



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

CARTA PATENTE Nº PI 0917075-8

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

(21) Número do Depósito: PI 0917075-8

(22) Data do Depósito: 02/12/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 02/08/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 35/68; A61K 39/002; C07K 14/44; C12N 15/113; C12N 1/20; C12R 1/90.

(30) Prioridade Unionista: US 61/119,058 de 02/12/2008.

(54) Título: PROTOZOÁRIO PARASITA GIARDIA MODIFICADO E VACINA CONTRA INFECÇÕES PRODUZIDAS POR PROTOZOÁRIOS

(73) Titular: CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS. Endereço: AV. RIVADAVIA, 1917, CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, C.P. 1033, ARGENTINA(AR); UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA. Endereço: OBISPO TREJO, 323 CÓRDOBA X5000IYG, ARGENTINA(AR)

(72) Inventor: HUGO DANIEL LUJAN.

(87) Publicação PCT: WO 2010/064204 de 10/06/2010

Código de Controle: E02E05679EE00C6A 4A9DAC016FB569C7

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 02/12/2009, observadas as condições legais

Expedida em: 12/11/2019

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

PROTOZOÁRIO PARASITA GIARDIA MODIFICADO E VACINA CONTRA INFECÇÕES PRODUZIDAS POR PROTOZOÁRIOS

[001] Protozoário *Giardia* modificado expressando pelo menos duas proteínas de superfície variáveis (VSP), e vacina que o compreende.

[002] Refere-se o presente invento a protozoários modificados *Giardia* expressando mais de uma proteína de superfície variável (VSP), uma vacina que o compreende. Mais especificamente, ele se refere a um protozoário parasita modificado compreendendo a expressão superficial simultânea de mais de uma proteína de superfície variável (VSP). Os protozoários modificados também podem expressar uma ou mais proteínas de superfície variável. Os protozoários mostram expressão reduzida de Dicer, enzimas RNA-polimerase (RdRP) dependentes de RNA ou ambos, em que o gene RdRP e/ou o gene Dicer foram silenciados.

[003] A variação antigênica é uma mudança fenotípica de clone desenvolvida por microorganismos patogênicos envolvendo determinantes antigênicos expostos na superfície. Estes organismos usam diferentes mecanismos para alterar sua expressão antigênica na superfície, sendo assim capazes de manter uma infecção crônica sob a pressão imune contínua gerada pelo hospedeiro (Deitsch, K. W., Moxon, E. R. & Wellems, T. E. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 281-293 (1997)). *Giardia lamblia* (também *Giardia intestinalis* ou *Giardia duodenalis*) é um dos parasitas intestinais humanos mais comuns. O protozoário *G. lamblia* também exibe variação antigênica (Adam, R. D. Clin. Microbiol. Ver. 14, 447-475 (2001) e Nash, T.E. Phil. Tran. R. Soc. Lond. B 352, 1369-1375 (1997)), em um processo que permite que o parasita desenvolva infecções crônicas e/ou recorrentes. A partir de um repertório de cerca de 190 genes que codificam proteínas de superfície variável (VSPs), *Giardia* somente expressa uma VSP na superfície de cada parasita num tempo particular, mas espontaneamente alterna para uma VSP diferente por um mecanismo desconhecido. Na *Giardia*, a variação antigênica é responsável pela variação e/ou curso persistente de algumas infecções, bem como pela tendência a múltiplas infecções, e envolve uma família de proteínas conhecida como VSPs (Adam, R. D. Clin. Microbiol. Ver. 14, 447-475 (2001) e Nash, T.E. Phil. Tran. R. Soc. Lond. B 352, 1369-1375 (1997)).

[004] As VSPs alinham a superfície trofozoíta completa e são os principais antígenos reconhecidos pela resposta imune do hospedeiro. As VSPs variam em tamanho entre 30 kDa e 200 kDa; elas possuem uma região terminal amino rica em cisteína variável e uma região terminal carboxi conservada que inclui um domínio transmembrana hidrofóbico e uma cauda citosólica curta compreendendo somente 5 aminoácidos (CRGKA). O genoma parasita codifica um repertório de ~190 genes codificando VSPs (Morrison, H.G. et al., *Science* 317, 1921-1926 (2007)), mas somente uma VSP é expressa num dado momento na superfície de cada trofozoíto. A mudança para a expressão de uma outra VSP ocorre uma vez a cada de 6 a 13 gerações, mesmo na ausência de qualquer pressão imunológica (Nash, T.E., Alling, D.W., Merritt, J.W. Jr & Conrad, J.T. *Exp. Parasitol.*, 71, 415-421 (1990)). Similarmente ao resto dos genes de *G. lamblia*, os genes que codificam VSPs não têm íntrons e suas regiões a montante são relativamente curtas e descobriu-se que têm pouca ou nenhuma conservação de sequência. Além disso, não há promotores eucarióticos típicos presentes nessas regiões. As regiões 3' não traduzidas do RNA mensageiro incluindo os genes VSPs de *Giardia* tendem a ser curtas, tipicamente de 0 a 30 nucleotídeos de comprimento. Até agora, nem os processos de rearranjo de genes nem os mecanismos de liga/desliga dependentes de promotores demonstraram estar envolvidos na mudança antigênica da *Giardia* (Adam, R. D. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 447-475 (2001); Nash, T. E. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 352, 1369-1375 (1997) e Nash, T. E., Alling, D. W., Merritt, J. W. Jr & Conrad, J. T. *Exp. Parasitol.* 71, 415-421 (1990)).

[005] Carranza et al., "Expressão simultânea de diferentes proteínas de superfície específicas para variantes em trofozoítos isolados de *Giardia lamblia* durante a encistância", *INFECTION AND IMMUNITY*, vol 70, no. 9 de Setembro de 2002, páginas 5265-5268, divulga a expressão simultânea de mais do que uma proteína VSP na superfície da formação de trofozoitos *Giardia lamblia*, isto durante a diferenciação de trofozoitos *Giardia* em cistos.

[006] São providos protozoários parasitas *Giardia* modificados compreendendo a expressão superficial simultânea de mais de uma proteína de superfície variável (VSP). Os protozoários mostram uma expressão reduzida de Dicer, enzimas RNA-polimerase (RdRP) dependentes de RNA ou ambos, em que o gene RdRP e/ou o gene Dicer foram

silenciados, ou uma mistura deles.

[007] É provida uma vacina contra infecções produzida pelos protozoários compreendendo pelo menos um protozoário Giardia modificado expressando na sua superfície pelo menos duas proteínas de superfície variável (VSP). O protozoário exibe expressão reduzida de Dicer, enzimas RNA-polimerase (RdRP) dependentes de RNA ou ambos, em que o gene RdRP e/ou o gene Dicer foram silenciados, ou uma mistura deles. A vacina também pode compreender excipientes e/ou coadjuvantes.

[008] Não de acordo com a presente invenção, Um procedimento para purificar o repertório completo de proteínas de superfície variável (VSP) do protozoário, compreende:

- a) ligar um anticorpo que reconhece a sequência de aminoácidos CRKGA da VSP a um suporte sólido;
- b) contatar o suporte sólido ao protozoário; e
- c) separar o repertório completo de proteínas de superfície variável (VSP). O protozoário pode ser uma mistura de clones de protozoários selvagens, em que cada clone expressa uma proteína de superfície variável diferente ou pode ser um clone expressando o repertório completo de VSPs.

[009] Não de acordo com a presente invenção Uma vacina compreende mais de uma proteína de superfície variável de protozoário, em que cada uma de ditas proteínas é diferente; e excipientes e/ou coadjuvantes. Numa forma preferida de realização, a vacina compreende o repertório completo de proteínas de superfície variável de protozoário, em que cada uma de ditas proteínas é diferente.

[0010] É provido um método de imunização compreendendo administrar a um mamífero uma quantidade de uma vacina compreendendo protozoários modificados expressando pelo menos duas proteínas de superfície variável (VSP) ou expressando simultaneamente o repertório completo de proteínas de superfície variável (VSPs). O método é aplicado a fim de imunizar um mamífero contra infecções produzidas pelos protozoários, em que ditos protozoários têm um mecanismo de variação antigênica.

[0011] Em adição, é provido um método de imunização compreendendo administrar a um mamífero uma quantidade de uma vacina compreendendo uma combinação de proteínas de superfície variável de protozoários, em que a combinação de proteínas de superfície

variável é isolada a partir de um protozoário modificado compreendendo genes silenciados RdRP, Dicer ou ambos. O método é aplicado para imunizar um mamífero contra infecções produzidas pelos protozoários, em que ditos protozoários têm um mecanismo de variação antigênica. Numa forma de realização, a dose de vacina administrada compreende entre 50 e 500 µg de proteínas de superfície variável de protozoários.

[0012] É provida uma seqüência de nucleotídeos, em que dita seqüência pode ser escolhida entre qualquer uma das seqüências de SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 112, em que ditas seqüências são ARNdc.

[0013] É provido o uso de pelo menos uma seqüência escolhida entre qualquer uma das seqüências de SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 112 para silenciar o gene RdRP ou para silenciar o gene Dicer.

[0014] A figura 1 mostra que vários genes VSP na Giardia são simultaneamente transcritos; a: ensaio nuclear run-on usando núcleos de Giardia recentemente isolados induzidos a transcrever in vitro na presença de ³²P UTP; b: teste Northern blot de RNA total extraído de clones WB9B10 e WB1267 usando uma sonda compreendendo a região preservada presente em todas as VSPs; c: transcritos senso e anti-senso (vsp9B10, vsp1267, vspA6, vspH7, cwp2 e GDH) gerados in vitro, foram manchados e hibridizados com os produtos do ensaio nuclear run-on nas mesmas condições da figura 1a; d: comparação entre os produtos PCR gerados a partir de trofozoítos do clone WB9B10 com iniciadores específicos (9B10F/9B10R e 1267F/1267R) no DNA genômico (trilhas 1 e 5), ou cDNA gerado com sonda R2 reversa (trilhas 2 e 6) ou sonda senso S1 (trilhas 3 e 7), a trilha 4 é um controle de reação sem RT, a seta branca indica o fragmento vsp9B10, que está presente num DNA genômico em cDNA senso mas não no cDNA anti-senso, a seta negra indica o fragmento vsp1267 presente no DNA genômico, no cDNA senso e no cDNA anti-senso. M significa marcador molecular.

[0015] A figura 2 mostra as novas ferramentas para estudar a variação antigênica em G. lamblia. a: foram gerados oligonucleotídeos adequados para serem amplificados por PCR numa grande quantidade de genes codificadores de VSPs; foram escolhidas seqüências de quatro VSPs de G. lamblia isoladas de (VSP1267, VSP9B10, e VSPA6) e GS (VSPH7), estas quatro seqüências de VSPs foram alinhadas e as quatro regiões preservadas foram usadas

para projetar os iniciadores; as setas abaixo das seqüências de oligonucleotídeos denotam seqüências em que foram projetados iniciadores VSP genéricos (S1-S4 e R1-R2); b: uma combinação de quatro iniciadores senso (S1-S4) e dois iniciadores reversos (R1, R2) foi usada no teste PCR de DNA genômico do clone WB9B10 de *Giardia*, que expressa somente VSP9B10 na sua superfície, vários fragmentos de DNA foram amplificados independentemente das combinações de iniciadores usadas e 59 produtos principais destas reações foram isolados, clonados e seqüenciados, revelando que todos eles codificavam fragmentos VSPs, vários destes produtos (rotulados de 1 a 8 em branco) foram subsequenteiramente usados como sondas para a análise detalhada de uma biblioteca de DNA genômico, o que permitiu identificar ORFs (quadros de leitura aberta) codificando novas proteínas com as características típicas de VSP de *Giardia* (VSPS1-S8, números de acesso GenBank: de AY142122 a AY142129), o tamanho dos marcadores em nt (nucleotídeos) é mostrado no lado esquerdo. c: para verificar se o silenciamento da transcrição de VSP de *Giardia* implicava em ARN anti-senso VSP, estas moléculas foram pesquisadas em preparações ARN isoladas dos trofozoítos expressando uma única VSP, foram executadas RT-PCR com as mesmas combinações de iniciadores VSP previamente usadas no DNA genômico mas usando iniciadores senso durante a reação de transcrição reversa (RT), iniciadores senso (S1 a S4) são mostrados no topo, trilhas (a) a (h) indicam combinações de iniciadores usadas em cada reação PCR: (a) S1-R1, (b) S2-R1, (c) S3-R1, (d) S4-R1, (e) S1-R2, (f) S2-R2, (g) S3-R2, (h) S4-R2; em adição, são mostrados controles negativos sem transcriptase reversa (RT-). Nestas condições, foram isolados trinta e oito produtos amplificados, clonados e seqüenciados, demonstrando VSPs codificando anti-senso, doze destes produtos (marcados de 1 a 12 no alvo) também foram usados como sondas numa biblioteca de genoma, o que permitiu obter a seqüência completa dos novos genes VSP (VSPAS1-VSPAS12, números de acesso GenBank: de AY143130 a AY142141), indicando alvos funcionais de transcritos anti-senso de genes VSP.

[0016] A figura 3 mostra a: imunolocalização da versão gRdRp rotulada com um epítipo HÁ expressado em trofozoítos de clone WB9B10, a enzima (em vermelho) está localizada numa região que envolve ambos núcleos do parasita; esta região se refere principalmente ao retículo endoplasmático áspero (amarelo), como visto pela co-imunolocalização com

ER-BiP acompanhante (Mab 9C9, em verde); b: atividade de RdRP, em que combinações diferentes de substrato RNA foram usadas (A, B e D; vsp9B10 e vsp1267; C e E; vsp9B10, vsp1267 e vspH7), em ausência (A-C) ou na presença de um iniciador R1 (D) ou R2 (E), A é o controle sem RdRP purificada. c: imunolocalização de uma versão gDicer rotulada com um epítipo HA expresso em trofozoítos de clone WB9B10, a enzima (em verde) se localiza no citoplasma da célula, os núcleos são manchados com DAPI (nódoa); d: imunolocalização de uma versão gAgo sinalizada com um epítipo HA, que é expressa em trofozoítos de clone WB9B10, a enzima (em verde) está localizada no citoplasma da célula, os núcleos são manchados com DAPI (azul); e: Northern blot com sondas para gRdRP, gAgo, gDicer, GDH e CWP1 no RNA total extraído de trofozoítos de clone WB9B10 induzidos à formação de cisto durante 4, 6 ou 12 h, e trofozoítos mantidos num meio de crescimento normal (NT) por 12 h, os resultados mostram a expressão constitutiva destes componentes PTGS (silenciamento de gene pós-transcricional).

[0017] A figura 4 mostra a atividade Dicer e a detecção de RNA pequeno VSP em Giardia. a: geração de RNAs pequenos a partir de dsRNA por extrato de Giardia demonstrando uma atividade do tipo Dicer. Para vsp1267RNA, ambas fitas (trilha 1), somente a fita RNA senso (trilha 2) ou somente anti-senso (trilha 3) foram rotuladas radiativamente. Para vsp9B10 e gdh, ambas fitas foram rotuladas. Os RNAs de dupla fita foram incubados com um extrato de Giardia a partir do clone WB9B10 a 37°C por 1 h; então, o RNA total foi isolado e usado para eletroforese. Em todos os casos, RNA pequeno foi obtido; b: efeito da presença de ATP no processamento de dsRNA por Giardia, as trilhas 1 e 2 mostram controles não tratados. A incubação de dsRNA vsp1267 com lisados citoplásmicos de Giardia sem gastar ATP (incubação de 1 h e 3 h, respectivamente), redução de ATP pela adição de 2 mM de glicose e 0,1 U μL^{-1} de hexoquinase (trilha 3). Regeneração de ATP usando fosfocriatina (CP, trilha 4), creatina quinase (CK, trilha 5) ou ambas (trilha 6); c: geração de RNAs pequenos pela incubação de ribossondas de VSP com extratos a partir do clone WB9B10 de Giardia. Um, dois ou três RNAm VSP diferentes (vsp9B10, vsp1267, vspH7) foram misturados com os extratos de Giardia. A formação de RNAs pequenos ocorreu na presença de mais de uma transcrição. O gdh foi usado como controle de gene não relacionado. O tamanho dos marcadores RNA nos nucleotídeos está no lado esquerdo;

o RNA total do clone WB9B10 e dos trofozoítos do clone WB1267, bem como o RNA de baixo peso molecular do clone WB1267 (LMW - baixo peso molecular) foram submetidos a eletroforese, manchados e hibridizados usando sondas RNA vsp9B10 parcialmente digeridas transcritas in vitro. Nenhum RNA pequeno foi formado no clone WB9B10; em contraste RNAs pequenos vsp9B10 estavam presentes no clone WB1267 (seta), que não expressa VSP9B0. Curiosamente, foram encontrados RNAs de 70 nucleotídeos de comprimento (asterisco) que poderiam representar RNAm parcialmente digeridos.

[0018] A figura 5 mostra a geração de RNAs pequenos pela incubação de ribossondas de VSP com extratos de clone WB1267 de Giardia; um, dois ou três RNAm de diferentes VSP (vsp9B10, vsp1267, vspH7) foram misturados e confrontados com os extratos de trofozoíto de Giardia, RNAs pequenos marcado com ^{32}P foram gerados quando mais de um transcrito estava presente, o tamanho dos marcadores RNA em nucleotídeos estão do lado esquerdo.

[0019] A figura 6 mostra uma comutação antigênica em trofozoítos WB9B10 sobre-expressando VSPH7. a: trofozoítos de clone WB9B10 foram transfectados com o vetor pTubCWP1.Pac ou com o vetor pTubH7.Pac, direcionando a expressão de CWP1 ou VSPH7 sob controle do promotor α -tubulina, com controles dos trofozoítos a partir da fita GS expressando VSP H7 transfectado com o vetor de controle (pTubCWP1.Pac) indicado pelos triângulos invertidos, quadrados mostrando trofozoítos WB9B10 transfectados com o vetor de controle, a expressão de VSP9B10 diminui com o tempo devido à troca espontânea das proteínas de superfície, com os trofozoítos WB9B10 constitutivamente expressando vspH7 mostrando que a expressão de VSP9B10 (círculos) ou VSPH7 (triângulos) diminuiu mais rápido que o respectivo controle. Os resultados representam a percentagem média de três experimentos independentes $\pm$ DP. b: imagem representativa de trofozoíto WB9B10 expressando VSPH7 no tempo 0, todas as células expressando simultaneamente VSP9B10 e VSPH7 na sua superfície; c: imagem representativa de trofozoítos WB9B10 expressando VSPH7 após 15 dias de cultura, algumas células expressando VSP9B10 e VSPH7 na sua superfície, outras somente VSP9B10 ou VSPH7 e outras nenhum nem outro; os núcleos foram marcados com DAPI em azul.

[0020] A figura 7 mostra a comutação antigênica em trofozoítos WB9B10 expressando

fragmentos anti-senso vsp9B10. a: trofozoítos do clone WB9B10 foram transfectados com o vetor pTubCWP1.Pac (quadrados) ou vetor pTubPac incluindo seqüências anti-senso do meio de porção média de gene vsp9B10 5' (círculo) ou 3' (triângulo); os resultados representam o valor médio de três experimentos independentes $\pm$ DP e indicam que a quantidade de trofozoítos positivos VSP9B10 diminui mais rápido que o controle; b: imagem representativa de trofozoítos WB9B10 transfectados com um gene VSP diferente, com todas as células expressando VSP9B10 na sua superfície; c: imagem representativa de trofozoítos WB9B10 expressando o fragmento anti-senso 3' de vsp9B10 após 15 dias de cultura, VSP9B10 está presente em cerca de 50% da população; os núcleos foram marcados com DAPI em azul.

[0021] A figura 8 mostra que variações na concentração de transcritos diferentes pode determinar que um escape do sistema de silenciamento. VSP codificando genes 1267, vsp9B10 e cwp1 foram clonados num vetor pGEM-T-easy e transcritos in vitro na presença ou ausência de 32 P-UTP, concentrações diferentes de transcritos vsp9B10 e CWP1 não marcados foram geradas durante períodos de tempo diferentes com extratos citoplasmáticos WB1267 contendo uma concentração fixa de RNA vsp1267 marcado radiativamente, trilha 1: marcador de dezenas de nucleotídeos (Decade-Ambion), trilhas 2, 3 e 4: incubação de 750 ng vsp9B10 e 250 ng vsp1267 (razão 3:1), 1, 5 e 24 h, respectivamente, trilhas 5, 6 e 7: incubação quantidades iguais de vsp9B10 e vsp1267 (250 ng cada; razão 1:1), 1, 5 e 24 h, respectivamente, trilhas 8 e 9: incubação de 750 ng de CWP1 e 250 ng vsp1267, 5 e 24 h, respectivamente, trilha 10: incubação de 250 ng de transcrito vsp1267, em períodos curtos de incubação (1 h) há pouca degradação de vsp1267 no clone WB1267, independentemente da quantidade de vsp9B10 adicionada à mistura (trilhas 2 e 5). Em contraste, após incubações mais longas (5 h), o aparecimento de RNAs pequenos vsp1267 radio-rotulados aumenta pela presença de vsp9B10 (comparar trilha 10 com trilhas 3, 6 e 8), a presença de transcritos CWP1 (não relacionados) não tem efeito, incluindo em alta concentração (trilha 8). Em 24 h de incubação, a maioria dos transcritos radio-rotulados é totalmente fracionada.

[0022] A figura 9 mostra os resultados do silenciamento do gene Dicer e do gene RdRP em trofozoítos Giardia, em que os clones Giardia Dicer-AS e RdRP-AS apresentam uma

redução dos níveis de RNA mensageiro de entre 65% e 75% em comparação com os trofozoítos WB9B10 não transfectados medidos por ensaios de densitometria de bandas obtidas por RT-PCR e Northern blot realizados cinco vezes, onde os resultados representam o valor médio $\pm$ d.p.

[0023] A figura 10 mostra a expressão de diferentes VSPs em trofozoítos *Giardia* transgênicos com enzimas RdRP e Dicer silenciadas, a: direto de ensaios de imunofluorescência em trofozoítos transfectados Dicer-AS (painel inferior) ou vetor vazio (painel superior) usando TRITC conjugado com anticorpo monoclonal 5C1 (VSP1267; painel direito) e FITC conjugado com anticorpo monoclonal 9B10 (VSP9B10; painel esquerdo), quando a expressão Dicer em *Giardia* foi silenciada, trofozoítos expressando VSP9B10 de superfície também expressaram VSP1267 (imagem fundida; painel central); b: percentagem de trofozoítos *Giardia* expressando uma VSP particular, como determinado por ensaios de citometria de fluxo usando anticorpos monoclonais específicos (VSP9B10, anticorpo monoclonal 9B10; VSP1267, anticorpo monoclonal 5C1; VSPA6, anticorpo monoclonal 6E7) em clones 9B10, 1267, e com células transfectadas com construções anti-senso para *Giardia* RdRP (RdRP-AS) ou Dicer (Dicer-AS), como controle negativo foram usados imunoglobulinas de cabra anti-rato; c: teste Western blot de extratos de proteína do tipo WB9B10 selvagem e trofozoítos WB9B10 em que o gene Dicer foi nocauteado, após eletroforese e transferência para nitrocelulose, os filtros foram hibridizados com: (1) anticorpo monoclonal 12F1 clone G3 do invento (gerado contra o domínio preservado CRGKA em todas as VSPs) ou (2) anticorpos monoclonais 9B10 (específicos para VSP9B10).

[0024] A figura 11 mostra a expressão de VSPs em clones *Giardia* do tipo selvagem e em *Giardia* modificada com a desregulação da variação antigênica; são mostradas imagens de imunofluorescência confocal de trofozoítos, onde Dicer (a) ou RdRP (b) foram silenciados e imagens representativas de ensaios de imunofluorescência indireta usando anticorpos monoclonais anti-VSP (verde) em contraste com DAPI (azul), WB9B10 (d), WB1267 (e), e GS/M-H7 (f), e (c) imagem de imunofluorescência de uma população WB não clonada isolada manchada com anticorpo monoclonal anti-CRGKA 12F1 do presente invento (verde) e contracolorada com DAPI (azul).

[0025] A figura 12 mostra a detecção e quantificação de cistos *Giardia* em amostras de deposição a partir de ratos do deserto infectados com populações diferentes de tipo selvagem e trofozoítos transgênicos, e estimulados com WB9B10 e WB1267. (a) Ratos do deserto inicialmente infectados com populações clonadas de WB9B10, WB1267, ou trofozoítos transgênicos silenciados para a expressão de Dicer (DAS) ou RdRP (RAS) e misturas 1:1 de ambos. (b-e) Ratos do deserto previamente infectados com *Giardia* WB9B10 (b), WB1267 (c), DAS (d) e RAS (e) foram estimulados dois meses após a infecção primária com populações clonadas de WB9B10 e WB1267; a quantidade de cistos liberados pelos animais foi contada. As figuras representam o valor médio de cinco experimentos diferentes.

[0026] A figura 13 mostra os resultados da estimulação de ratos do deserto com trofozoítos expressando uma VSP particular continuando a infecção primária com trofozoítos *Giardia* expressando o repertório completo de VSPs. Os ratos do deserto infectados previamente com clones WB9B10, WB1267, DAS ou RAS (a-d) foram estimulados com populações de clones WB9B10 (e-h), WB1267 (i-l), ou cistos purificados (m-p). A figura mostra imagens representativas de ensaios de imunofluorescência em fezes de ratos do deserto usando anticorpos monoclonais conjugados com anti-CWP2 FITC (verde).

[0027] A figura 14 mostra que o soro e o conteúdo do intestino dos ratos do deserto infectados com trofozoítos transgênicos expressando o repertório completo de VSPs são capazes de aglutinar diferentes clones *Giardia* in vitro. São mostradas imagens representativas de microscopia de contraste de fase de clones WB9B10 (1-2), WB1267 (3-4) e GS/M H7 (5-6) estimulados com soro (1b, 3f e 5f) ou conteúdo intestinal (2b, 4f e 6f) de animais infectados com clones WB9B10; soro (2b e 1f) ou conteúdo intestinal (3b e 2f) de animais infectados com clones WB1267; soro ou conteúdo intestinal de animais infectados com clones GS/M-H7 (5b e 6b); Mab específico para VSP9B10 (1c e 2c), Mab para VSP1267 (3c e 4c), Mab para VSPH7 (5c e 6c), soro de animais não infectados (1a, 2a, 3a, 4a, 5a e 6a), soro de animais infectados com DAS nocauteado (1d, 2d, 3d, 4d, 5d e 6d) e soro de animais infectados com RAS (1e, 2e, 3e, 4e, 5e e 6e).

[0028] A figura 15 mostra a detecção e quantificação de cistos *Giardia* em amostras fecais

de ratos de deserto previamente imunizados com VSPs purificados a partir de populações clonadas diferentes do tipo selvagem e/ou trofozoítos *Giardia* transgênicos do presente invento. As fezes de ratos de deserto imunizados foram monitoradas diariamente por um mês usando anticorpos monoclonais anti-CWP2 para verificar a liberação de cistos. Os ratos do deserto foram infectados com populações clonadas de trofozoítos WB9B10 ou WB1267. As imunizações foram executadas usando VSPs purificados a partir de trofozoítos transgênicos DAS, RAS do presente invento (e suas misturas); os animais foram previamente imunizados com VSPs purificadas DAS (a), RAS (b), ou uma mistura delas (c); estes animais foram protegidos contra subseqüentes infecções por clones WB9B10 ou WB1267, animais de controle (d) ou aqueles imunizados com proteína intracelular (e) não foram protegidos contra infecções subseqüentes. As figuras representam o valor médio de 5 experimentos independentes.

[0029] A figura 16 mostra fotografias da morfologia do intestino delgado de ratos do deserto durante a infecção e a estimulação; o painel superior mostra o intestino dos animais experimentais: (a) intestino de rato do deserto durante infecção primária com trofozoítos expressando o repertório completo de VSPs (DAS) 15 dias após inoculação; um aumento de tamanho nos nódulos linfóides agregados (Peyer patches - setas) em comparação com os animais de controle (b). (c) é o intestino durante a estimulação dos ratos de deserto imunizados com VSPs purificadas de trofozoítos DAS; o painel inferior mostra o exame microscópico do intestino delgado de animais experimentais: (d) ratos do deserto infectados mostram alargamento nos nódulos linfóides agregados (Peyer patches) e inflamação infiltrativa moderada na mucosa e submucosa. Alguns trofozoítos de *Giardia* foram vistos no lúmen do intestino (asteriscos; 400x); (e) são controles ratos do deserto não infectados/não vacinados (400x); (f) são ratos do deserto vacinados mostrando mucosa intestinal histologicamente normal (400x), inserções mostram uma morfologia geral do intestino delgado a 250x.

[0030] No presente invento, trofozoíto significa uma célula de um estágio particular de um parasita unicelular, por exemplo de um protozoário. Para os efeitos do presente invento, entende-se que os termos trofozoíto, parasita, célula de parasita ou protozoário têm o mesmo significado e são intercambiáveis.

[0031] O parasita, trofozoíto ou protozoário transgênico ou modificado pode ser um protozoário em que o gene Dicer ou o gene RdRP, ou uma mistura de seus protozoários transgênicos, foram silenciados. Estes protozoários são intercambiavelmente conhecidos no presente invento como trofozoítos, protozoários ou parasitas transgênicos, transfectados ou modificados. Quando silenciados, o gene Dicer de trofozoíto ou protozoário do presente invento pode ser também conhecido como Dicer-AS ou DAS. Quando silenciado, o gene RdRP de trofozoíto ou protozoário do presente invento também pode ser conhecido como RdRP-AS ou RAS. Quando se usa uma mistura de trofozoítos ou protozoários transgênicos, eles podem ser conhecidos como Dicer-AS + RdRP-AS ou DAS + RAS.

[0032] Trofozoítos ou protozoários que expressam o repertório completo de proteínas de superfície variável podem ser quaisquer protozoários, parasitas ou patógenos em que o mecanismo de variação antigênica foi desativado.

[0033] É mostrado que a regulação da expressão de VSPs em *Giardia* inclui um sistema compreendendo RNA-polimerase dependente de RNA, Dicer e Argonaute, componentes do mecanismo de interferência de RNA. Os clones expressando um único antígeno de superfície (proteína) na superfície, transcrevem eficientemente vários genes que codificam VSPs, mas somente acumulam transcritos codificando a VSP a ser expressada na superfície da célula.

[0034] A detecção de RNAs anti-senso correspondendo aos genes VSP silenciados e RNAs pequenos a partir das proteínas silenciadas mas não para a VSP expressada implica numa rota de interferência RNA na regulação da variação antigênica. Claramente, o silenciamento da enzima Dicer e RNA polimerase dependente de RNA leva a uma mudança de uma única para múltiplas expressões de VSP em parasitas individuais.

[0035] Os ensaios nucleares foram realizados para determinar se a regulação da expressão de VSP é controlada no nível transcricional ou pós-transcricional. Então a existência de RNA foi estudada em trofozoítos, senso e anti-senso, codificando VSP pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) e para a atividade das enzimas envolvidas na síntese e degradação de dupla-fita (dsRNA) em eucariotes superiores, tais como RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), Dicer e Argonaute. A

caracterização envolveu clonar e expressar esses genes bem como a análise de RNA pequeno gerado a partir de dsRNAs que codificam VSPs. Adicionalmente, a expressão de diferentes VSPs foi avaliada após silenciar os componentes da rota de interferência de RNA (RNAi) de *Giardia*.

[0036] A ruptura dos mecanismos de variação antigênica para gerar células expressando o repertório completo de proteínas de superfície variável em organismos patógenos ainda não foi descrita. A expressão do repertório completo de proteínas de superfície em organismos patogênicos para gerar parasitas que podem ser usados como vacinas, ou a purificação do repertório completo de proteínas de superfície variável para imunoprofilaxia das doenças causadas por estes patógenos ainda não tinha sido possível.

Transcrição de VSPs em *Giardia*

[0037] A transcrição dos genes VSP foi analisada por ensaios Nuclear run-on usando RNA isolado dos núcleos de trofozoítos clones WB9B10 (Fig. 1a); dito clone expressa somente BSP9B10 (número de acesso GenBank AAK97086) na sua superfície. Os resultados indicam que a maioria dos genes que codificam VSPs foram simultaneamente transcritos. Em contraste, quando os RNAs totais de dois clones diferentes de *Giardia* (WB9B10 e WB1267) foram incubados com um oligonucleotídeo usado como sonda correspondendo à extremidade conservada 3' dos genes VSP, foi detectado somente um transcrito do tamanho molecular correspondendo ao VSP expressado na superfície desses clones (Fig. 1b). Adicionalmente, foram vistas bandas de peso molecular muito baixo, suspeitas de serem produtos de degradação. A acumulação de somente um transcrito VSP foi observada em clones diferentes de *Giardia* usando sondas específicas a VSP (vide Nash, T. E. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 352, 1369-1375 (1997)). Isto demonstra que somente um transcrito VSP se acumula, onde mais de uma VSP é transcrita no núcleo do parasita.

Silenciamento pós-transcricional de gene em *Giardia* (PTGS)

[0038] Uma etapa chave de PTGS é a produção de dsRNAs que são homólogos com o gene silenciado. Os ensaios de RT-PCR desenhados para especificamente amplificar os produtos VSP senso ou antisenso revelou, após clonar e seqüenciar estes fragmentos, que RNAs de ambas as fitas estão presentes nos trofozoítos (Fig. 2). Para avaliar a possível transcrição simultânea de RNAs senso e anti-senso para genes codificadores de VSP, um

segundo experimento Nuclear run-on foi executado usando sondas senso e anti-senso específicas (Fig. 1c). Neste ensaio, foi impossível detectar RNAs anti-senso VSP, indicando que aquelas moléculas poderiam ser geradas pós-transcricionalmente. Os produtos gerados por PCR a partir do clone WB9B10 usando os iniciadores específicos vsp9B10 e vsp1267 também foram analisados (Fig. 1d). A banda correspondente a vsp9B10 estava presente no DNA genômico e DNA complementar senso mas muito pouco no cDNA anti-senso. Em contraste, vsp1267, que não é expressado na superfície do clone WB9B10, poderia ser amplificado a partir do DNA genômico, e igualmente amplificado a partir de ambos cDNAs senso e anti-senso. Estes resultados demonstram que VSPs são transcritos simultaneamente (adicionalmente suportando os resultados dos experimentos Nuclear run-on), e que há uma baixa abundância de transcritos VSP anti-senso que são expressados e uma presença de RNAs VSPs anti-senso que são transcritos mas não traduzidos.

Componentes do mecanismo RNAi da Giardia

[0039] A produção mediada por RdRP sem iniciadores de dsRNAs a partir de mRNAs anômalos e a produção com ou sem iniciadores de dsRNA guiada por RNA de interferência curta (siRNAs) é necessária para disparar o RNAi em alguns organismos. Um homólogo de Giardia de RdRP foi identificado. Este gene RdRP codifica uma proteína básica de 155.257 Da que compartilha alta homologia com outros RdRPs eucarióticos e difere grandemente daquela codificada pelo vírus 16 de Giardia, indicando a natureza protozoária do gene identificado.

[0040] A transcrição RdRP de Giardia foi verificada por RT-PCR e Northern blot, e sua localização foi avaliada pela expressão de hemaglutinina marcada (HA). A RdRP de Giardia é provavelmente associada com os ribossomos presentes no lado citoplásmico do retículo endoplasmático. Além disso, a enzima é ativa em trofozoítos, porque ela foi capaz de formar RNAs de alto peso molecular in vitro na presença de RNAs VSP homólogos (Fig. 3). Uma característica de RNAi é a degradação de dsRNA em siRNAs de 21 a 25 nucleotídeos pela RNase Dicer específica a dsRNA. Previamente, um homólogo Dicer Giardia foi identificado, sua estrutura foi resolvida, e a atividade in vitro Dicer da proteína recombinante foi demonstrada (Macrae, I.J. et al., Science 311, 195-198 (2006)).

[0041] Usando a sequência Dicer-1 de *Drosophila* para pesquisar genes homólogos no banco de dados do genoma de *Giardia*, foram identificados vários clones com alto grau de homologia com os domínios Dicer. Por PCR e posterior comparação com a biblioteca genômica, foram observados dois ORF independentes, contendo domínios presentes nas enzimas Dicer conhecidas: uma proteína Argonaute com domínios PIWI e PAZ (gAgo, número de acesso GenBank AY142142) e RNase III bidentada (gDicer, número de acesso GenBank AY142144) contendo um domínio PAZ e um tema zíper leucina provavelmente implicado na interação da enzima com outros componentes de RISC e RNA, respectivamente.

[0042] De acordo com o que é mostrado na figura 3, a enzima Dicer expressa constitutivamente durante todo o ciclo de vida da *Giardia*, com localização citoplasmática (Fig. 3). Para avaliar a atividade Dicer de *Giardia*, foram feitos ensaios *in vitro*, em que dsRNA rádio-rotulado foi exposto a um extrato de *Giardia* pós-nuclear. Os resultados (Fig. 4a) demonstram que, indiferente do gene e da fita que são rotulados (senso, anti-senso, ou ambos) os dsRNAs são processados em pequenos fragmentos RNA de 20 a 30 nucleotídeos e este processamento é favorecido, como em eucariotes superiores, pela presença de ATP (Fig. 4b). RNAs pequenos obtidos a partir daqueles experimentos foram capazes de ser clonados similarmente aos siRNAs que têm extremidades 5'-P e 3'-OH. O seqüenciamento daqueles siRNAs indicou que eles derivaram dos genes VSP de entrada e que eles tem de 22 a 25 nucleotídeos de comprimento (Tabela 1).

TABELA 1

RNAs pequenos senso VSP9B10	RNAs pequenos anti-senso VSP9B10
GTTTTGTTCTCGCGGGGTACTCGT (SEQ ID Nº 1)	ACCCCCGCGAGAACAAACTGCC (SEQ ID Nº 57)
AGAGCGCGCGGCTCAATGCGCAG (SEQ ID Nº 2)	TCCTGCCCATGCAATCTGGACGA (SEQ ID Nº 58)
GATTGCATGGGCAGGAAAAGCAA (SEQ ID Nº 3)	ATTGAGCCGCGCGCTCTGTTGCTTT (SEQ ID Nº 59)
TCTCGATGTAACACAGGATTTGT (SEQ ID Nº 4)	ATGCTTCCTCTGCGCAATTAGTGT (SEQ ID Nº 60)
GGACAATGTGCAGACNNAGAAGG (SEQ ID Nº 5)	CAATACAATTTACCACCGATCAG (SEQ ID Nº 61)
AAAGATGGCTCCGGAGGCGATACA (SEQ ID Nº 6)	TGCACATTGTCCATTGATAGGAA (SEQ ID Nº 62)

CAGACCTGTGGACAGTGCGCCGAG (SEQ ID N° 7)	CTGATCAGCTGTATCGCCTCCGG (SEQ ID N° 63)
CTTTCATGTACAAGGGCGGCTGT (SEQ ID N° 8)	GTAACAGCCGCCCTTGTACATGA (SEQ ID N° 64)
CGAAGCANCCCAGCAGCCCGGACAG (SEQ ID N° 9)	CATCTGCCGCCNGACANNTGGTC (SEQ ID N° 65)
GCAAGGATACTTCGTGCCGCCGG (SEQ ID N° 10)	CCCGGCCGCACGAAGTATCCTTG (SEQ ID N° 66)
ACCAATCGGTCATACCATGCGGAG (SEQ ID N° 11)	ACCGATTGGTGAGAGGCGTCTGC (SEQ ID N° 67)
ACGATAAAAAGTACAAGGGCGTGCT (SEQ ID N° 12)	ACTTTTTATCGTTCTTAACTGTTA (SEQ ID N° 68)
ACCGGCACCAAGACGTGCAAGAC (SEQ ID N° 13)	TGTGGGAGCGTAACACCGAGTGC (SEQ ID N° 69)
TGCGACGTGCGAGAAGGGCGCCGA (SEQ ID N° 14)	CACGCAGTACACGTGGCGGCCTT (SEQ ID N° 70)
GCCCGACCCNNAGTGCAACACCCCC (SEQ ID N° 15)	CACGCAGGAGGTGGCTGAGTCCT (SEQ ID N° 71)
GCTGCAAGACGTGCAGTGAGCCGA (SEQ ID N° 16)	GTGCCGGTGCACTCTTCTTCTGT (SEQ ID N° 72)
AGACAAGCAAGGAGGTGTGCNCA (SEQ ID N° 17)	TTGTTTGGCTGGACCTTCTTATT (SEQ ID N° 73)
ACGGTTGTGAGCACCTGGAAGGC (SEQ ID N° 18)	GCACTCACCGTCTCCGGGCACTTT (SEQ ID N° 74)
CCTGTGCCAAGTGCAATACCTCG (SEQ ID N° 19)	GCTTCTTCGTGCACCCGGTGCCC (SEQ ID N° 75)
AGCTACGAAGGAGAGGGCACGGGG (SEQ ID N° 20)	CTGGTGCCCTCGTAGTNNCCTNCC (SEQ ID N° 76)
TCGGCCCGCACAGCCTCCTGCCAG (SEQ ID N° 21)	TGAGGACCTGCTTAGGCTCGCAG (SEQ ID N° 77)
ACGAAACGACCAANCTCCCTGGAA (SEQ ID N° 22)	CTTCTTGACNCACACGCCGTTCTC (SEQ ID N° 78)
TGAATAATGGCGCGCTCATCACTTG (SEQ ID N° 23)	TAGCAGCCCCCGTTCATGCGGAA (SEQ ID N° 79)
GATGTAAGACGTGCACCAGCCAG (SEQ ID N° 24)	ACCTCCTCACAGACGCTCTTTCCA (SEQ ID N° 80)
TACTACCTGTCCAAAGAAAAGTG (SEQ ID N° 25)	GCTTGTATCCGTGCGCCGGAGTC (SEQ ID N° 81)
CCCCCAACCAACAATAAAGGGCC (SEQ ID N° 26)	CACTCGGAGACCCAGTGGCGCA (SEQ ID N° 82)
ACCTCATACAGAACANNAACAGG (SEQ ID N° 27)	CACTTGGTGGCGTCGTCCGCATTG (SEQ ID N° 83)
GGGATCTCCGTGCTGTCATCGC (SEQ ID N° 28)	ACAGCGNCGGAGATCCCCGCTATGG (SEQ ID N° 84)
TGCTGGTGGTTCATATGTAGNGG (SEQ ID N° 29)	AGAGGAAGCCCACGAGGCCCCC (SEQ ID N° 85)
RNAs pequenos senso VSP1267	RNAs pequenos anti-senso VSP1267
GCAAGCACTCTTGACAGGAGCTT (SEQ ID N° 30)	GGCAATTAATTAATAGAAACAT (SEQ ID N° 86)

GCTCTACGACTCAGGCTAATTGT (SEQ ID N° 31)	GCTATTAGGCAATTAATTAATAG (SEQ ID N° 87)
CAACGGGGTGTGTGAAGCAGCCGC (SEQ ID N° 32)	TTCCGCAACACAATTAGCCTGAG (SEQ ID N° 88)
GGCTGCTAATGGTAGTGATAACG (SEQ ID N° 32)	TGCACTTTGTATTACTACTGGCG (SEQ ID N° 89)
GTAAGAAGTGCCTTCTGCAAACC (SEQ ID N° 33)	GCACTTCTTACAAGTCTGATCAG (SEQ ID N° 90)
CAAACCTTCATGTTCAAGGGCGG (SEQ ID N° 34)	TTAAATTACCAGTNNCTCCCGCT (SEQ ID N° 91)
TGATGCTGCCTCTGGTACTACTGG (SEQ ID N° 35)	ATTACTCTACCAATCGTGACCCC (SEQ ID N° 92)
GCGGCTGATACCACGGATTCTGT (SEQ ID N° 36)	GCGTNATCATTAGGGAAATATCC (SEQ ID N° 93)
CAACTGGGGTCACGATTGGTGAG (SEQ ID N° 37)	TTAAGGGNNCTCAGGCTATTCGTG (SEQ ID N° 94)
ACTAATTGCGTTNNGTGTACCAA (SEQ ID N° 38)	TCAGGACAGACCCNGGGTAGCAG (SEQ ID N° 95)
GAGTGTGCTTCCAATCTGTATCTG (SEQ ID N° 39)	CGTCGGCGCAGTTTTCCAAATAC (SEQ ID N° 96)
GAAACTTGCAAGACAGGATATTTCC (SEQ ID N° 40)	AGTGCAAACCTCCGTTGGTTTTATCC (SEQ ID N° 97)
TTTCCNTAATGATAACGCTGATA (SEQ ID N° 41)	GCATCGGCTGTCGTGCACAACGT (SEQ ID N° 98)
CCGGTGCTATTCTTATCACCTGCA (SEQ ID N° 42)	GCCGCTGGTCTNGACGTAGCAGG (SEQ ID N° 99)
GCAAGGACGACAACACTGCGGCC (SEQ ID N° 43)	
GTATCGCAGAGTGACGCGGAANG (SEQ ID N° 44)	
GGCAGTGACAGCTAGCATAGCAG (SEQ ID N° 45)	
CCTTTGCGTGTCGGCCGAAACAG (SEQ ID N° 46)	
TAAACCAACGGAGTTTGCACTGCC (SEQ ID N° 47)	
CTATCAGGCTGAGAAGTTTCCTG (SEQ ID N° 48)	
GCAGGAAAGTGACGACCTGTGCG (SEQ ID N° 49)	
RNAs pequenos senso VSPH7	RNAs pequenos anti-senso VSPH7
GGAAACCTTGGTAGGATTATTTGC (SEQ ID N° 50)	AGTCGTAGAGCAAGCTCCTGCAAG (SEQ ID N° 100)
AATGCTAATCTGTACCTGAAGGCT (SEQ ID N° 51)	ACCCCGTTGATGGGCACATAGTTT (SEQ ID N° 101)
GGCATAGATGGGTGCTCTGCATG (SEQ ID N° 52)	CTTCCGTCTTNNAATAATCCTACC (SEQ ID N° 102)
ACAAAGGGAACATGCATTGCAGA (SEQ ID N° 53)	GAATCGTAACCCCGGTTGCGTCG (SEQ ID N° 103)

ACGCCGGATAANACCAACGGAGTT (SEQ ID N° 54)	ACTTAGCACAACCGGCCACACCC (SEQ ID N° 104)
TGTGCAANNGATAAACTAANA (SEQ ID N° 55)	CTTATCAGCCGTAACAGGTAAG (SEQ ID N° 105)
CTCGTCGGCTTCCTCTGCTGGTG (SEQ ID N° 56)	ACGGTGCTAGCCCTAGTTGTAGA (SEQ ID N° 106)
	CGTTCTTCAAGGNNCTCAGATTGTT (SEQ ID N° 107)
	CTCTGCAATGCATGTTCCCTTT (SEQ ID N° 108)
	CGACCCGGGTGGTGCCGCTCTTGC (SEQ ID N° 109)
	CCATTGCTGTCTNTATCTTGCCC (SEQ ID N° 110)
	GTGTTATCTTN-GCACACGATGC (SEQ ID N° 111)
	GACGGGAGTAGAACTCTGAGGAGA (SEQ ID N° 112)

[0043] Os resultados mostram que uma única proteína Argonaute de Giardia (Giardia AGO) poderia ser identificada, com domínios PIWI e PAZ. Sua expressão foi avaliada por Northern blot e sua localização celular determinada pela expressão de uma versão marcada com hemaglutinina da proteína. A Giardia AGO se localiza no citoplasma.

Regulação da expressão de VSP

[0044] Nos experimentos, a ocorrência de transcritos VSP múltiplos, homólogos, poderia dirigir a geração de RNAs anti-senso pela RdRP Giardia após ocorrer a transcrição de vários genes VSP. Além disso, a presença e atividade de Dicer, e provavelmente de AGO, sugere que um mecanismo similar a RNAi pode estar envolvido na regulação da expressão de variantes antigênicas de superfície em Giardia.

[0045] Foi analisado se o mecanismo PTGS da Giardia poderia discriminar a presença de diferentes mRNAs VSP pela mistura de extratos citoplasmáticos de Giardia com um, dois ou três transcritos VSP diferentes gerados in vitro. Quando dois ou mais mRNAs VSP rotulados foram incubados com extratos trofozoítos contendo o mecanismo RNAi, RNAs pequenos VSP foram produzidos, com um padrão idêntico ao dos produtos do ensaio de atividade Dicer (comparar Fig. 4a e Fig. 4c). Em contraste, quando um único transcrito foi incubado, nenhuma degradação de mRNA ocorreu. Adicionalmente, se os genes não relacionados cwp2 (que codifica a proteína de parede de cisto 2) ou gdh (que codifica glutamato dehidrogenase) foram adicionados a um único mRNA VSP radio-rotulado,

nenhuma degradação de RNAs pequenos foi detectada (fig. 4c), indicando que o mecanismo de silenciamento processa especificamente RNAs homólogos. Resultados similares foram obtidos ao usar extratos celulares de diferentes clones de *Giardia* (por exemplo, WBA6, WB1267 ou GSH7): o RNA vsp9B10 foi processado em RNAs pequenos somente quando combinado com outros genes VSP homólogos mas não quando ele era o único VSP adicionado à reação (Fig. 5). É evidente que a presença nos extratos trofozoítos de siRNAs endógenos de vários RNAs VSP senso e anti-senso certamente não interfere com o processo de silenciamento. Porque os mRNAs VSP usados nestes experimentos foram sintetizados *in vitro*, é óbvio que o mecanismo de silenciamento pode discriminar entre mRNAs homólogos na ausência de qualquer modificação de RNA pós-transcricional possível. Considerando que os transcritos VSP senso e anti-senso foram encontrados em *Giardia* e que a atividade Dicer foi demonstrada experimentalmente, foram pesquisados RNAs pequenos resultantes da degradação de dsRNA VSP.

[0046] Usando uma sonda RNA vsp9B10 parcialmente digerida para ensaios Northern blot em clones *Giardia* WB9B10 e WB1267, foram detectados RNAs pequenos para VSPs que não foram expressos (VSP1267 neste caso), mas não para o VSP9B10, que é expressado na superfície do clone WB9B10 (Fig. 4d). Estes resultados levantam a questão de como um único transcrito VSP atalha este processo de silenciamento e é traduzido e expressado na superfície do parasita.

[0047] Para provar se a concentração de transcrição VSP diferente tem um papel na mudança antigênica, a expressão VSP *in vivo* foi desbalanceada pela expressão cone de ambas vsp9B10 e vspH7 (número de registro GenBank AAA18202), ou construções contendo regiões anti-senso vsp9B10 sob controle de um promotor forte tal como o gene α -tubulina (Touz, M.C., Gottig, N., Nash, T.E. & Lujan, H.D. J. Biol. Chem. 277, 50557-50563 (2002) e Elmendorf, H.G. et al. Mol. Biochem. Parasitol. 113, 157-169 (2001)). A VSPH7 mostrou expressão variável, mesmo sob a pressão da droga de seleção, e a VSP9B10 também diminuiu com o tempo (Fig. 6). Além disso, quando a VSP9B10 foi nocauteada, sua expressão na superfície do parasita diminuiu mais rápido que no controle (Fig. 7). Estes resultados sugerem que a região promotora de VSPs tem pouca ou nenhuma influência na expressão de VSP e, portanto, que um mecanismo PTGS deve

estar envolvido na variação antigênica em *Giardia*.

[0048] Experimentos *in vitro* adicionais em que a concentração de transcritos VSP diferentes foi desbalanceada demonstraram que a concentração mRNA pode ser relevante para uma dada VSP para lograr o mecanismo de silenciamento e ser traduzida (Fig. 8). Estes resultados sugerem que o extrato de *Giardia* é programado para manter um transcrito VSP particular não modificado, mas pode iniciar a degradação RNA então quando uma VSP diferente está em concentração mais alta (o processamento de um dado transcrito pode depender da concentração citoplasmática relativa de cada VSP).

[0049] Silenciamento de RdRP, Dicer e AGO de *Giardia*

[0050] Uma vez que o silenciamento de um gene específico não é possível em *Giardia* devido a sua poliploidia e à presença de dois núcleos, foram conduzidos testes diretos para mostrar o envolvimento dos componentes RNAi caracterizados durante a variação antigênica pelo nocaute da expressão de *Giardia* Dicer, RdRp e AGO pela expressão constitutiva em trofozoítos de parte de seus transcritos anti-senso. Quando a redução da expressão de RdRP (RdRP-AS) ou Dicer (Dicer-AS) ocorreu (Fig. 9), foram gerados trofozoítos que expressam mais de uma VSP na sua superfície, como determinado por ensaio de imunofluorescência usando anticorpos monoclonais específicos (Fig. 10a e Tabela 2), citometria de fluxo (Fig. 10b) e Western Blot (Fig. 10c). O silenciamento de *Giardia* AGO não produziu qualquer clone viável, sugerindo que esta molécula é essencial para o parasita. Os trofozoítos do presente invento em que Dicer ou RdRP foram nocauteados proliferaram e enquistaram em cultura como normal, e não tiveram nenhum efeito danoso na regulação de VSP quando um procedimento de silenciamento ou nocaute foi aplicado (Tabela 2). A partir dos ensinamentos aqui descritos, é óbvio que Dicer, RdRP ou ambos podem ser silenciados ou nocauteados para obter um protozoário modificado, por exemplo, um protozoário *Plasmodium*, *Trypanosoma* modificado, ou qualquer outro protozoário exibindo um mecanismo de variação antigênica, com todos eles dentro do escopo do presente invento.

TABELA 2

Análise quantitativa da expressão vsp em *Giardia* com RdRP (RdRP-AS) e Dicer (Dicer-AS) nocauteados ou silenciados

VSP	Nenhum	Falso	RdRP-AS Giardia	Dicer-AS Giardia
VSP9B10	99 ± 0,5	98 ± 1,2	90 ± 0,6	18 ± 2,0
VSP1267	0	0,5 ± 1,2	96 ± 0,2	22 ± 0,9
VSPA6	0	0	48 ± 2,3	17 ± 1,3
VSPS1 0	0		62 ± 4,1	36 ± 2,1
VSPS2 0	0		33 ± 1,1	28 ± 3,9
VSPS7 0	0		73 ± 0,3	65 ± 4,4

[0051] A tabela mostra percentagens de trofozoítos Giardia expressando uma VSP particular determinada por ensaios de imunofluorescência usando anticorpos monoclonais específicos (Mab) (para VSP9B10, foi usado Mab 9B10; para VSP1267, 5C1; para VSPA6, 6A7; para VSPS1, 1B2; para VSPS2, 7B8; para VSPS7, 6F8) em trofozoítos WB9B10 transfectados com construções anti-senso de genes Giardia codificando RdRP e Dicer, tais como o plasmídeo sozinho vazio (falso) ou não transfectado (nenhum) após 5 dias de cultura. Imunoglobulinas de cabra anti-camundongo foram usadas como controle e não exibiram reação. Os dados são apresentados como média ± DP de 3 experimentos independentes, cada um conduzido em duplicata. Os resultados indicam, julgado da adição desta percentagem, que muitos VSPs diferentes podem ser expressos por um único trofozoíto.

[0052] Como pode ser observado na figura 10b, os clones exibiram padrões claros de expressão de uma única VSP, enquanto que os trofozoítos RdRP-AS e Dicer-AS evidenciaram a expressão de mais de uma VSP por trofozoíto.

[0053] Como mostrado na figura 10c, anticorpos monoclonais específicos anti-VSP9B10 somente reconhecem uma banda no clone 9B10 e em trofozoítos modificados, enquanto o anticorpo monoclonal 12F1 do presente invento reage com muitas espécies de proteínas nos trofozoítos modificados, indicando que muitas VSPs podem ser expressadas simultaneamente em Giardia quando a rota RNAi foi interrompida ou silenciada.

[0054] Em resumo, um sistema PTGS (compreendendo pelo menos RdRP e Dicer) está implicado na regulação da expressão de antígeno de superfície em *G. lamblia*. Porque uma resposta imune humoral em ambos hospedeiros infectados com Giardia experimental e natural coincide com a eliminação da VSP original, foi proposto um papel funcional para

células e anticorpos na seleção de variantes fenotípicas no curso da infecção. Dado que a proteção do parasita contra respostas imunes específicas baseia-se na alteração da expressão entre proteínas de superfície imunologicamente distintas, um meio pelo qual os hospedeiros podem evitar infecções com uma resposta imunológica específica é produzindo anticorpos contra todos os determinantes antigênicos de superfície. Estes resultados demonstrariam que a regulação diminuída dos componentes do mecanismo RNAi conduz à expressão de mais de uma proteína de superfície em trofozoítos ou protozoários, onde estes protozoários modificados constituem uma ferramenta fundamental para a geração de uma vacina contra patógenos importantes humanos ou animais, ou contra qualquer microorganismo patogênico tendo variabilidade antigênica, por exemplo *Plasmodium* ou *Trypanosoma*.

[0055] Para determinar se os trofozoítos *Giardia* modificados expressando todo o repertório de VSPs poderiam ser usados como vacinas, foram conduzidos estudos em um modelo experimental de giardíase em ratos do deserto. Primeiramente, foram gerados trofozoítos WB a partir de isolamentos expressando o repertório completo de VSPs pelo nocaute da expressão de *Giardia* Dicer (DAS) ou *Giardia* RdRP (RAS) como mostrado nos exemplos. Adicionalmente, foram obtidas populações de trofozoítos expressando somente VSPs de superfície limitando a diluição em isolamentos celulares WB e GS controlados pelo uso de Mab contra dadas VSPs. A figura 11 mostra que os trofozoítos onde Dicer (Fig. 11a) ou RdRP (Fig. 11b) foram silenciados expressam muitas VSPs na sua superfície, por exemplo como visto no ensaio de imunofluorescência direta mostrando a co-localização (amarelo) de VSP9B10 (verde) e VSP1267 (vermelho). Como pode ser visto, a maioria dos trofozoítos expressa mais de uma VSP na sua superfície. A percentagem de células que expressam diferentes VSPs na sua superfície foi determinada pelo uso de um painel de anticorpos monoclonais dirigidos contra VSPs diferentes (Tabela 3).

TABELA 3

Mab	WB9B10	DAS	R&S	D&S + R&S
Controle	0	0	0	0
9B10	99	78	67	75
5C1	0	96	51	93
6E7	0.1	89	93	84
G10/4	0	0	0	0

9C9	0	0	0	0
1B2	0	66	92	91
7B8	0	89	74	84
6F8	0	87	46	71
7G8	0	90	89	88
1B4	0	77	52	68

[0056] Estas percentagens demonstram que as células são simultaneamente expressadas numa grande quantidade de VSPs na sua superfície (> 100%). Estes trofozoítos modificados crescem e enquistam in vitro como células do tipo selvagem, indicando que o silenciamento destas enzimas não interfere com outros processos celulares. Em cultura, os trofozoítos trocam espontaneamente de uma VSP para outra, e portanto, as populações de células expressando uma VSP específica na sua superfície são mantidas exclusivamente em cultura por 24 h após a clonagem e seleção, a fim de garantir a homogeneidade da população. A fig. 11c mostra que todos os trofozoítos de uma cultura não clonada de isolados WB podem ser rotulados (após permeabilização) com o anticorpo monoclonal do presente invento específico para a cauda citoplásmica CRKGA comum a todas as VSPs conhecidas. As populações clonais de trofozoítos expressando somente uma VSP (VSP9B10, VSP1267, VSPA6), como determinado por ensaios de imunofluorescência indireta contrastada com DAPI, podem ser observadas nas figuras 1d-f (Mab 9B10, Mab 5C1, Mab 6E7, respectivamente). Estas populações de Giardia foram inicialmente usadas para infectar ratos do deserto SPF. A infecção foi iniciada com a inoculação orogástrica de trofozoítos e liberação de cistos, claramente indicando uma infecção animal. Os cistos de Giardia foram avaliados e identificados em amostras de fezes por ensaios de imunofluorescência com anticorpos monoclonais específicos a CWP2 (Mab 7D2). Adicionalmente, a quantidade de cistos por grama de fezes gerada por estes animais foi contada a fim de determinar a infectividade e virulência de cada população celular de tipo modificado e tipo selvagem. A fig. 12a mostra que todas as populações poderiam estabelecer infecção em ratos do deserto saudáveis. O início da aparição de cistos nas amostras de fezes e a quantidade de cistos variaram ligeiramente entre os diferentes trofozoítos usados. Alguns animais foram sacrificados e o conteúdo intestinal foi recuperado a fim de verificar a presença de trofozoítos no intestino delgado. Os animais

infectados mostraram alguns episódios de diarreia durante a segunda semana de infecção, e alguns deles perderam peso. A fim de evitar a probabilidade de alguns animais cronicamente infectados com pequenas quantidades de trofozoítos, metade dos animais foi tratada com metronidazol para curar qualquer infecção não detectada.

[0057] A fim de determinar se a infecção primária com trofozoítos expressando uma VSP particular (VSP9B10 e VSP1267) ou com trofozoítos expressando o repertório completo de VSPs (DAS, RAS, DAS + RAS) protegeram os animais contra infecções subsequentes, os mesmos animais foram inoculados com uma população clone de trofozoítos expressando uma VSP específica (VSP9B10 ou VSP1267) 2 meses após a auto-cura da infecção primária. As figs. 12b e 12c mostram os resultados da eliminação de cistos em animais previamente infectados com WB9B10 ou WB1267, respectivamente. As figs. 12d e 12e mostram os resultados de animais previamente infectados com trofozoítos DAS ou RAS, respectivamente. Os resultados indicam claramente que (a) animais infectados com trofozoítos expressando uma única VSP foram refratários a uma segunda infecção com células expressando a mesma VSP, sugerindo o desenvolvimento de uma forte resposta imune durante a infecção original contra uma dada proteína de superfície (Figs. 12a e 12b), (b) animais infectados com células expressando uma VSP particular foram facilmente re-infectados com trofozoítos expressando uma VSP diferente, sugerindo que, similarmente às observações de infecção humana, as re-infecções são comuns após a cura ou tratamento médico (Figs. 12b e 12c). (c) Em contraste, animais infectados com populações de trofozoítos expressando o repertório completo de VSPs foram protegidos contra infecções posteriores com populações clone expressando somente uma VSP na sua superfície (Figs. 12d e 12e). Os mesmos desafios experimentais foram realizados 2, 4, 6 e 12 meses após a infecção original, com resultados idênticos (Tabelas 4 e 5).

TABELA 4: Desafio com trofozoítos clones WB9B10 e percentagem de ratos de deserto infectados (entre parênteses)

Infecção primária com	Número de ratos	MNZ	Desafio no mês 2 (% de infecção)	Desafio no mês 4 (% de infecção)	Desafio no mês 12 (% de infecção)
Nenhum	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
Nenhum	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A

WB9B10	30	Sim	30- (0%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Não	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WB1267	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Não	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Sim	27- 3+ (10%)	30- (0%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	Não	29- 1k (0%)	28- 2k (0%)	27- 3k (0%)
RdRP-AS	90	Sim	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	Não	28- 2+ (6.6%)	28- 2k (0%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Sim	28- 1+ 1k (3.3%)	30- (0%)	29- 1+ (3.3%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Não	29- 1k (0%)	29- 1+ (3.3%)	30- (0%)

TABELA 5: Desafio com trofozoítos clone WB1267 e percentagens de ratos infectados (entre parêntesis)

Infeção primária com	Número de ratos	MNZ	Desafio no mês 2 (% de infecção)	Desafio no mês 4 (% de infecção)	Desafio no mês 12 (% de infecção)
Nenhum	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
Nenhum	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Sim	30- (0%)	N/A	N/A
WB1267	30	Não	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WBA6	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Sim	28- 2+ (6.6%)	28- 1+ 1k (3.3%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	Não	29- 1+ (3.3%)	29- Id (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	Sim	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)
RdRP-AS	90	Não	28- 1+ 1k (3.3%)	28- 2k (0%)	30- (0%)

Dicer-AS & RdRP-AS	90	Sim	28- 2+ (6.6%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Não	30- (0%)	30- (0%)	30- (0%)

[0058] Ensaios de imunofluorescência executados nas fezes de animais escolhidos usando um anticorpo monoclonal contra Giardia CWP2 mostraram claramente a liberação de cistos em animais infectados e ausência naqueles protegidos (Fig. 13). Como pode ser observado, os animais previamente infectados com o clone WB9B10 foram refratários a infecção subsequente com o mesmo clone (nenhum cisto foi encontrado nas fezes) mas foram infectados com trofozoítos expressando VSP1267 (um alto número de cistos foi detectado). Os ratos previamente infectados com trofozoítos DAS ou RAS foram protegidos contra infecções subsequentes com clones WB9B10 ou WB1267 (nenhum cisto foi encontrado nas amostras de fezes).

[0059] Para determinar se os cistos obtidos nas infecções originais (de VSP desconhecido de trofozoítos liberados) poderia infectar estes animais, os ratos previamente infectados com populações DAS, RAS e DAS + RAS foram inoculados com uma grande quantidade de cistos. Os resultados da tabela 6 mostram que, como animais inoculados com populações particulares de trofozoítos, os animais foram refratários à infecção, em comparação com os ratos de controle. Todos juntos, estes resultados mostram firmemente que uma resposta imune a todas as VSPs é necessária para evitar a geração de novas infecções.

TABELA 6: Desafio de infecção por cistos e percentagem de ratos infectados (entre parêntesis)

Infecção primária com	Número de ratos	MNZ	Desafio no mês 2 (% de infecção)	Desafio no mês 4 (% de infecção)	Desafio no mês 12 (% de infecção)
Nenhum	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
Nenhum	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Não	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Não	29+ 1k (96.6%)	N/A	N/A
WBA6	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A

WBA6	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Sim	30- (0%)	30- (0%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	Não	29- 1k (0%)	30- (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	Sim	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	Não	29- 1+ (3.3%)	28- 1+ 1k (3.3%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Sim	29- 1+ (3.3%)	30- (0%)	30- (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Não	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)

[0060] Em adição, os sintomas observados durante a infecção primária desapareceram durante a infecção desafio. Estes resultados novamente indicam a necessidade da resposta imune contra todas as VSPs para evitar novas infecções.

[0061] Por outro lado, o soro e o conteúdo intestinal foram obtidos de animais infectados e de animais de controle, e foram postos in vitro com trofozoítos expressando uma ou várias VSPs. O soro ou conteúdo intestinal de animais não infectados não teve efeito sobre a morfologia, viabilidade ou motilidade dos parasitas (Fig. 14). Em contraste, quando uma população clone de trofozoítos expressando um único VSP foi incubada com Mab contra dita proteína ou com soro ou conteúdo intestinal de animais infectados com a mesma, ocorreu a separação e aglutinação de toda a população, indicando a presença de anticorpos contra a proteína de superfície. A incubação com soro ou conteúdo intestinal de ratos infectados com um clone diferente não mostrou nenhum efeito significativo (Fig. 14). Quando uma população clone encarou soro ou conteúdo intestinal dos ratos infectados com células silenciadas Dicer ou RdRP, ocorreu uma forte aglutinação de trofozoítos (Fig. 14). Estes resultados indicam que ratos infectados foram capazes de desenvolver uma resposta imune forte às VSPs presentes nos trofozoítos, e outros antígenos que poderiam estar presentes nas superfícies celulares são irrelevantes, não só para a produção de anticorpos mas também para conferir proteção contra infecções posteriores.

[0062] Em adição, fluidos contra trofozoítos de isolados GS/M (montagem B). Neste caso, o soro e conteúdo intestinal de animais infectados com trofozoítos DAS e RAS mostraram aglutinação celular parcial (entre 30 e 40%) indicando que estas montagens podem

compartilhar alguns epitopos comuns em suas VSPs.

[0063] Por outro lado, foram obtidas linhas de hibridoma produzindo anticorpos monoclonais contra a cauda citoplásmica VSP com a sequência de aminoácidos CRKGA.

Imunização de ratos do deserto com VSP purificada

[0064] O repertório completo de VSPs foi purificado a partir de trofozoítos modificados DAS e RAS (vide exemplos) usando o anticorpo monoclonal que reage contra a cauda citoplasmídea de 5 aminoácidos presentes em todas VSPs. Como controle, um antígeno intracelular GRP78/BiP de *Giardia* foi sobre-expressado e imunopurificado. Os animais foram então imunizados com estes preparados de proteínas, sem coadjuvante, pela administração de três doses orogástricas por 3 dias. Em todos os casos, a vacinação não causou sintomas da doença, indicando que as VSPs sozinhas não são tóxicas para os animais. Após 2 meses, os animais foram inoculados com parasitas expressando VSPs particulares. A infecção animal foi monitorada pela contagem de cistos nas fezes e em alguns casos sacrificando animais a fim de observar a presença de trofozoítos no intestino delgado. A imunização oral com o repertório completo de VSPs gera uma forte resposta imune, que evita a infecção animal; resultados similares foram observados durante as infecções primárias. Em adição, os animais de controle inoculados com veículo ou GPR78/BiP estavam prontamente infectados com populações clones de trofozoítos (Fig. 15). As VSPs individuais purificadas usadas como imunógenos mostraram resultados idênticos àqueles observados nos experimentos de infecção descritos acima. A proteção gerada pela preparação do repertório completo de VSPs permaneceu por pelo menos um ano (Tabelas 7, 8 e 9).

TABELA 7: Desafio com trofozoítos clone WB9B10 e percentagens de ratos infectados (entre parêntesis) após imunização com VSPs purificadas

Infecção primária com	Número de ratos	MNZ	Desafio no mês 2 (% de infecção)	Desafio no mês 4 (% de infecção)	Desafio no mês 12 (% de infecção)
Nenhum	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Sim	30- (0%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Não	28- 2+ (6.6%)	N/A	N/A
WB1267	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A

WB1267	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Sim	25- 5+ (16.6%)	27- 3+ (10%)	28- 1+ 1k (3.3%)
Dicer-AS	90	Não	26- 3+ 1k (10%)	25- 1+ 4k (3.3%)	27- 3+ (10%)
RdRP-AS	90	Sim	28- 2+ (6.6%)	28- 1+ Id (3.4%)	28- 1+ 1k (3.3%)
RdRP-AS	90	Não	26- 2+ 2k (6.6%)	27- 2+ 1k (6.6%)	30- (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Sim	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	30- (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Não	29- 1k (0%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)
BiP	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
BiP	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A

TABELA 8: Desafio com trofozoítos clone WB1267 e percentagens de ratos infectados (entre parêntesis) após imunização com VSPs purificadas

Infecção primária com	Número de ratos	MNZ	Desafio no mês 2 (% de infecção)	Desafio no mês 4 (% de infecção)	Desafio no mês 12 (% de infecção)
Nenhum	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
Nenhum	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Sim	30- (0%)	N/A	N/A
WB1267	30	Não	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WBA6	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Não	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Sim	29- 1+ (3.3%)	27- 2+ 1k (6.6%)	29- 1+ (3.3%)
Dicer-AS	90	Não	27- 3+ (10%)	24- 2+ 4k (10%)	29- 1+ (3.3%)
RdRP-AS	90	Sim	28- 2+ (6.6%)	29- 1+ (3.3%)	28- 2k (0%)
RdRP-AS	90	Não	26- 3+ 1k (10%)	29- 1+ (3.3%)	30- (0%)
Dicer-AS &	90	Sim	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (3.3%)

RdRP-AS					
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Não	29- 1k (0%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)
BiP	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
BiP	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A

TABELA 9: Desafio de infecção com cistos e percentagens de ratos infectados (entre parêntesis)

Infecção primária com	Número de ratos	MNZ	Desafio no mês 2 (% de infecção)	Desafio no mês 4 (% de infecção)	Desafio no mês 12 (% de infecção)
Nenhum	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
Nenhum	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Não	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Sim	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Sim	29+ 1- (96.6%)	N/A	N/A
WBA6	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Sim	27- 3+ (10%)	27- 3+ (10%)	28- 2+ (6.6%)
Dicer-AS	90	Não	25- 3+2k (10%)	23- 2+ 5k (10%)	30- (0%)
RdRP-AS	90	Sim	30- (0%)	28- 1+ 1k (3.3%)	29- 1+ (3.3%)
RdRP-AS	90	Não	28- 2+ (6.6%)	27- 1+ 2k (6.6%)	29- 1+ (3.3%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Sim	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Não	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)	29- 1k (0%)
BiP	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A
BiP	30	Não	30+ (100%)	N/A	N/A

[0065] Interessantemente, deve ser apontado que embora a infecção por Giardia algumas vezes não apresente inflamação, intestinos de ratos infestados exibiram aumento no tamanho de nódulos linfóides agregados (Peyer patches) e em neutrófilos infiltrantes, células mastóides, e linfócitos no epitélio intestinal (Fig. 16) alterações macro e

microscópicas do intestino delgado não estavam evidentes nos ratos imunizados (Fig. 16).

[0066] Estes resultados indicam que ambos infecção inicial e imunização com preparados de VSPs podem conferir proteção imune aos animais, capaz de evitar infecções posteriores com cistos ou clones de *Giardia* obtidos a partir de amostras de fezes da pessoa infectada.

[0067] Em todos os casos, N/A significa não aplicável, d significa animais sacrificados para detectar parasitas intestinais.

[0068] Os protozoários modificados *Giardia* e as vacinas do presente invento aumentam a imunidade de qualquer mamífero contra infecções produzidas por protozoários tendo mecanismos de variação antigênica para superar a resposta imune do hospedeiro. Ambos protozoários do tipo selvagem e modificado ou silenciado geram uma infecção com pico de excreção de cisto no dia 15 e auto-resolvida no dia 30.

[0069] Os animais tratados ou não com metronidazol mostraram um padrão de proteção similar a infecções subseqüentes.

[0070] Os cistos gerados por ambos tipos de trofozoítos, selvagem e modificado (silenciado) são infectantes para ratos nativos.

[0071] Os ratos infectados com *Giardia* viva expressando somente uma VSP na sua superfície estão protegidos contra infecções posteriores pelo mesmo clone.

[0072] Os ratos infectados com *Giardia* viva expressando somente uma VSP na sua superfície não estão protegidos contra infecções posteriores de clones diferentes.

[0073] Os ratos infectados com trofozoítos vivos de *Giardia* expressando o repertório completo de VSPs, por exemplo, pelo silenciamento de Dicer e/ou de RdRP, estão protegidos contra infecções posteriores com populações de clones diferentes.

[0074] Os ratos infectados com trofozoítos vivos de *Giardia* expressando o repertório completo de VSPs, por exemplo pelo silenciamento de Dicer e/ou de RdRP, estão protegidos contra infecções posteriores com cistos obtidos de amostras de fezes humanas.

[0075] Os ratos infectados com trofozoítos mortos de *Giardia* expressando o repertório completo de VSPs, por exemplo pelo silenciamento de Dicer e/ou de RdRP, estão protegidos contra infecções posteriores com populações de clones diferentes.

[0076] Os ratos imunizados com VSPs purificadas estão protegidos contra infecções posteriores com populações de clones diferentes.

[0077] Os ratos imunizados com um antígeno intracelular purificado não estão protegidos contra infecções posteriores.

[0078] A infecção primária com células expressando o repertório completo de VSPs gera uma resposta imunológica que protege os animais contra infecções posteriores (proteção entre 87 e 100%).

[0079] Nenhuma formulação de vacina mostrou efeitos tóxicos nos animais.

[0080] O presente invento é melhor ilustrado pelos exemplos seguintes, que não devem ser considerados como uma limitação do seu escopo.

Exemplos

[0081] Exemplo 1: Cultura e clonagem de parasitas: trofozoítos de *Giardia* foram cultivados em meio TYI-33 suplementado com soro bovino adulto e bile bovina (Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., Bowers, B. & Nash, T.E., J. Biol. Chem. 270, 29307-29313 (1995)). A clonagem contínua de trofozoítos foi executada limitando-se a diluição e seleção baseada em ensaios de imunofluorescência usando o anticorpo monoclonal anti-VSP correspondente. O enquistamento foi executado como previamente relatado (Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., Bowers, B. & Nash, T.E., J. Biol. Chem. 270, 29307-29313 (1995)). Foram usados trofozoítos de *Giardia lamblia* das cepas de clone WB 9B10, 1267 e A6 e da cepa de clone GS H7.

[0082] PCR: o DNA total de trofozoíto de *G. lamblia* foi isolado como descrito em Mowatt, M.R.L., H.D.; Cotten, D.B.; Bowers, B.; Yee, J.; Nash, T.E.; Stibbs, H.H., Mol. Microbiol. 15, 955-63 (1995).

[0083] a: iniciadores senso S1 (5'-CVT GTG CHR RST GCA A-3 ') (SEQ ID N° 113), S2 (5'-TGC ACS RSC TGC YAB CC-3') (SEQ ID N° 114), S3 (5'-TAG TGY DSY VMV TGY AA-3 ') (SEQ ID N° 115) e S4 (5'-CGA TCA TGA CGG GCT TCT-3') (SEQ ID N° 116). Iniciadores anti-senso R1 (5'-CCB ACG AGG CCY CCS ACG AC-3') (SEQ ID N° 117) e R2 (5'-CGC CTT CCC KCK RCA KAY GA-3 ') (SEQ ID N° 118). As condições da PCR foram: desnaturação a 94°C por 40 s, hibridização a 53°C por 40 s e alongamento a 72°C por 90 s, usando Taq polimerase de alta fidelidade (Invitrogen) por um total de 35 ciclos.

[0084] RT-PCR. Os iniciadores senso (S1-S4) de VSP foram adicionados a 1 µg de RNA total e aquecidos a 70°C por 5 min. As amostras de reação de transcrição reversa (2 µL)

foram amplificadas usando todas as combinações possíveis dos iniciadores senso/anti-senso listados acima ou usando iniciadores específicos vsp1267 e vsp9B10 (1267_F, 5'-ATG TTG TTG ATA GCC TTC TAT C-3') (SEQ ID N° 119); 1267_R, 5'-CTA CGC CTT CCC CCT GCA TAT G-3' (SEQ ID N° 120); 9B10_F, 5'-ATG TTT GGC AGT TTT GTT CTC-3' (SEQ ID N° 121); 9B10_R, 5'-TCA CGC CTT CCC TCT ACA TAT G-3' (SEQ ID N° 122)). Os produtos da RT-PCR foram analisados por eletroforese e purificados pelo Kit de Extração em gel Qiaex II (Qiagen). Para estudar a expressão de genes diferentes durante os experimentos de diferenciação ou no silenciamento de trofozoíto *Giardia*, a RT-PCR foi usada com os seguintes pares específicos de iniciadores: gDicer (645 bp): HL160, 5'-TGG CGG CGT CGT ATC AGT TAT -3' (SEQ ID N° 123), HL161, 5'-TCC CCG CAC GCA AGA AGA A-3' (SEQ ID N° 124); gAgo (912 bp): HL164, 5'-ATT GCC CCC TAC GGT GTC-3' (SEQ ID N° 125), HL165, 5'-CTC TGC CGG CCT TCC TAC-3' (SEQ ID N° 126), gRdRP (569 bp): HL187, 5'-CAT GGG TTG CAG TTT CTT GAC GA-3' (SEQ ID N° 127), HL188, 5'-AGC CCC TTA TCT GTT GCC TCC TTC-3' (SEQ ID N° 128); e CWP1 controle de expressão diferencial (533 bp): HL183, 5'-TCG CCC TGG ATG TTT CGG ACA T-3' (SEQ ID N° 129), HL184, 5'-AGG CGG GTG AGG CAG TA-3' (SEQ ID N° 130), e GDH expressão constitutiva (407 pb): HL185, 5'-AGT GGG GCG GGT CTT TAC TCA-3 (SEQ ID N° 131) ', HL186, 5'-TGT TCG CGC CCA TCT GGT AGT TCT -3' (SEQ ID N° 132). Os produtos dessas reações também foram isolados, rotulados, e usados como sondas para análise Northern blot, como indicado abaixo.

[0085] Hibridização Northern: O RNA total (de 10 a 15 µg) foi fracionado em um gel 1,2% de agarose-formaldeído, transferido para uma Hybond N+ (GE) e fixado com um reticulador UV (UVP) por procedimentos padrão. O fragmento conservado da extremidade C-terminal (iniciador anti-senso R2) foi rotulado radiativamente com T4 polinucleotídeo quinase usando γ -³²P-ATP (Sistema de rotulação de extremidade 5' Promega) grdrp bem como outros fragmentos de DNA, foram uniformemente rotulados por iniciação aleatória (Sistema de rotulação Promega Prime-A-Gene).

[0086] Análise Nuclear run-on: as células foram re-suspensas em 1 mL de tampão de lise gelado (10 mM tris-HCl pH 8,4, 1,5 mM MgCl₂, 0,14 M NaCl, e coquetel inibidor de protease Complete™) a 4°C; 2,25 µL de Nonidet P-40 foram adicionados e a suspensão

foi incubada por 15 min em gelo. Os núcleos foram recuperados por centrifugação a 2000 g por 1 min e lavados duas vezes em 1 mL de tampão de lavagem de núcleos gelado (20 mM tris-HCl pH 8,4, 140 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20% (v/v) glicerol e 14 mM β-mercaptoetanol) a 4°C. Então, os núcleos foram re-suspensos em 50 µL de tampão de rotulação (20 mM tris-HCl pH 8,4 a 4°C, 140 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20% (v/v) glicerol e 14 mM β-mercaptoetanol, 1 mM de cada de ATP, GTP e CTP, 10 mM de fosfocreatina, 100 µg/mL de fosfocreatina quinase e 0,1 µM 32P-UTP, 5000 µCi/mL) e incubado por 40 min a 37°C. Os produtos VSP gerados por RT-PCR e 3 µg de vsp9B10, vsp1267, vspH7 e vspA6 clonados em vetor pGEM T-easy (Promega) foram transferidos sobre Hybond N+ usando um aparelho slot blot (BioRad). Adicionalmente, os transcritos senso e anti-senso gerados na reação de transcrição in vitro também foram analisados sob condições similares.

[0087] Detecção de RNA pequeno: A detecção de RNA pequeno foi realizada como relatado previamente (Hutvagner, G. Mlynarova, L. & Nap, J. P. Detailed, RNA 6, 1445-1454 (2000)). Brevemente, 15 µg de RNA total de *G. lamblia* foram desnaturados por 10 min. a 65°C em tampão de carga 1x e carregados em um gel 15% de poliacrilamida/7 M uréia. Após a separação eletroforética, o RNA foi eletromanchado em tampão 0,5x Trisborato-EDTA (pH 8) sobre uma membrana Hybond N+ por 45 min a 100 V em TBE 0,5x, e finalmente fixado por UV. As ribo-sondas marcadas com 32P foram transcritas in vitro por RNA polimerase T7 ou SP6 usando os genes VSP 9B10, 1267 e H7 clonados em vetor p-GEM T-easy (Promega). O RNA rotulado foi parcialmente hidrolisado durante 1 h por incubação a 60°C na presença de 80 mM de NaHCO₃ e 160 mM de Na₂CO₃. Cada transcrito VSP hidrolisado foi hibridizado em 25% formamida, 0,5 NaCl, 25 mM EDTA, 1x solução de Denhardt e 150 µg/mL de DNA de espermatozoides de salmão desnaturado e incubado a 42°C de um dia para o outro. Após a hibridização, as membranas foram lavadas 2x em SSC, 0,5% SDS por 30 min e uma vez em 0,5x SSC, 0,5% SDS por 15 min a 45°C. Subseqüentemente, cada transcrito vsp hidrolisado reverso foi hibridizado da mesma forma e os sinais das membranas foram detectados por exposição a filmes Kodak XAR a 70°C ou a um fosfoimager (Amersham). Os padrões de comprimento foram de uma fonte comercial (marcadores de RNA Decade™, Ambion).

[0088] Atividade de endonuclease: A atividade Dicer foi analisada pela incubação de

moléculas dsRNA com extratos citoplásmicos de clones WB9B10, WBA6 ou WB1267 de *Giardia*. Os genes vsp9B10, vsp1267, vspH7, cwp2 e gdh clonados no vetor p-GEM T-easy (Promega) foram transcritos in vitro para produzir sondas RNA ^{32}P rotuladas de comprimento total, que foram purificadas e testadas para a ausência de contaminantes RNA pequeno. Os transcritos vsp puros ou misturados foram produzidos pelo recozimento de quantidades iguais de RNAs senso e anti-senso transcritos in vitro (vsp1267, vsp9B10, cwp2 e gdh), rotulados com não com ^{32}P -UTP. Estes dsRNAs foram re-suspensos em Tris-HCl (pH 7,5)/20 mM NaCl, aquecidos a 95°C por 1 min. e resfriados até a temperatura ambiente por 12 h. Os lisados celulares foram gerados a partir de 1×10^7 - 1×10^8 células, que foram re-suspensas em 500 μL de tampão (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM sucrose e contendo o coquetel inibidor de protease CompleteTM), sonificados e centrifugados a 2000 g por 15 min para separar células não rompidas e núcleos, e então incubados com dsRNA a 37°C por 1 h. Então, o RNA total foi extraído, submetido a eletroforese, e transferido como indicado acima para RNA pequeno. A seleção de RNAs de baixo peso molecular foi feita por filtração através de unidades de filtro Microcon-100. O filtrado, contendo RNAs pequenos, foi precipitado com 300 mM NaCl/0,6 mL de isopropanol, carregado em gel de 20% poliacrilamida/7 M de uréia, e submetido a eletroforese. Para determinar os efeitos de ATP na atividade de endonuclease, o ATP foi empobrecido pela incubação de extratos citoplásmicos de *Giardia* com 2 mM de glicose/0,1 U/ μL de hexoquinase (Sigma) por 30 min a 35°C. Então o dsRNA vsp1267 rotulado com ^{32}P -UTP foi adicionado ao lisado na presença ou ausência de 10 mM de fosfocreatina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de fosfocreatina quinase, ou ambos, por de 1 a 3 h a 37°C. O RNA total foi extraído usando Trizol e as amostras de RNA foram enriquecidas de RNAs de baixo peso molecular usando a unidade de filtração Microcon-100 como descrito acima. As amostras foram submetidas a eletroforese e os produtos foram detectados como descrito acima. Os produtos do processamento de dsRNA usando extratos de *Giardia* foram purificados em gel, ligados, amplificados, clonados e seqüenciados (Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K & Ullu, E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14687-14692 (1998)).

[0089] Para determinar a natureza dos RNAs pequenos, eles foram tratados com fosfatase alcalina (para demonstrar a presença de fosfatos 5') ou submetidos a oxidação com

periodato seguida de β -eliminação (para confirmar a presença de hidroxilas 3'), como descrito por Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001).

[0090] Clonagem, seqüenciamento e atividade de RdRP: Por RT-PCR, a síntese de cDNA foi realizada usando o RNA total extraído dos trofozoítos e oligo(dT)20 como iniciadores. O alinhamento dos RdRP conhecido de vários organismos, em conjunto com o conhecimento do uso de códon em *Giardia* permitiu o desenho de iniciadores moderadamente degenerados: RdRP_F: (5'-TA (T / C), GT (T / C) TTT AC (T / C) GAT GGC G (C / G) A GG) -3 ') SEQ ID N° 133 e SEQ ID N° 134; e RdRP_R: (5'-TCA CC (A / G) TCC AGG TC (G / A) CTG CC) -3 ') SEQ ID N° 135 e SEQ ID N° 136. O produto PCR gerado usando estes oligonucleotídeos foi submetido a eletroforese, purificado em gel, radio-rotulado por iniciadores aleatórios e usado para pesquisa numa biblioteca cDNA de *G. lamblia* em λ gt22a como relatado (Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T., *Genes Dev* 15, 188-200 (2001)). A pesquisa na biblioteca λ ZAP gDNA foi realizada como descrito (Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T., *Genes Dev* 15, 188-200 (2001)). Os fragmentos de DNA foram clonados em pBlueScript SKII+ e submetidos a seqüenciamento automático. Foram realizadas três execuções 5' usando um kit comercial da Invitrogen e iniciadores 5'-CTT GTG CAT AGT AAA CAA AG-3 ' SEQ ID N° 137 e 5'-CAA ATG GTC GAT GCT GGG-3' SEQ ID N° 138. Para atividade gRdRP in vitro, RdRP HA-marcado foi purificado a partir de trofozoítos transfectados por afinidade usando sefarose antiHA (Sigma). A atividade de enzimas foi ensaiada a 35°C por 60 min em 20 μ L de mistura de reação contendo 50 mM Hepes pH 7,6, 20 mM de acetato de amônio, 5 mM de $MgCl_2$, 0,1% Triton X-100, 1 mM de cada de quatro ribonucleosídeo trifosfato (incluindo α - ^{32}P -UTP) e 1 U/ μ L de RNasin, mais a adição de substratos ssRNA (250 μ g/mL) preparados pela transcrição in vitro como descrito, com ou sem a presença de iniciadores VSP específicos. Os produtos de reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose seguido de transferência e autoradiografia.

[0091] Ensaios de transfecção e imunofluorescência: o Plasmídeo PTubPac37 foi modificado para introduzir todas as regiões codificantes gRdRP, gDicer, gAgo e VSPH7 e, quando correspondendo, o epitopo Influenza Hemaglutinina (HA) antes do códon de parada TAA (Touz, M.C., Gottig, N., Nash, T.E. & Lujan, H.D., *J. Biol. Chem.* 277, 50557-

50563 (2002)). A região codificadora gAgo foi introduzida no plasmídeo pTubNterPac em que o gene foi introduzido após a região codificadora Hemaglutinina para evitar a possível interferência do HA com o domínio PIWI. Este plasmídeo é uma modificação do pTubHAPac com a substituição do sítio original de clonagem múltipla por um novo (MCSnewSense: 5' GAT TCC GGG CCC AGATCT ATC GAT ACG CGT ATG CAT TCG CGA GAT ATC TGC 3' SEQ ID Nº 139; MCSnewAntisense: 5' GCG GCC GCA GAT ATC TCG CGA ATG CAT ACG CGTATC GAT AGA TCT GGG CCC G 3' SEQ ID Nº 140). A transfecção de trofozoítos de *G. lamblia* foi feita por eletroporação como já descrito (Yee, J. & Nash, T.E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5615-5619 (1995)). A transfecção de trofozoítos de *G. lamblia* foi feita por eletroporação como previamente descrito. As células foram incubadas em gelo por 10 min, cultivadas em meio de crescimento de um dia para o outro a 37°C e selecionadas como células resistentes a puomicina. Foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta usando anticorpo monoclonal anti-HA (Sigma) em trofozoítos não enquistantes quinze dias após a transfecção como descrito por Touz, M.C., Gottig, N., Nash, T.E. & Lujan, H.D. J. Biol. Chem. 277, 50557-50563 (2002). Os anticorpos monoclonais anti-VSP previamente relatados foram usados para testar a expressão em diferentes VSPs em trofozoítos fixados como descrito por Touz, M.C., Gottig, N., Nash, T.E. & Lujan, H.D. J. Biol. Chem. 277, 50557-50563 (2002). Novos anticorpos monoclonais gerados nesse estudo foram usados similarmente. As imagens confocais foram coletadas usando um microscópio confocal de varredura laser Zeiss LSM5 Pascal equipado com um laser de argônio/hélio/neônio e uma objetiva imersa em óleo 100x (abertura numérica = 1,4) (Zeiss Plan-Apochromat). Foram tiradas seções confocais de 0,3 µm paralelas à lamínula (seções z). As imagens foram obtidas usando uma câmera Zeiss acoplada e processadas com LSM e software Adobe Photoshop. Para análise funcional de gRdRP, gDicer, gAgo, e VSP9B10, foram usados iniciadores senso específicos a contendo um sítio Eco RV e iniciadores anti-senso com um sítio Nco I para amplificar por PCR uma porção da ORF de cada gene. Os produtos PCR foram purificados, restritos e clonados no vetor pTubHAPac. Desta forma, os genes foram inversamente inseridos dentro do pTubHAPac, dando a construção anti-senso que foi então usada para a inibição da expressão (Touz, M.C., Gottig, N., Nash, T.E. & Lujan, H.D. J. Biol. Chem. 277, 50557-50563 (2002)). As

seqüências foram sempre confirmadas por seqüenciamento de ciclo terminador corante. Os nocautes de genes foram confirmados por RT-PCR e gRT-PCR usando os iniciadores específicos de genes indicados acima no RNA total extraído dos trofozoítos transfectados e comparado com o controle de células transfectadas somente com o vetor ou com o mesmo vetor expressando a versão HA-marcada de cada molécula.

Exemplo 2

[0092] Produção de anticorpos monoclonais para o amino ácido 5 de VSPs e para VSPs individuais: camundongos BALB/c fêmeas de seis semanas de vida foram imunizados subcutaneamente com 200 mg de (a) um preparado purificado via HPLC de peptídeo NH₂-CRGKA-COOH conjugado com KLH usando o reticulador sMBS, ou (b) o peptídeo antígeno múltiplo sintético [NH₂-CRGKA]8-[K]7-bAla-OH (ambos de Biosynthesis, Inc.), ou extrato de proteínas de trofozoítos cultivados derivados do isolado WB, emulsificado em sistema coadjuvante Sigma (Sigma). Os camundongos foram inoculados subcutaneamente após 21 dias com 200 mg do mesmo preparado e 20 dias mais tarde foram inoculados intravenosamente com 100 mg do preparado antigênico. Três dias mais tarde, os camundongos foram sacrificados e as células do fígado foram usadas para fusão às células NSO mieloma. Os hibridomas secretando anticorpos foram analisados por ELISA usando os peptídeos originais e por imunofluorescência indireta usando trofozoítos enquistantes e não enquistantes (Jambhekar, A.D. et al., RNA 13, 625-642 (2007) e Aggarwal, A. Merritt, J.W., Jr. & Nash, T.E. Cysteinerich; Mol. Biochem. Parasitol. 32, 39-47 (1989)). Os anticorpos monoclonais contra VSP foram gerados usando os trofozoítos inteiros como previamente relatado (Mowatt, M.R.L., H.D.; Cotten, D.B.; Bowers, B.; Yee, J.; Nash, T.E.; Stibbs, H.H., Mol. Microbiol. 15, 955-63 (1995)).

[0093] Metilação de DNA: a partir do clone 1267 de G. lamblia foi purificado por extração com fenol e clorofórmio/álcool isoamílico (24/1% v/v), incubado com ARNase (Roche) para eliminar a contaminação ARN, e precipitado com etanol. A presença de metil desoxiribonucleosídeos foi determinada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (45, 46). A separação dos desoxiribonucleosídeos foi realizada numa Phenomenex Luna 5 µm C18, 4,6 x 150 mm. O método foi calibrado com base na absorção de desoxiribonucleosídeos de concentração conhecida.

Exemplo 3 Preparação de diferentes vacinas e ensaios de proteção

[0094] 1. Parasitas: *Giardia lamblia* cepa WC (ATCC 30957) foi isolada a partir de um paciente sintomático que acreditava ter adquirido giardíase no Afeganistão ("Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon"., Smith PD, Gillin FD, Kaushal NA and Nash TE, Infect. Immun. 1982 May; 36(2): 714-9), e a cepa GS/M foi isolada a partir de um paciente sintomático dos EUA ("Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon"., Smith PD, Gillin FD, Kaushal NA and Nash TE, Infect. Immun. 1982 May; 36(2): 714-9), clones derivados da cepa WB, e os trofozoítos transgênicos foram cultivados a 37°C em meio TYI-S-33 suplementado com 20% de soro adulto (Invitrogen), bile bovina (Sigma) e uma solução de antibiótico/antimicótico (Invitrogen) em tubo de vidro de borosilicato de 12 mL com tampa rosqueada ("Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clark CG, Diamond LS, Clin Microbiol Rev. 2002 Jul; 15(3):329-41). Os clones de *Giardia* expressando diferentes proteínas de superfície foram obtidos limitando-se a diluição em placas de cultura de 96 cavidades (DeltaLabs) numa câmara anaeróbia (BD) e escolhidos por ensaios de imunofluorescência usando anticorpos monoclonais específicos ("A new method for cloning *Giardia lamblia*, with a discussion of the statistical considerations of limiting dilution". Baum KF, Berens RL, Jones RH, Marr JJ, J Parasitol. 1988 Apr; 74(2): 267-9). Os clones reativos foram amplificados de um dia para o outro em meio de cultura e a homogeneidade foi verificada antes do uso. Os clones WB 1267 (Mab 5C1), 9B10 (Mab 9B10), A6 (Mab 6E7) e GS/M/H7 (Mab G10/4) foram usados em experimentos de controle e em infecções (Nash, T., Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. Parasitol Today 8, 229-234 (1992)).

[0095] Geração de trofozoítos transgênicos expressando o repertório completo de VSPs: As seqüências complementares aos genes codificadores de enzimas RdRP e Dicer de *Giardia* foram clonados em um plasmídeo pTubHA.pac ("Sorting of encystation-specific cysteine protease to lysosome-like peripheral vacuoles in *Giardia lamblia* requires a conserved tyrosine-based motif", Touz MC, Lujan HD, Hayes SF, Nash TE. J Biol Chem. 2003 Feb 21; 278(8): 6420-6. Epub 2002 Dec 3). Isto permitiu a expressão gênica constitutiva e estável em trofozoítos de *G. lamblia* devido à presença do promotor α -

tubulina e seleção com o antibiótico puromicina. Os genes codificadores das enzimas Dicer e RdRP foram amplificados por PCR a partir do clone cDNA WB/9B10 usando Platinum HiFi Taq DNA polimerase (Invitrogen), usando sondas oligonucleotídeo contendo sítios de restrição NcoI e EcoRV e então clonando o vetor. Os iniciadores foram DAF: 5'-AGT TGA AAC TAT CAT GGT TGC TCC CGA A-3' SEQ ID N° 141, DAR: 5'-CCA CCA TGG TTG AAC GCC GAA TCC AAC-3' SEQ ID N° 142, RAF: 5'-GCG ATA GGT TGC AGT TCC ATG ACG TTC TTG A-3' SEQ ID N° 143, e RAR: 5'-CCA CCA TGG TCG CTA CCT TAG CAT CAT CC-3' SEQ ID N° 144. As construções foram verificadas por digestão com enzimas de restrição e depois seqüenciadas. A verificação do silenciamento das enzimas foi executada por qRT-PCR como descrito acima.

[0096] Transfecção de *Giardia lamblia*: a transfecção de *Giardia* foi realizada por eletroporação, essencialmente como relatado ("Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*". Yee J, Nash TE. Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Jun 6; 92(12): 5615-9). Brevemente, culturas de trofozoíto clone WB/9B10 crescendo até confluência em tubos de 12 mL (cerca de 10^7 células) foram re-suspensos em 0,3 mL de meio completo TYI-S-33, em placas de 0,4 cm. Então, de 10 a 15 µg de plasmídeo foram adicionados até um volume final de 100 µL. A mistura foi incubada por 10 minutos em gelo. As células foram eletroporadas a 350 V, 1000 µF e 700 Ω em um eletroporador BTX. Após a incubação em gelo por 10 minutos, as células foram transferidas para um tubo contendo 12 mL de um meio completo e incubadas de um dia para o outro a 37°C em anaerobiose. No dia seguinte, o meio foi complementado com puromicina e os trofozoítos foram incubados por de 7 a 10 dias a 37°C. Para obter linhagens celulares clonadas, foi realizada a limitação da diluição em placas de 96 cavidades.

[0097] Imunofluorescência e microscopia confocal: Os trofozoítos foram destacados dos tubos por resfriamento por 20 minutos em gelo. As células foram recuperadas e re-suspensas em meio de crescimento, aplicadas às lâminas de vidro e incubadas a 37°C em câmara úmida por 1 hora para permitir aos trofozoítos re-aderirem. As preparações foram lavadas com meio morno três vezes, mais duas lavagens em PBS morno. Então, as células foram tornadas permeáveis pela fixação com 1:1 acetona/metanol por 30 minutos a -20°C e bloqueadas em 1x PBS/0,05% Tween 20, BSA 2,5% por 30 min. As células foram

primeiramente incubadas com Mab contra diferentes VSPs diluída em 1x PBS/0,05% Tween 20, BAS 2,5% por 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos monoclonais alvejados contra diferentes VSPs foram: mAb 9B10 (anti VSP-9B10B), mAb 5C1 (anti-VSP 1267), mAb 6E7 (anti-VSP A6), mAb 1B2 (anti-VSP S1), mAb 2D5 (anti-VSP S2), mAb 2E1 (anti-VSP S3), mAb 2G10 (anti-VSP S4), mAb 6F8 (anti-VSP S5), mAb 7A9 (anti-VSP S6), mAb 7B8 (anti-VSP S7), mAb 7C2 (anti-VSP S8), mAb 7C9 (anti-VSP S9), mAb 7C10 (anti-VSP S10), mAb 7D4 (anti-VSP S11), mAb 2D4 (anti-VSP S12), mAb 3B8 (anti-VSP S13), mAb 4A2 (anti-VSP S14), mAb 7F4 (anti-VSP S15), Mab 7H2 (anti-VSP S16). Após a incubação com o anticorpo monoclonal adequado, as lâminas foram lavadas duas vezes com 1x PBS/0,05% Tween 20, e então incubados com um segundo anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo de carneiro rotulado com FITC ou TRITC numa diluição de 1/200 por 1 hora em solução bloqueante. Os núcleos foram contrastados com DAPI. As imagens confocais foram obtidas por um microscópio confocal a laser LSM5 Zeiss Pascal equipado com um laser de argônio/hélio/neônio, e uma objetiva de imersão em óleo X100 (abertura numérica = 1,4) (Zeiss Plan Achromat). Foram tiradas seções confocais de 0,3 µm paralelas à lamínula (seções z). As imagens foram obtidas usando uma câmera Zeiss pelo dispositivo e processadas com LSM e software Adobe Photoshop. A percentagem de células expressando uma VSP particular foi computada contando 500 células em experimentos triplicados ou por citometria de fluxo.

[0098] Produção de anticorpos monoclonais contra cauda 5-aminoácido de VSPs: a produção de anticorpos monoclonais para a cauda 5-aminoácido de VSPs foi executada como descrito acima no exemplo 2.

[0099] 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise Western blot: Os extratos de proteínas de trofozoíto foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e análise Western Blot como relatado (Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., Bowers, B. & Nash, T.E., "Identification of a novel Giardia lamblia cyst wall protein with lucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall" J. Biol. Chem. 270, 29307-29313 (1995)).

[00100] Animais: todos os procedimentos executados em animais foram realizados de acordo com protocolos aprovados pelo Institution Commission of Care and Use of Animals

da Universidade Católica de Córdoba e a diretriz de imunização foi bem tolerada por todos os animais. Ratos do deserto machos endogenamente criados, espécimes livres de patógenos (SPF) de seis semanas de vida (*Meriones unguiculatus*) foram obtidos do biotério de animais de investigação da Universidade Católica de Córdoba e individualmente alojados num gradil com ar condicionado (18-22°C, 40-50% de umidade) (Techniplast) com ciclo de 12 horas de luz, 12 horas de escuridão. Eles receberam comida de autoclave e água esterilizada suplementada com uma mistura de solução de vitaminas esterilizada em filtro *ad libitum*. Neste estudo, foram usados somente animais nascidos nessas premissas, a fim de assegurar que eles nunca foram infectados com o parasita *Giardia* ou qualquer outro relacionado. Todos os animais foram mantidos sob condições SPF de laboratório de acordo com as regras do Conselho Argentino de Cuidado Animal e regras internacionais de cuidados com animais. Antes da infecção, os ratos foram testados para negatividade de anticorpos no soro contra *Giardia lamblia* ou proteínas de *Giardia* por ELISA usando uma preparação de proteínas totais extraídas de trofozoítos e cistos. Após as infecções, alguns grupos de controle de ratos foram tratados oralmente com 20 mg de metronidazol por 3 dias, 10 dias antes dos desafios para excluir qualquer presença possível de baixo nível de *Giardia* intestinal.

[00101] Eliminação de parasitas protozoários por tratamento com metronidazol: Para iniciar o tratamento, os animais foram colocados em gaiolas esterilizadas com ar filtrado; a água e comida foram esterilizadas em autoclave. Uma solução de trabalho de 100 mg/mL de metronidazol foi preparada 500 µL desta solução foram dados oralmente aos animais em uma dose diária por 3 dias consecutivos. Os animais não receberam antibióticos nos quatro dias seguintes. O tratamento continuou por dois dias com 500 µL de solução de trabalho de metronidazol. O tratamento foi complementado pela adição de 2 mL de metronidazol em 400 mL de água de beber passada em autoclave, que foi a única água que os animais poderiam beber durante todo o tratamento (os animais ingerem esta solução diluída de metronidazol por nove dias). As fezes foram coletadas diariamente durante todo o tratamento e foi feito controle microscópico por imunofluorescência com anticorpo monoclonal 7D2 (anti-proteína da parede do cisto 2 - "Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with lucine-rich repeats. Implications for secretory granule

formation and protein assembly into the cyst wall", Lujan HD, Mowatt MR, Conrad JT, Bowers B, Nash TE. J Biol Chem 1995 Dec 8; 270 (49): 29307-13) todo dia a fim de determinar a presença de cistos. Durante o tratamento, a flora animal normal sofreu aumento de leveduras, e recuperou seu estado normal poucos dias após o fim do tratamento.

[00102] 3. Infecções: as infecções foram induzidas em ratos do deserto pela inoculação orogástrica de 2×10^5 trofozoítos ou cistos re-suspensos em 0,5 mL de tampão salino de fosfato (PBS). Alguns animais de controle receberam 0,5 mL de PBS pela mesma rota. Os cistos frescos coletados de ratos infectados foram usados a fim de evitar a perda rápida de viabilidade e infectividade produzida nas amostras obtidas dos pacientes infectados. A coleta fecal dos ratos infectados foi realizada diariamente do dia 0 ao dia 30. Os cistos ou trofozoítos foram identificados visualmente por microscopia ou por ensaios de imunofluorescência usando antígenos específicos a cisto (mAb 7D2) ou trofozoíto (BIP; Mab 9C9).

[00103] 4. Periodicamente, ratos escolhidos ao acaso foram sacrificados, os intestinos delgados foram isolados, abertos longitudinalmente e suspensos em meio de cultura a 4°C por 30 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e examinados para trofozoítos de Giardia por microscopia luminosa e fluorescente ou postos em meio de cultura por até seis dias como relatado (Gottstein, B., Deplazes, P. & Tanner, I., "In vitro synthesized immunoglobulin A from nu/+ and reconstituted nu/nu mice against a dominant surface antigen of Giardia lamblia". Parasitol Res 79, 644-648 (1993)).

[00104] Os cistos de Giardia excretados pelos ratos foram quantificados pela coleta de péletes da base a partir de animais individualmente alojados por um período de 24 h. As amostras da base foram pesadas, re-suspensas em 2 mL de PBS, e filtrados através de 3 camadas de gaze. O filtrado foi centrifugado a 250 g durante 10 min. numa centrífuga refrigerada (Beckman). O filtrado foi centrifugado a 250 g por 10 min numa centrífuga refrigerada (Beckman) a 4°C. Após 3 lavagens, o pélete foi suspenso em 2 mL de PBS; os cistos manchados com 7D2 mAb rotulado com FITC, e contados num hemacitômetro. Os ratos foram considerados não infectados se nenhum cisto foi encontrado nas fezes ou se nenhum trofozoíto foi detectado após 6 dias de cultura.

[00105] Purificação de VSPs a partir de trofozoítos transgênicos Dicer-AS e RdRP-AS: O repertório completo de VSPs expressadas nestes trofozoítos transgênicos gerados como descrito foram purificados por imunoafinidade usando Mab 12F1 do presente invento gerado contra os 5-aminoácidos da cauda conservada VSP. Foi usada a proteína A-Sepharose (Amersham) para isolar as imunoglobulinas dos ratos do fluido ascítico produzido pela injeção intra-peritoneal de uma cultura de células de hibridoma. O mAb purificado foi ligado a contas magnéticas (Dynal) e utilizado para purificar VSPs a partir de frações contendo membranas microssomais de trofozoítos do plasma. As VSPs purificadas foram re-suspensas em PBS contendo 0,01% de Tween 20, quantificadas e usadas para imunizar oralmente os ratos de deserto. As VSPs individuais foram purificadas pela mesma metodologia usando mAbs específicos.

[00106] Purificação de GRP78/BiP Giardia: Os trofozoítos *G. lamblia* isolados do clone 9B10 WB foram transfectados com o plasmídeo pTubHA.pac contendo o comprimento completo do acompanhante retículo endoplasmático de Giardia BiP/GRP78 ("Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during differentiation of a primitive eukaryote". Lujan HD, Mowatt MR, Conrad JT, Nash TE. Biol Cell. 1996; 86 (1): 11-8) e três cópias deste epítipo foram rotuladas com hemaglutinina (HA-BIP). Os trofozoítos transgênicos foram lisados com tampão RIPA e a proteína BIP isolada usando kit de imunopurificação anti-HA (Sigma).

[00107] Imunização oral: Os animais foram imunizados com três administrações orais sucessivas de 200 µg de proteínas de parasita suspensas em PBS/0,01% Tween 20 estéril, com três dias de diferença entre cada administração. A mesma quantidade de proteínas foi administrada aos ratos do deserto quando BIP, preparados de membrana ou VSPs purificadas foram usados como imunógenos.

[00108] Amostras de sangue: as amostras de sangue foram coletadas após o primeiro dia de infecção ou imunização para detectar a presença de anticorpos circulantes como descrito abaixo. Os ratos do deserto foram anestesiados com éter e o sangue foi obtido do plexo orbital ou por punção intracardíaca. O soro foi coletado pela centrifugação da amostra de sangue a 800 g por 15 min e armazenado a -70°C até o uso. Os ratos foram sacrificados com dióxido de carbono gasoso.

[00109] 5. Conteúdos intestinais: secreções do intestino delgado de ratos infectados, não infectados e imunizados foram coletadas como em camundongos (Heyworth, M.F., "Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes". J Parasitol 78, 73-76 (1992)).

[00110] Em resumo, os ratos jejuaram por um dia com acesso a água e foram então sacrificados. O intestino delgado foi excisado do duodeno ao ceco e seu conteúdo foi aspirado com uma seringa e separado. Em alguns casos, o conteúdo intestinal foi centrifugado a 5000 g a 4°C para separar células, restos e bactérias. Em alguns experimentos, o lúmen do intestino delgado foi lavado cinco vezes com 3 mL de PBS frio e centrifugado como descrito acima. Os sobrenadantes foram esterilizados por filtração e armazenados a -70°C até o uso.

[00111] Ensaio de aglutinação: os ensaios foram realizados em placas de fundo plano de 96 cavidades. Cerca de 5×10^5 trofozoítos foram incubados a 4°C por 1 h com várias diluições de secreções de intestino animal, soro ou fluido ascético contendo anticorpos específicos contra VSPs (todos inativados por calor) em meio TYI-S-33 sem soro adulto bovino. Eles foram misturados e a aglutinação de trofozoítos foi ensaiada por microscopia. A ligação dos anticorpos à superfície do parasita foi demonstrada com anti-imunoglobulinas de camundongo rotuladas com TRITC de cabra.

Reivindicações

1. Protozoário parasita Giardia modificado **caracterizado** por o gene Dicer, o gene de RNA polimerase dependente do RNA (RdRP) ou ambos terem sido silenciados por engenharia genética utilizando RNA anti-senso, por expressão constitutiva de RNA anti-senso dos ditos genes, assim compreendendo a expressão simultânea na sua superfície de mais de uma proteína de superfície variável.

2. Protozoário, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender a expressão reduzida de enzimas escolhidas dentre o grupo que compreende Dicer, RNA-polimerase dependente de RNA (RdRP) ou ambas.

3. Vacina contra infecções produzidas por protozoários, **caracterizada** pelo fato de compreender pelo menos um protozoário modificado conforme descrito na reivindicação 1, e excipientes e/ou coadjuvantes.

4. Vacina, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato do protozoário apresentar a expressão reduzida de enzimas escolhidas dentre o grupo que compreende Dicer, RNA-polimerase dependente de RNA (RdRP) ou ambas.

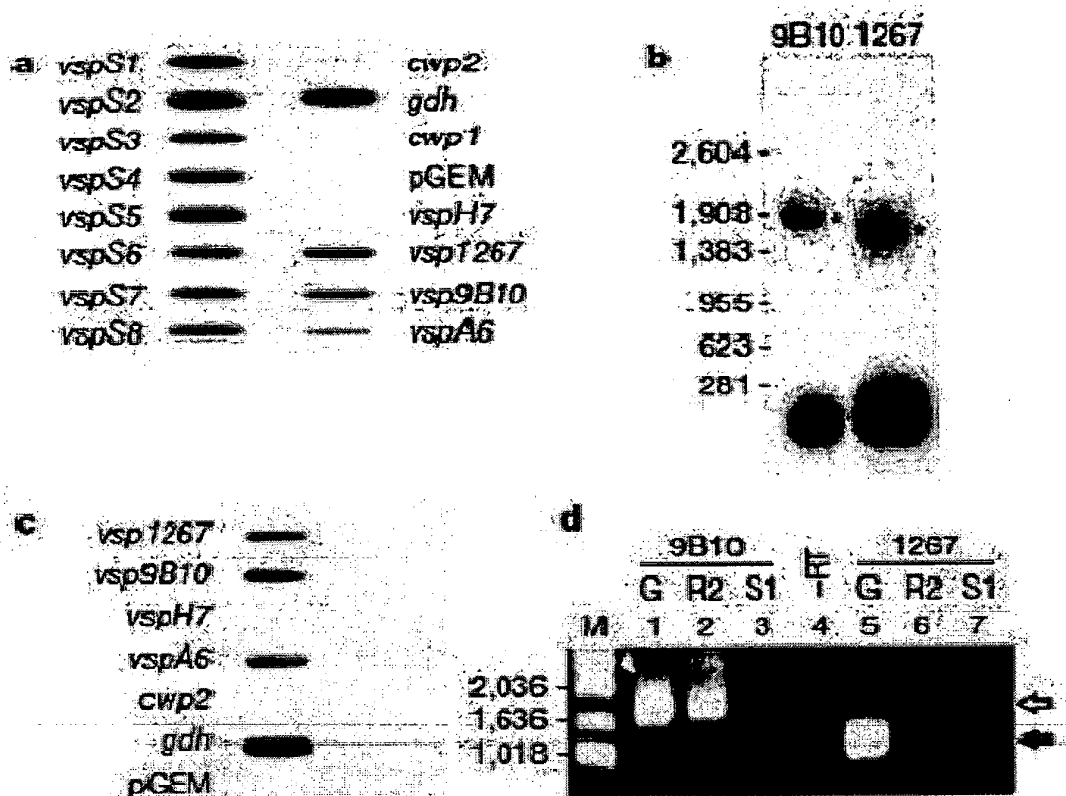


Fig. 1

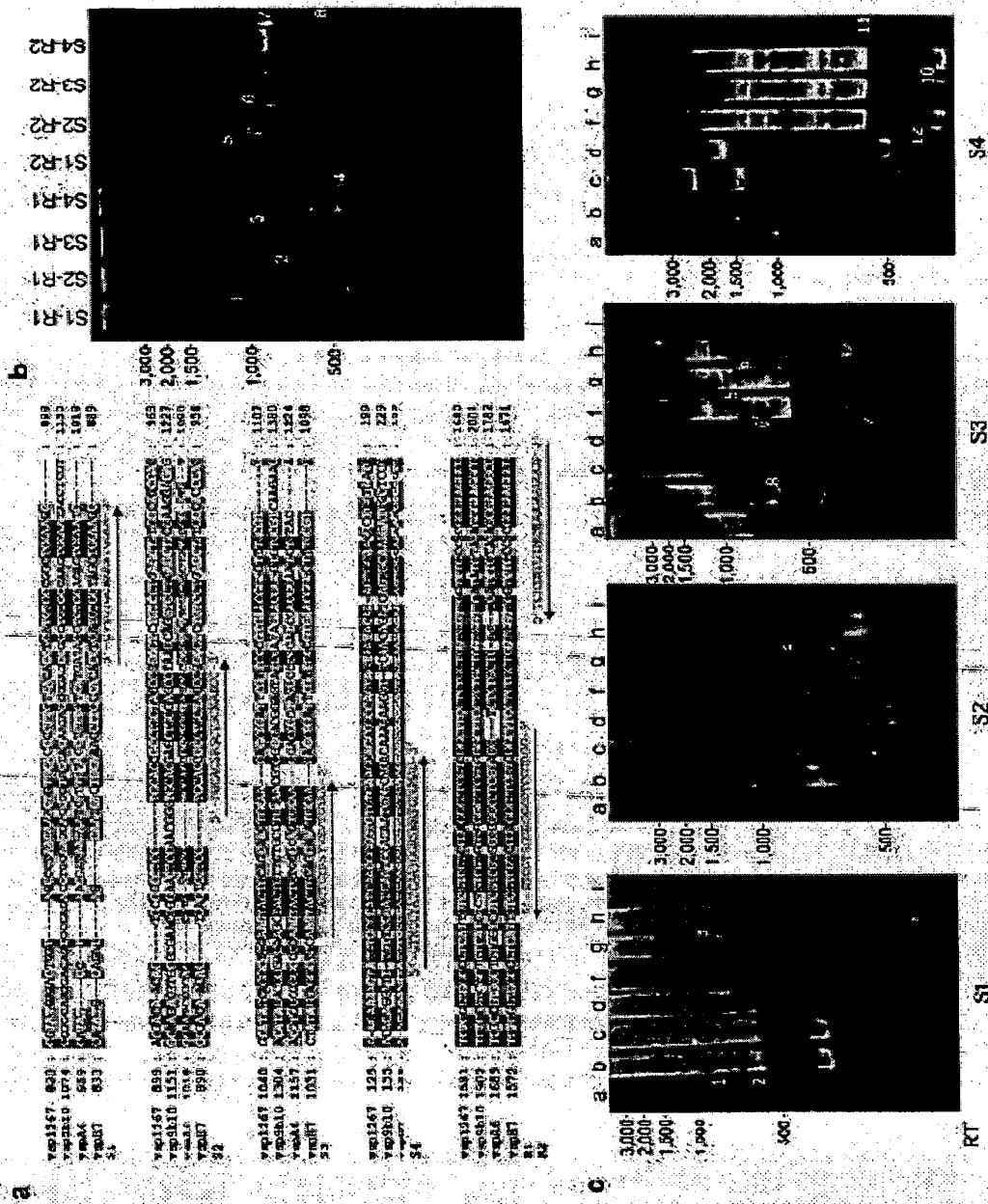


Fig. 2

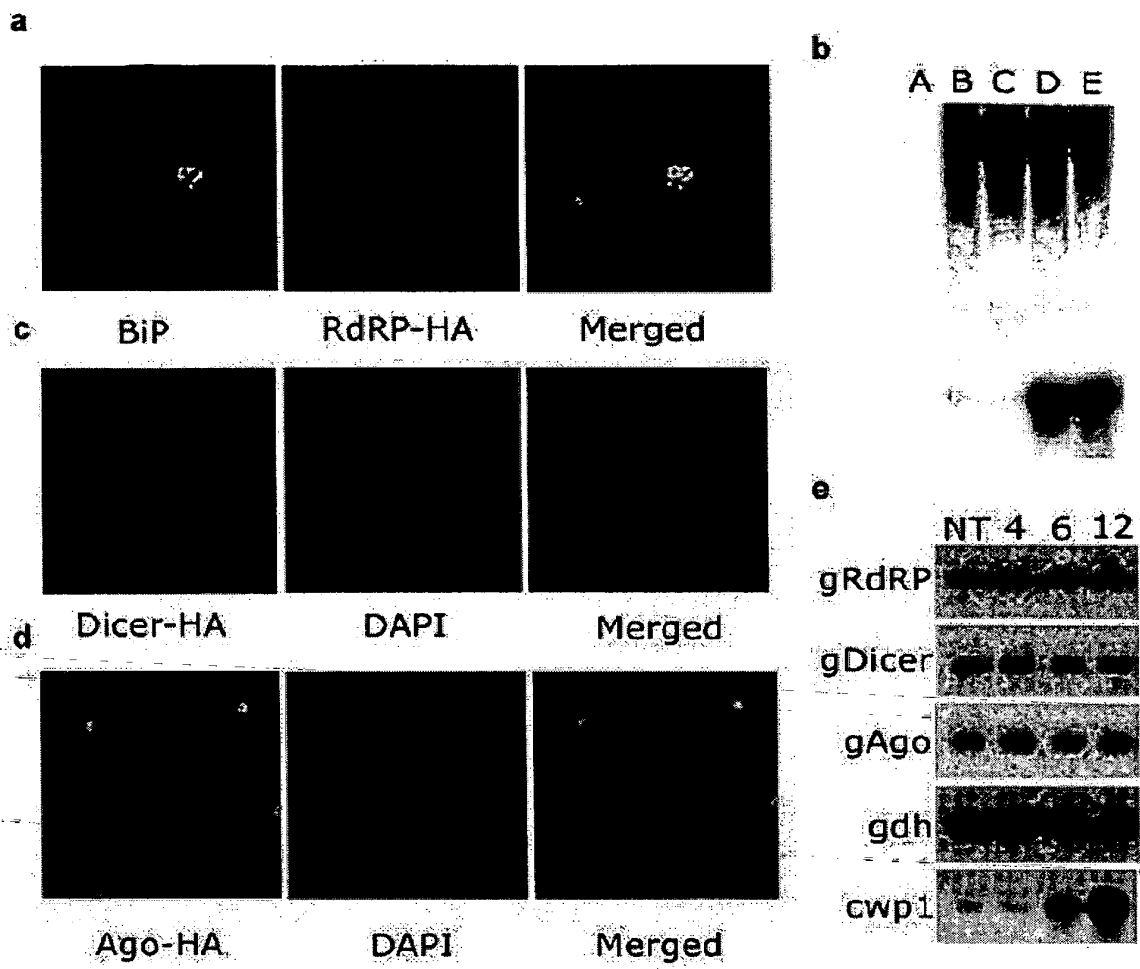


Fig. 3

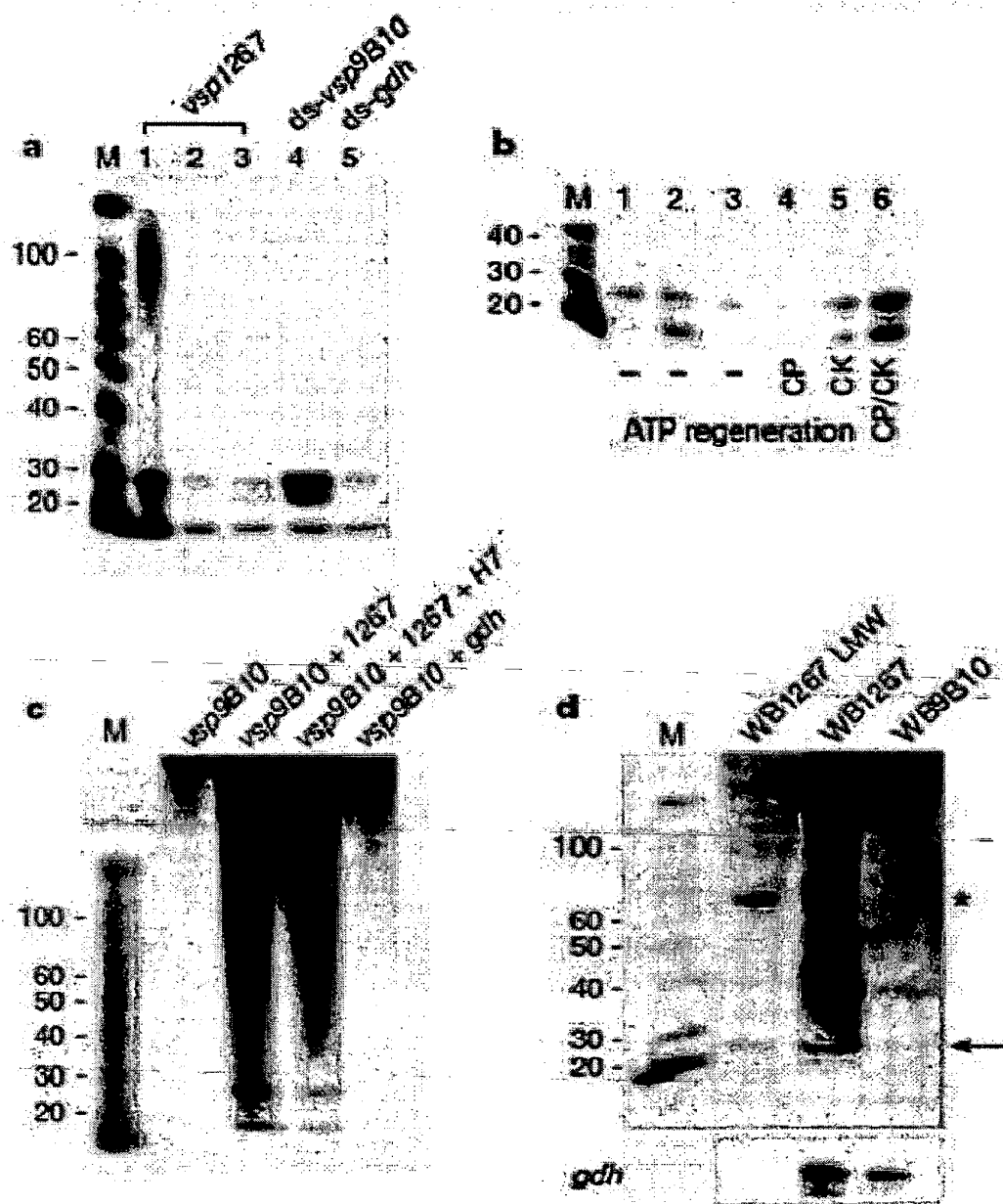


Fig. 4

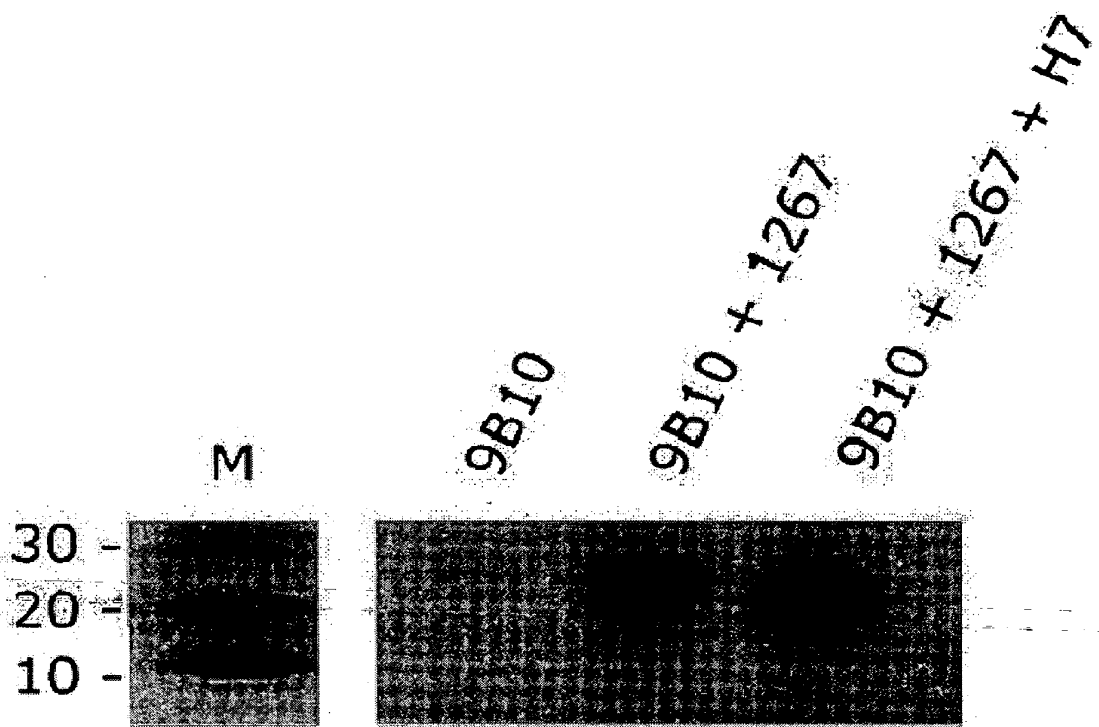
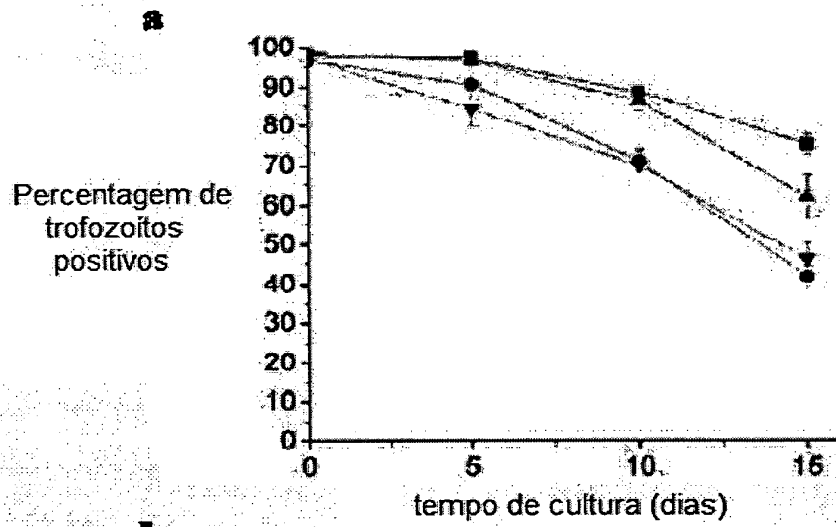
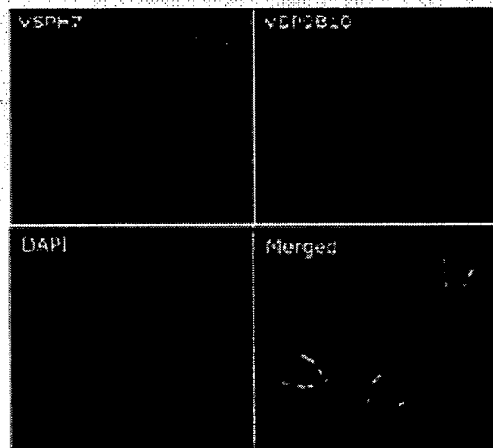
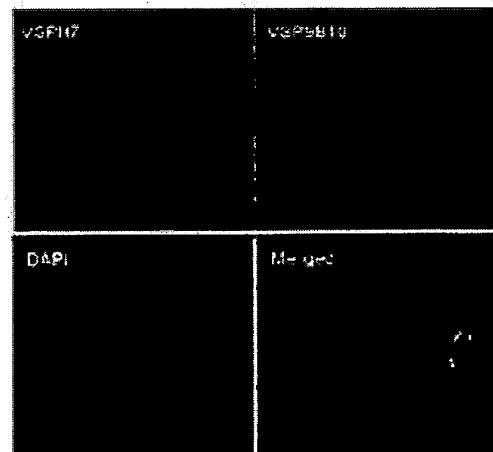
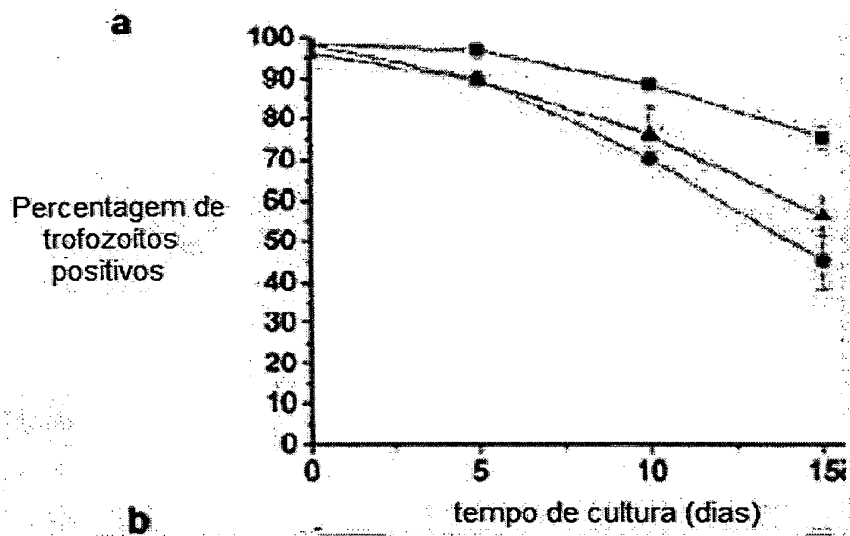


Fig. 5

**b****c****Fig. 6**



b



c

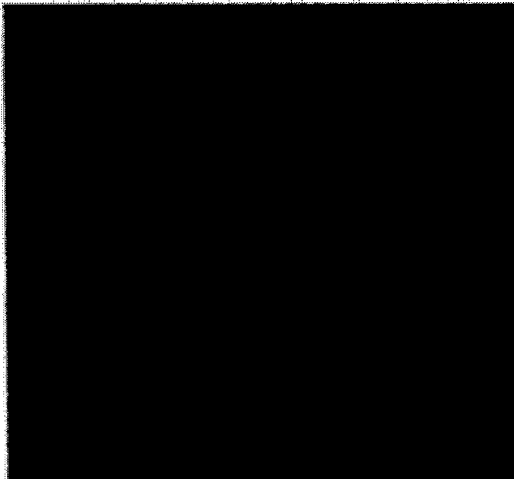


Fig. 7

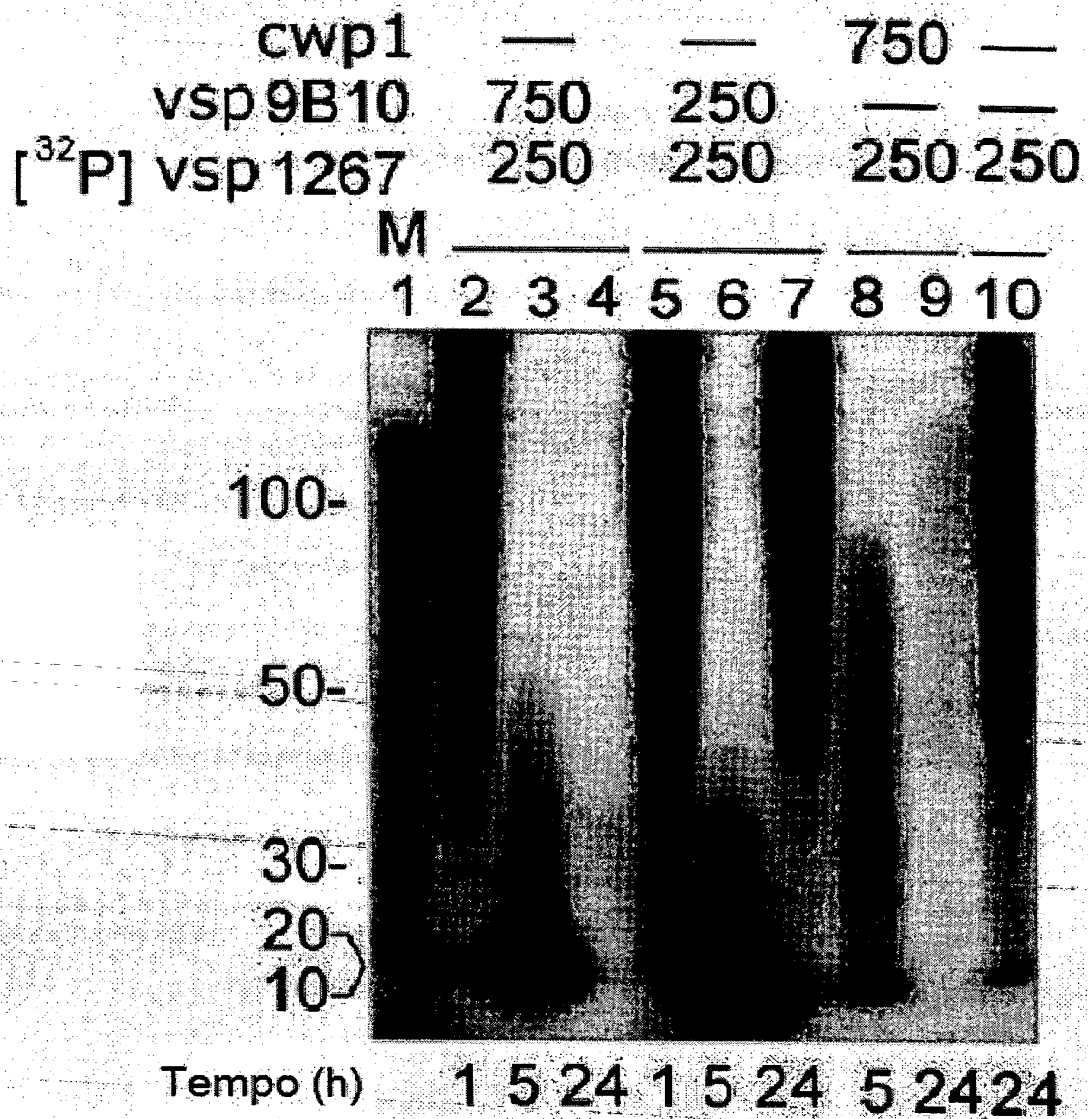


Fig. 8

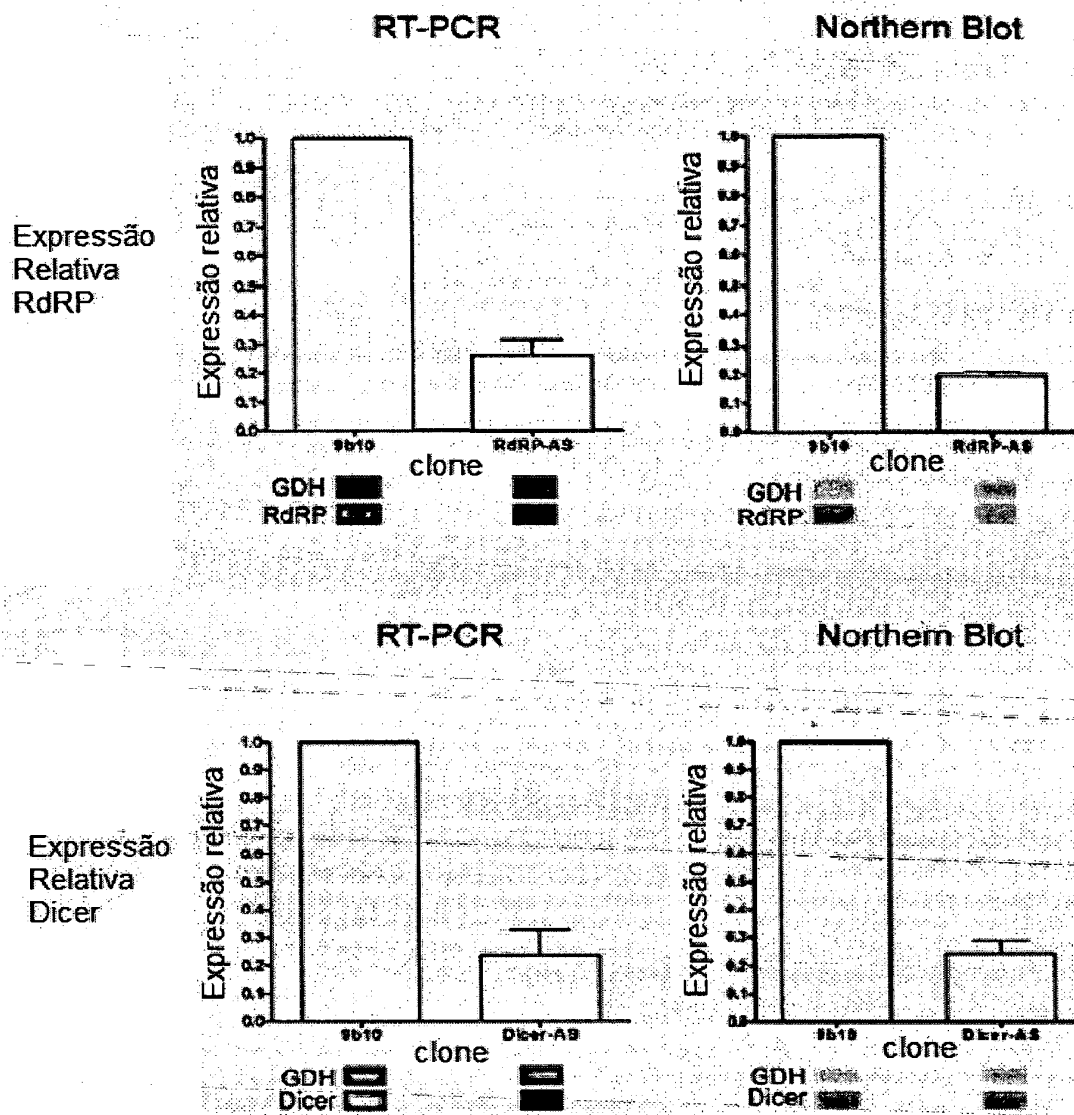


Fig. 9

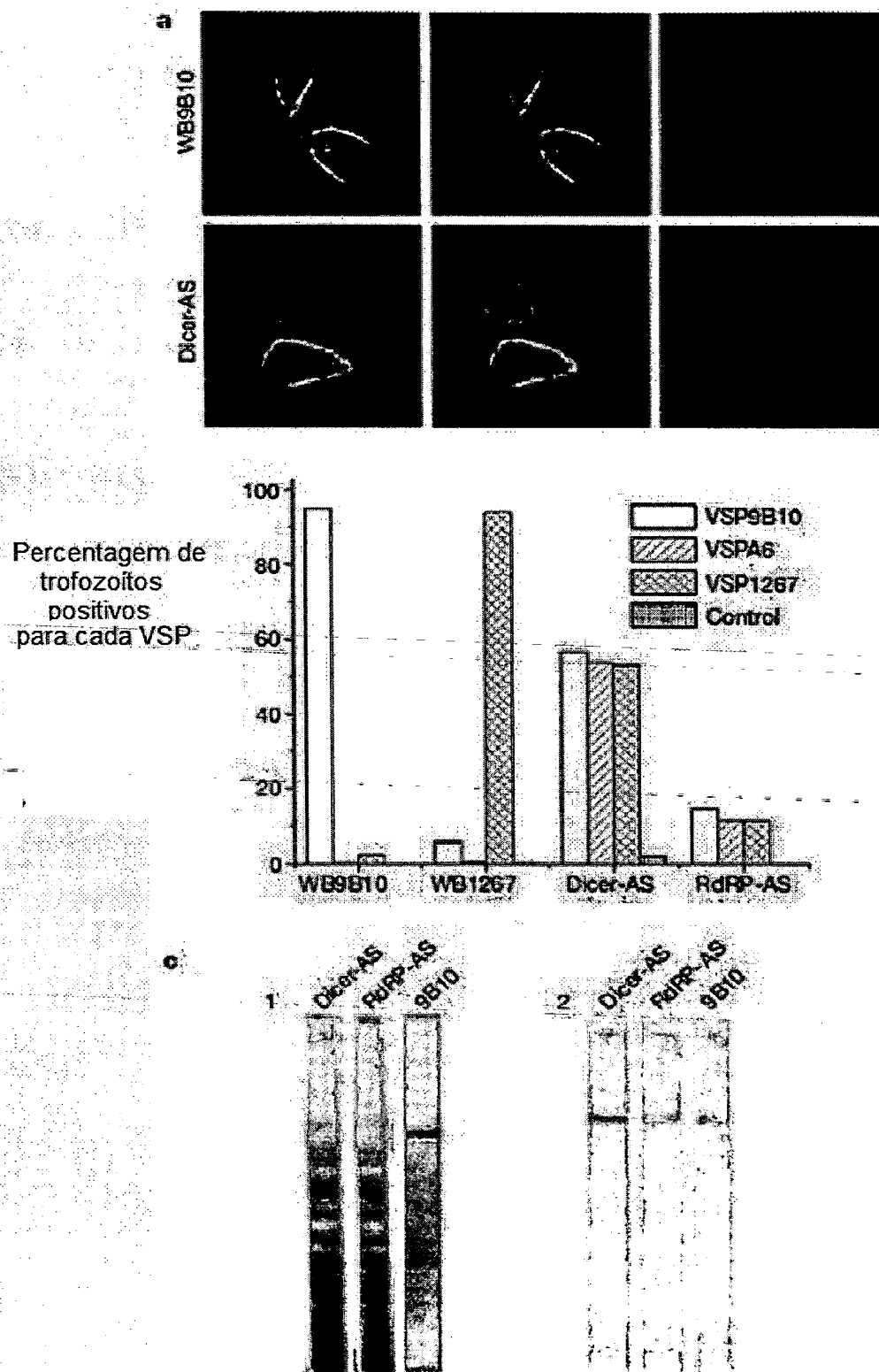


Fig. 10

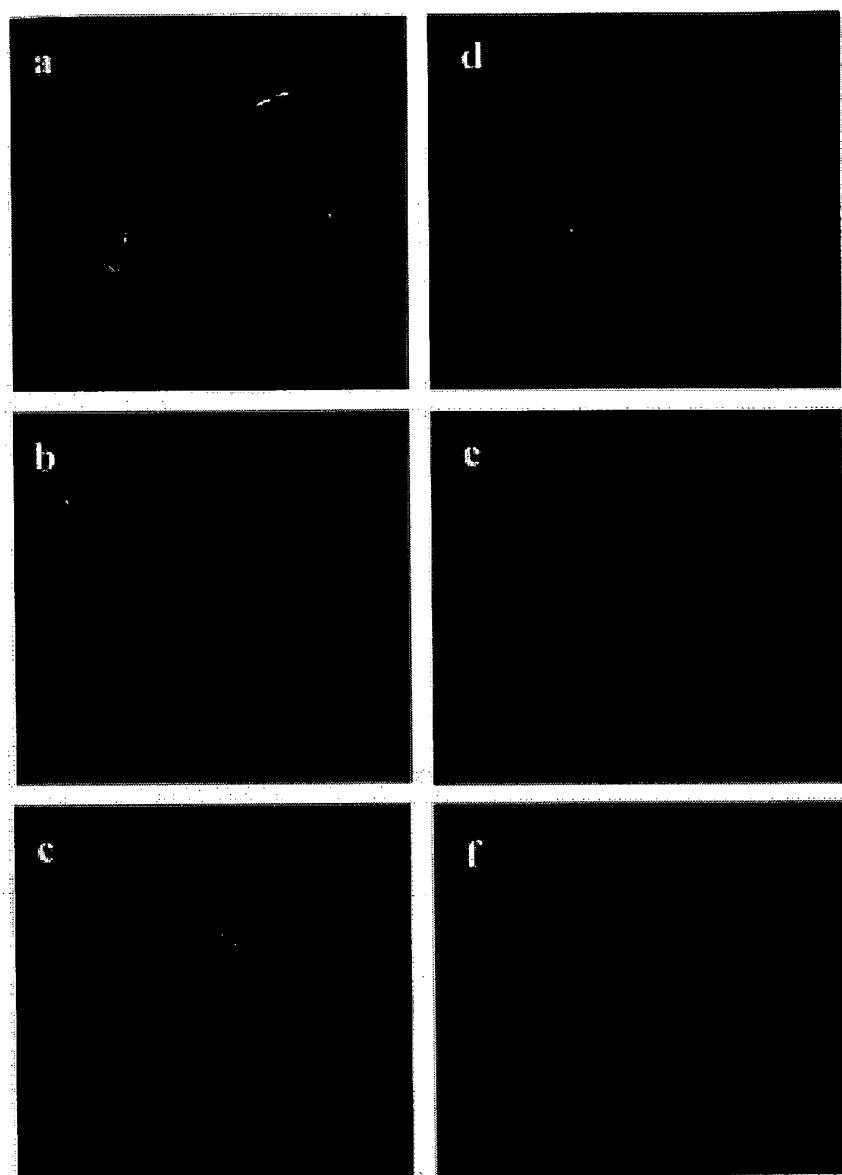


Fig. 11

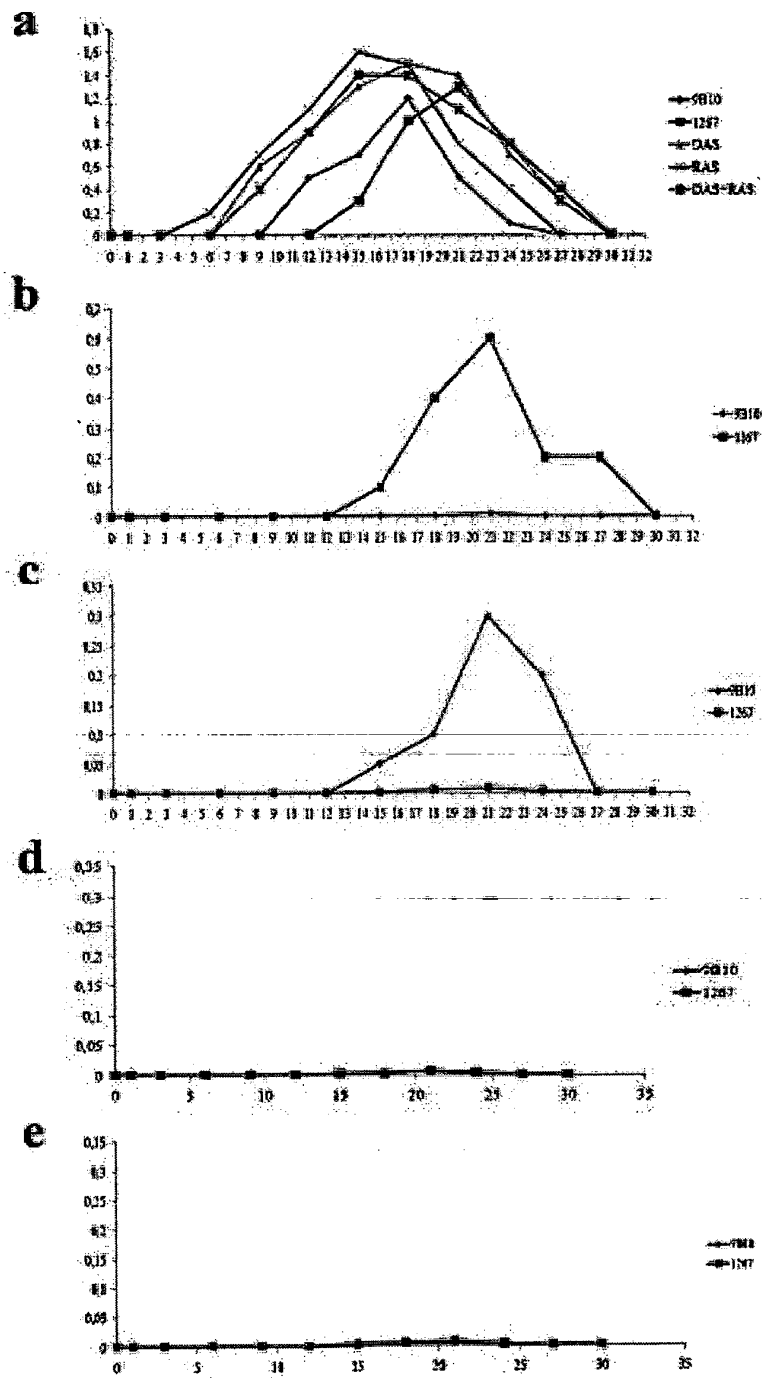


Fig. 12

	Infecção Primária	Reinfecção com WB9B10	Reinfecção com WB1267	Reinfecção com cistos
9B10	a	e	i	m
1267	b	f	j	n
DAS	c	g	k	o
RAS	d	h	l	p

Fig. 13

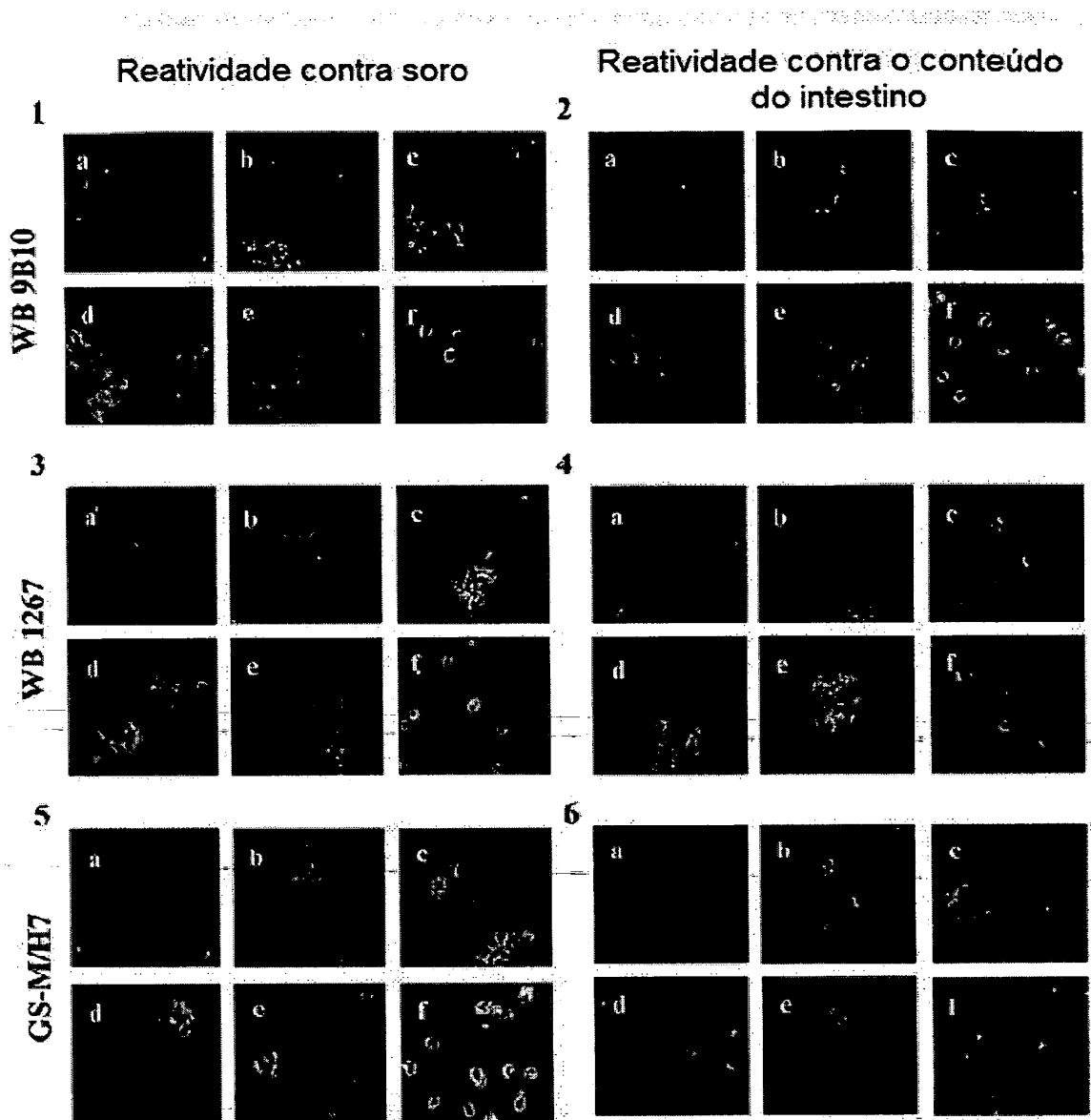


Fig. 14

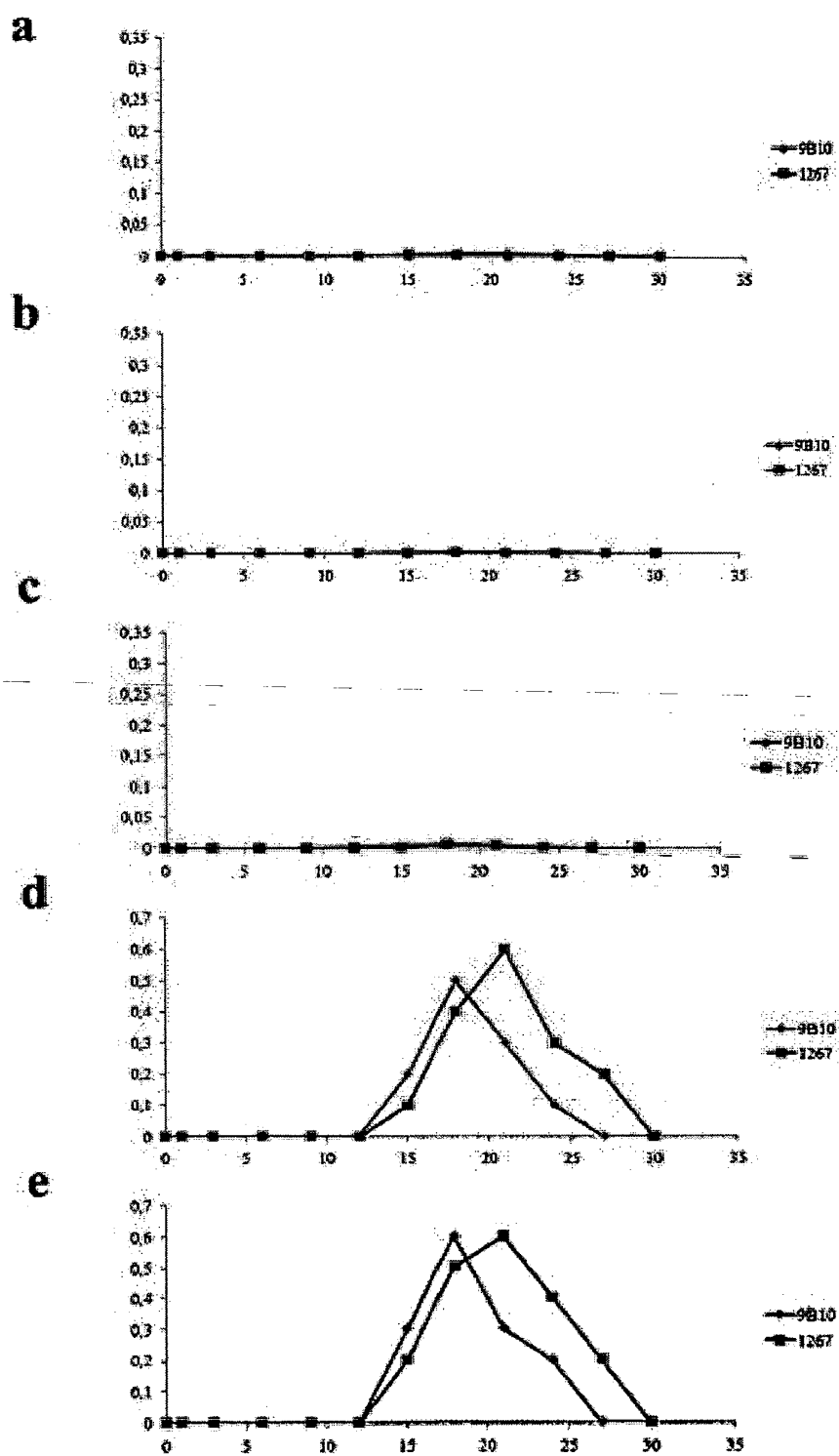


Fig. 15

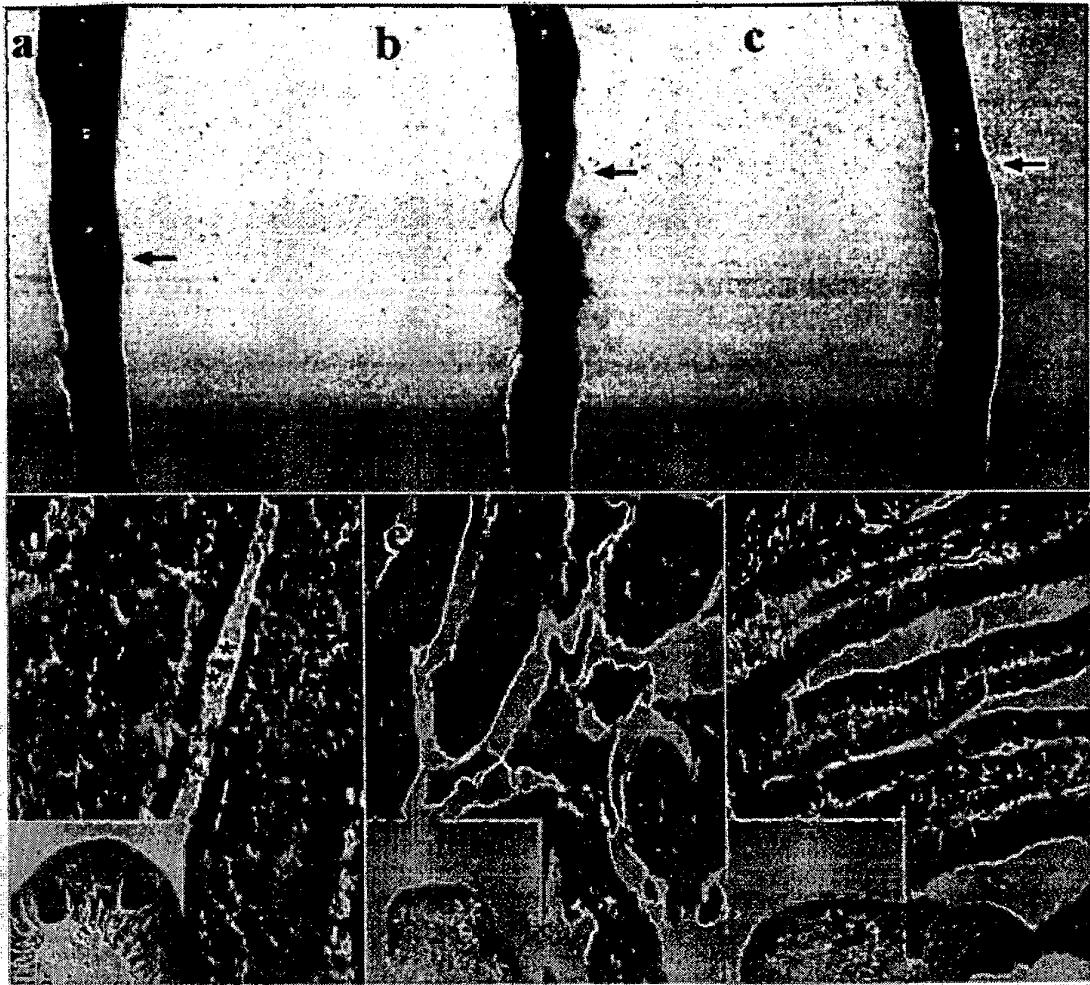


Fig. 16