recombinantes ser realizada pelo menos 2 vezes por meio de aplicação subcutânea.

9. Composição de vacina utilizando os adenovirus recombinantes de acordo com a reivindicação 7 e 8,
10 caracterizado por ocorrer um aumento significativo da reatividade (O.D.) dos soros dos animais imunizados frente aos antígenos do protozoário *T. gondii*, relacionado a presença de anticorpos IgG.

10. Composição de vacina utilizando os adenovirus
15 recombinantes de acordo com a reivindicação 7 e 8,
caracterizado por o esquema de imunização para o protozoário *T. gondii* utilizado proporcionar uma redução na carga de cistos cerebrais de 50 a 60% para AdSAG1, cerca de 60 a 70% para AdSAG2, cerca de 70% para AdSAG3 e cerca de
20 80% para a mistura dos 3 adenovirus.

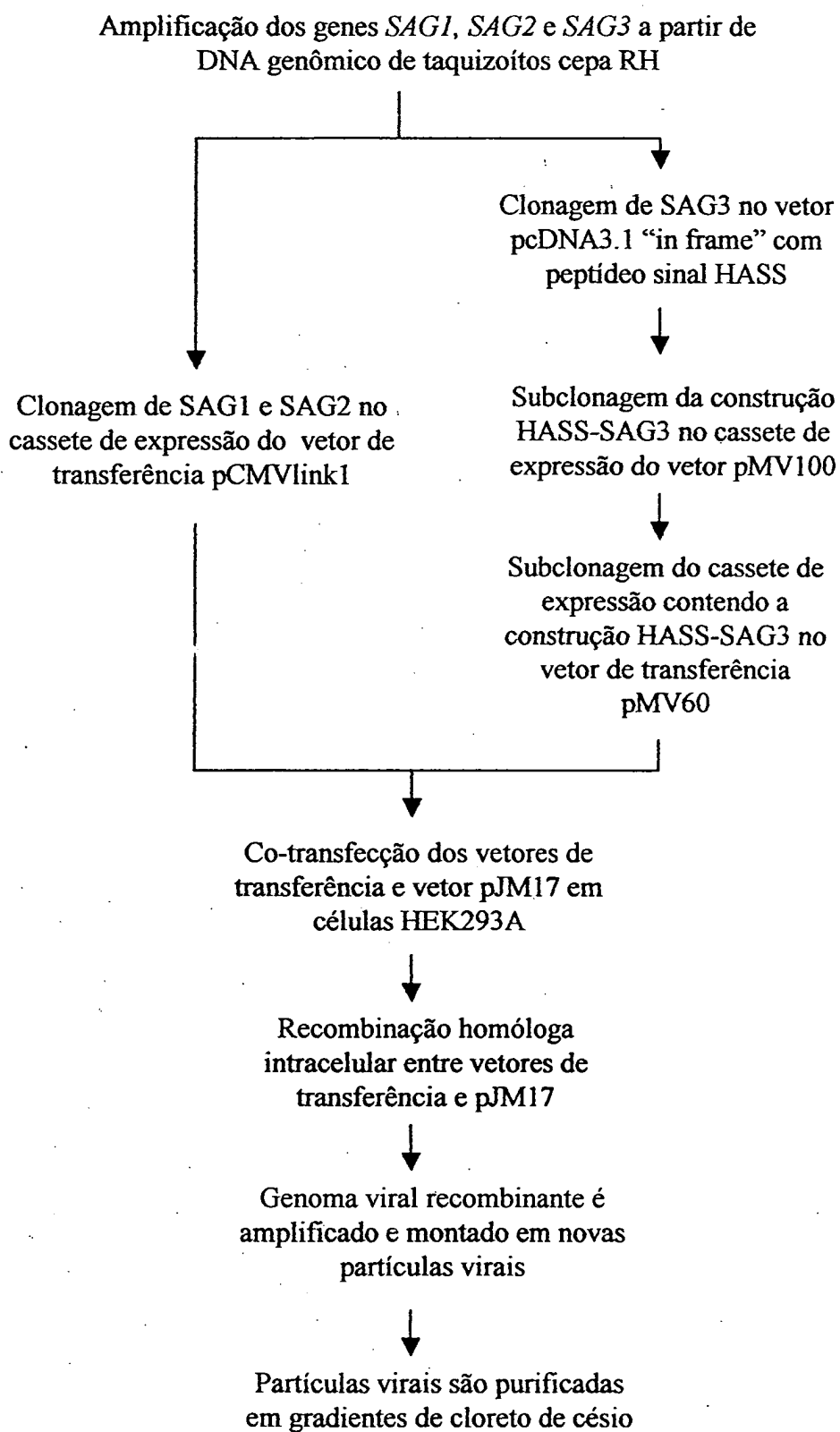


FIGURA 1

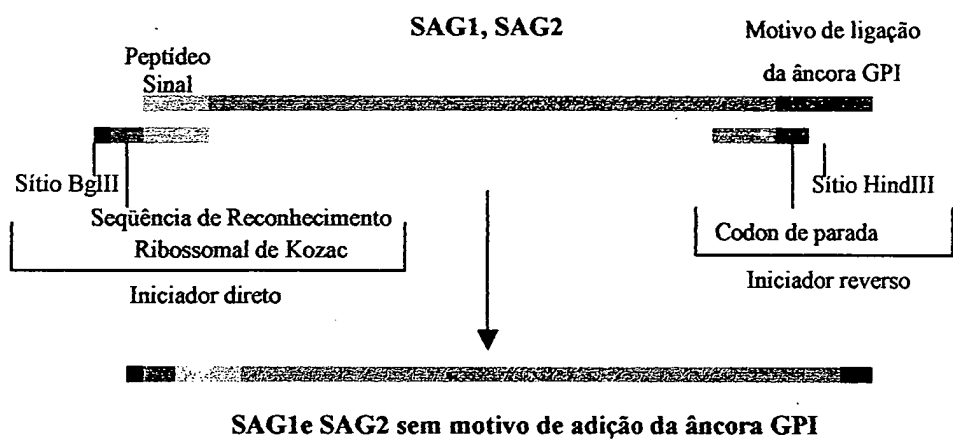


FIGURA 2A

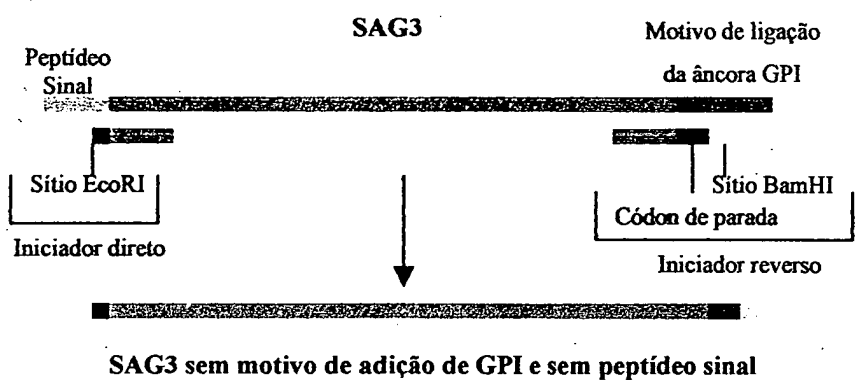


FIGURA 2B

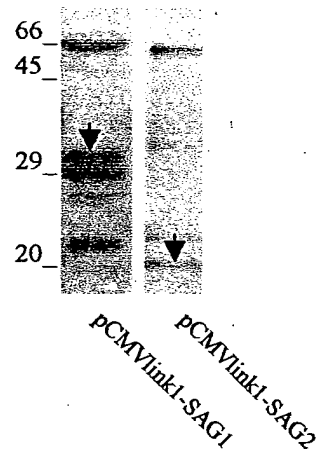


FIGURA 3

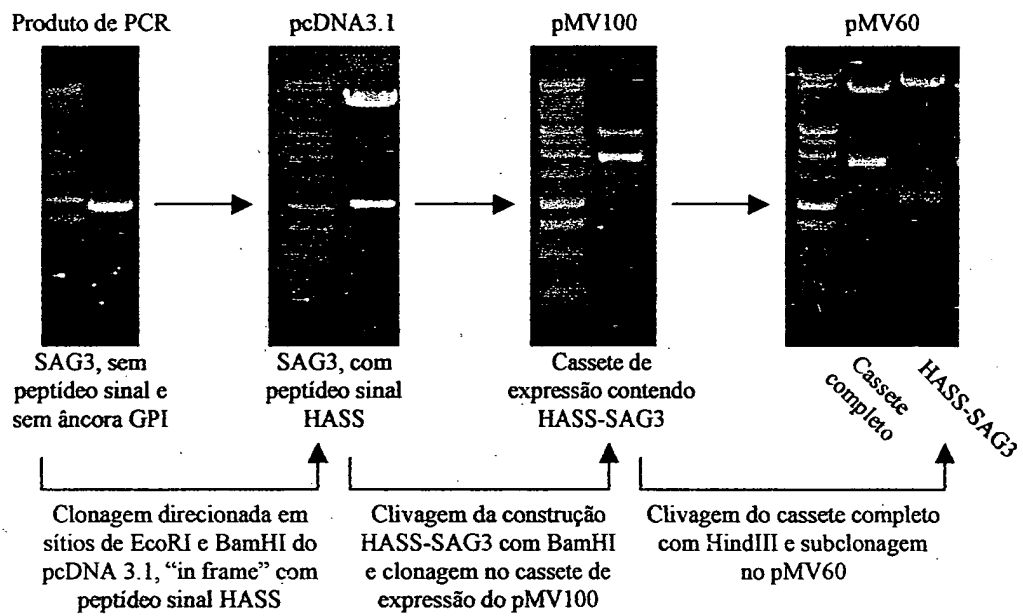


FIGURA 4

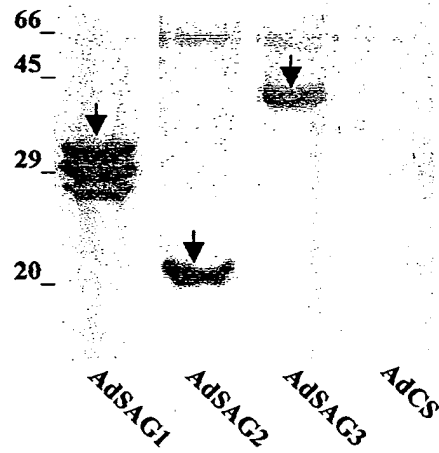


FIGURA 5

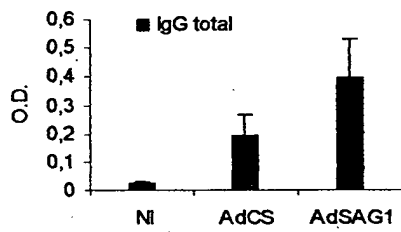


FIGURA 6A

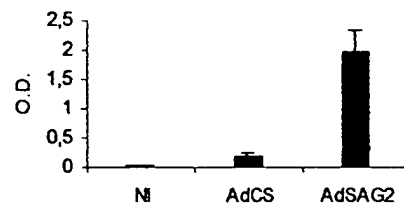


FIGURA 6B



FIGURA 6C

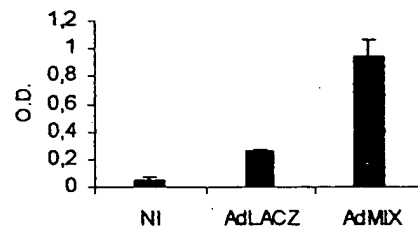


FIGURA 6D

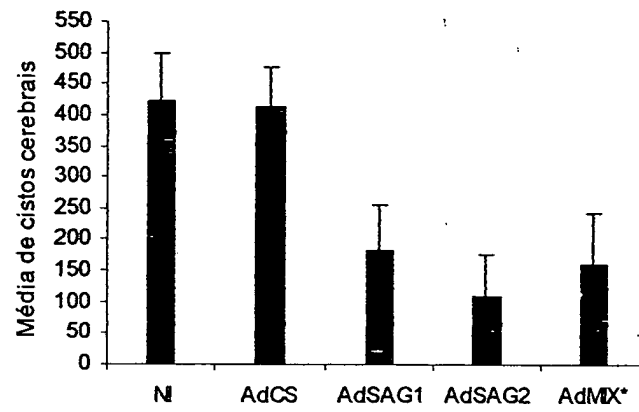


FIGURA 7A

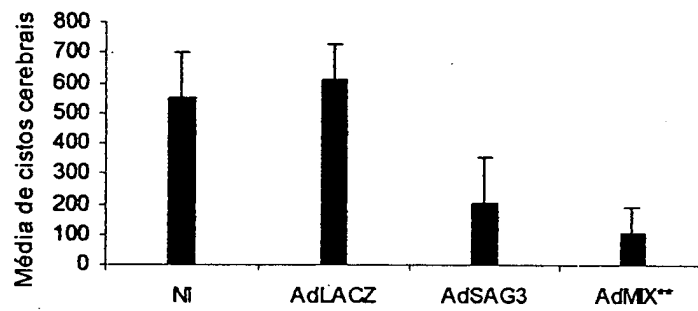


FIGURA 7B

RESUMO

**Adenovírus recombinantes, Processo de construção de
adenovírus recombinantes, Composição de Vacina contra
toxoplasmose, e Método de imunização contra infecções
causadas pelo parasita *T.gondii*.**

A presente invenção refere-se a construção dos
adenovírus recombinantes com os genes que codificam para as
proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 do *T.gondii*, por meio da
técnica de recombinação homóloga entre dois vetores. Um
primeiro vetor que serve como vetor de transferência dos
genes e um segundo vetor que possui o genoma adenoviral
receptor desses genes. Utilização dos adenovirus
recombinantes em uma composição de vacina de modo a se
obter imunização contra infecções causadas pelo parasita
T.gondii.