



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

(21) **PI 1003750-0 A2**



(22) Data de Depósito: 22/07/2010
(43) Data da Publicação: 10/04/2012
(RPI 2153)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 1/21
C12N 15/63
C07K 14/195
A61K 39/02
C07K 16/12
G01N 33/535
C12R 1/42
A61P 31/04

(54) Título: MICRORGANISMOS RECOMBINANTES, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE LINHAGENS VACINAIS, ANTÍGENOS, COMPOSIÇÕES VACINAIS VETORIZADAS, SEUS USOS, ANTICORPOS, KIT DE DIAGNÓSTICO E MÉTODOS DE TRATAMENTO E/OU PROFILAXIA

(73) Titular(es): INVENT BIOTECNOLOGIA LTDA,
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

(72) Inventor(es): ALINE FERREIRA DE OLIVEIRA PEREIRA,
ANA CAROLINA RUSCA CORRÊA PORTO, EBERT SEIXAS HANNA,
HELDER HENRIQUE PAIVA, LUCIANA COLBACHINI FERRAZ,
LUCIANA PEREIRA RUAS, LUIZ EDUARDO DOS SANTOS FERRAZ,
MARIA CRISTINA ROQUE ANTUNES BARREIRA, SANDRO GOMES
SOARES, SILVIA ALMEIDA CARDOSO

(57) Resumo: MICRORGANISMOS RECOMBINANTES, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE LINHAGENS VACINAIS, ANTÍGENOS, COMPOSIÇÕES VACINAIS VETORIZADAS, SEUS USOS, ANTICORPOS, KIT DE DIAGNÓSTICO E MÉTODOS DE TRATAMENTO E/OU PROFILAXIA. A presente invenção provê microrganismos vivos recombinantes, tais como, organismos procariotos, em particular, enterobactérias, preferencialmente, *Salmonella enterica*, contendo as SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2, capazes de expressar lipoproteínas VapG e/ou VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4), opcionalmente, associadas a outros ativos, métodos de preparação de linhagens vacinais, antígenos (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) e composições vacinais, preferencialmente, vacinas vetorizadas. Adicionalmente, o presente pedido de patente destina-se ao uso dos vetores vacinais no preparo de composições farmacêuticas, em particular, vacinas indicadas para a prevenção e/ou tratamento de infecções por *Rhodococcus equi*, seus anticorpos e/ou anti-soros, kits de diagnósticos e métodos de profilaxia e/ou tratamento de infecções de infecções por *R. equi*.

“MICRORGANISMOS RECOMBINANTES, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE LINHAGENS VACINAIS, ANTÍGENOS, COMPOSIÇÕES VACINAIS VETORIZADAS, SEUS USOS, ANTICORPOS, KIT DE DIAGNÓSTICO E MÉTODOS DE TRATAMENTO E/OU PROFILAXIA”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê microrganismos vivos recombinantes, tais como, organismos procariotos, em particular, enterobactérias, preferencialmente, *Salmonella enterica*, contendo as SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2, capazes de expressar lipoproteínas VapG e/ou VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4), opcionalmente, associadas a outros ativos, métodos de preparação de linhagens vacinais, antígenos (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) e composições vacinais, preferencialmente, vacinas vetorizadas. Adicionalmente, o presente pedido de patente destina-se ao uso dos vetores vacinais no preparo de composições farmacêuticas, em particular, vacinas indicadas para a prevenção e/ou tratamento de infecções por *Rhodococcus equi*, seus anticorpos e/ou anti-soros, kits de diagnósticos e métodos de profilaxia e/ou tratamento de infecções de infecções por *R. equi*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O gênero *Rhodococcus* é composto por bactérias com morfologias variadas (pleomórficos), gram-positivos, não móveis, encontradas em ambientes diversos, como no solo, lençol subterrâneo, oceanos, microbiota do intestino de insetos e superfícies de plantas. Todas as espécies desse gênero são aeróbicas, não esporulam e compreendem um grupo de bactérias com características genéticas e fisiológicas diversificadas (MARTÍNKOVÁ, L., UHNÁKOVÁ, B., PÁTEK, M., NESVERA, J., KREN, V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International* 2009 Jan;35(1):162-77. Epub

2008 Sep 11). Espécies de *Rhodococcus* têm sido descritas com potencial uso em processos industriais e biotecnológicos devido à produção de uma série de enzimas de interesse comercial (BELL, K. S., PHILP, J. C., AW, D. W., CHRISTOFI, N. The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 1998 Aug;85(2):195-210). Um fato interessante é que linhagens de *Rhodococcus* podem ser utilizadas na degradação de compostos orgânicos como uma proposta de biorremediação, tanto ambiental como em indústrias (GAKHAR, L., MALIK, Z. A., ALLEN, C. C., LIPSCOMB, D. A., LARKIN, M. J., RAMASWAMY, S. Structure and increased thermostability of *Rhodococcus* sp. naphthalene 1,2-dioxygenase. *Journal of Bacteriology* 2005 Nov;187(21):7222-31; PETRUSMA, M., DIJKHUIZEN, L., VAN DER GEIZE, R. *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 3-ketosteroid 9alpha-hydroxylase, a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase with subtle steroid substrate specificity. *Applied Environmental Microbiology* 2009 Aug;75(16):5300-7. Epub 2009 Jun 26).

Algumas espécies, como *R. bronchialis* estão ocasionalmente relacionadas com patogenias em humanos, porém, a espécie mais importante como potencial patógeno é a *R. equi* (VON BARGEN, K., HAAS, A. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009 Sep;33(5):870-91. Epub 2009 Apr 23). *R. equi* são geralmente encontrados em solos secos, com dispersão através da poeira. Esse microorganismo é comumente associado a doenças em eqüinos, e é um dos principais agentes etiológicos de pneumonias em potros.

Dados recentes comprovaram que estes patógenos podem causar doenças em suínos, bovinos e caprinos (BARTON, M. D., HUGHES, K. L. Ecology of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol*. 1984 Feb;9(1):65-76; MAKRAI, L., KOBAYASHI, A., MATSUOKA, M., SASAKI,

Y., KAKUDA, T., DÉNES, B., HAJTÓS, I., RÉVÉSZ, I., JÁNOSI, K., FODOR, L., VARGA, J., TAKAI, S. Isolation and characterisation of *Rhodococcus equi* from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol.* 2008 Oct 15;131(3-4):318-23. Epub 2008 May 21), e são descritos por acometer humanos com quadros de imunodeficiências, como uma co-morbidade em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SANE, D. C, DURACK, D. T. Infection with *Rhodococcus equi* in AIDS. *N Engl J Med.* 1986 Jan 2;314(1):56-7). Em humanos, as infecções por *R. equi* são frequentemente associadas a doenças com sinais muito semelhantes à tuberculose pulmonar, e estão relacionadas, entretanto, com patologias extra-pulmonares diversas (TRIPODI, M. F., VIGO, D., DURANTE-MANGONI, E., LIFSCHITZ, A., COREY, G. R., STRYJEWSKI, M. E., UTILI, R., PRYLUKA, D. *Rhodococcus equi* endocarditis in immunocompetent hosts: report of the first two cases. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2009 Nov;34(5):496-7. Epub 2009 Jul 9). Esse patógeno foi pioneiramente isolado em 1923 de pulmões de potros com pneumonia piogranulomatosa, e foi classificado como *Corynebacterium equi* (MAGNUSSON, H. Spezifische Infektioese Pneumonie beim Fohlen. Ein neuer Eitererreger beim Pferde. *Archive Wissen Praktise Tierheilkd* 1923; 50:22-38), posteriormente denominado como *Rhodococcus equi* (GOODFELLOW, M., ALDERSON, G. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the "rhodochrous" complex. *Journal of General Microbiology.* 1977 May;100(1):99-122).

As principais características de virulência de *R. equi* estão associadas à produção extra-cromossomal de antígenos. Esses antígenos são produzidos a partir de plasmídeos, moléculas circulares constituídas de fita dupla de DNA, que tem capacidade de replicação independente do DNA cromossomal do microrganismo. De particular interesse nos

plasmídeos de *R. equi*, observa-se uma região denominada ilha de patogenicidade, que contem sequências gênicas para a expressão de proteínas associadas à virulência (vap, do inglês “*virulence-associated protein*”) (TAKAI, S., HINES, S. A., SEKIZAKI, T., NICHOLSON, V. M.,
5 ALPERIN, D. A, OSAKI, M., TAKAMATSU, D., NAKAMURA, M., SUZUKI, K., OGINO, N., KAKUDA, T., DAN, H., PRESCOTT, J. F. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infection and Immunity*. 2000 Dec;68(12):6840-7). Esses genes Vap foram classificados em vários subtipos, e estão distribuídos
10 nessa ilha de patogenicidade em um agrupamento tríplice, VapA, VapC e VapD; no duo VapE e VapF, ou de distribuição individual distinta, como observada para os restantes VapG e VapH. Estes plasmídeos podem estar presentes em múltiplas cópias em uma mesma célula bacteriana, e são frequentemente perdidos quando são cultivados repetidamente em
15 caldos de cultura a 38°C (TAKAI, S., KOIKE, K., OHBUSHI, S., IZUMI, C., TSUBAKI, S. Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991 Mar;29(3):439-43). Apesar de haver outros elementos associados à virulência, como cápsula polissacarídica e produção de enzimas
20 lipolíticas, os plasmídeos de *R. equi* são considerados essenciais para a patogenia (GIGUÈRE, S., HONDALUS, M. K., YAGER, J. A., DARRAH, P., MOSSER, D. M., PRESCOTT, J. F. Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*. 1999
25 Jul;67(7):3548-57). Nesse contexto, as linhagens que são caracterizadas por produzirem o subtipo A (VapA), produzido a partir do gene VapA, foram descritas como potenciais patógenos para potros (TAN, C., PRESCOTT, J. F., PATTERSON, M. C., NICHOLSON, V. M. Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of

Rhodococcus equi and its potential in protective immunity. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1995 Jan;59(1):51-9; VON BARGEN, K., HAAS, A. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009 Sep;33(5):870-91. Epub 2009 Apr 23).

As funções de VapA, e dos outros subtipos de Vap, são ainda desconhecidas.

Sabe-se que VapA é uma lipoproteína que permanece firmemente ligada à superfície da célula bacteriana. Além de VapA, os subtipos C, D, E, G e H também apresentam características de funcionalidade similares, apresentando sequências peptídicas de sinalização para a secreção ou localização na superfície celular, e também estão relacionados com linhagens virulentas de *R. equi* (KOHLER, A. K., STONE, D. M., HINES, M. T., BYRNE, B. A., ALPERIN, D. C., NORTON, L. K., HINES, S. A. *Rhodococcus equi* secreted antigens are immunogenic and stimulate a type 1 recall response in the lungs of horses immune to *R. equi* infection. *Infection and Immunity*. 2003 Nov;71(11):6329-37).

Como produtos de secreção ou moléculas de superfície é muito provável que esses subtipos apresentem características de interação com moléculas do hospedeiro, permitindo sua sobrevivência no interior de células do sistema imunitário. Essas proteínas apresentam certo grau de identidade entre elas na composição de aminoácidos, que variam de 39 a 76%, e o grau de homologia é tão maior quanto mais próxima da extremidade carboxi-terminal de suas moléculas (BYRNE, B. A., PRESCOTT, J. F, PALMER, G. H., TAKAI, S., NICHOLSON, V. M., ALPERIN, D. C., HINES, S. A. Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. *Infection and Immunity*. 2001 Feb;69(2):650-6).

Os principais alvos das infecções por *R. equi* são potros com até quatro meses de vida que apresentam uma pneumonia grave, culminando em quadro de abscessos pulmonares. Sem terapia com antibióticos a mortalidade chega a 80%, reduzida, entretanto, em cerca de 12% com o estabelecimento da quimioterapia antibacteriana, utilizando a associação entre rifampicina e eritromicina (VON BARGEN, K., HAAS, A. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009 Sep;33(5):870-91. Epub 2009 Apr 23).

Esses microrganismos são extremamente resistentes nas condições ambientais mais variadas, e encontram no solo contendo esterco de animais as características desejáveis para a sua multiplicação. Nesse ambiente, os animais jovens, com seu sistema imunológico, ainda, em desenvolvimento podem inalar as dispersões de poeira contendo células bacterianas viáveis, sendo o provável mecanismo de transmissão da pneumonia por *R. equi* (MUSCATELLO, G., LEADON, D. P., KLAYT, M., OCAMPO-SOSA, A., LEWIS, D. A., FOGARTY, U., BUCKLEY, T., GILKERSON, J. R., MEIJER, W. G., VAZQUEZ-BOLAND, J. A. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of 'rattles'. *Equine Vet J*. 2007 Sep;39(5):470-8). Uma vez inalados, *R. equi* é fagocitado por células de defesa do epitélio pulmonar (macrófagos alveolares), e residem no interior destas células apresentando mecanismos de escape da morte no interior de vesículas citoplasmáticas (VON BARGEN, K., HAAS, A. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009 Sep;33(5):870-91. Epub 2009 Apr 23). As lesões pulmonares surgem através recrutamento de células de defesa para o ambiente de infecção. Assim, neutrófilos e macrófagos preenchem o espaço alveolar, criando um ambiente inflamatório que progride para lesões necróticas do parênquima pulmonar.

Lesões granulomatosas são comuns e podem romper-se disseminando *R. equi* para outros órgãos do hospedeiro (PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991 Jan;4(1):20-34). Em um hospedeiro infectado, pode-se isolar *R. equi* até de sua respiração, mas a transmissão direta hospedeiro-hospedeiro, ainda, não foi reportada (MUSCATELLO, G., GILKERSON, J. R., BROWNING, G. F. Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009 Mar;47(3):734-7. Epub 2009 Jan 14).

A alta descarga bacteriana presente no animal infectado acarreta na auto-ingestão de grandes quantidades de células bacterianas, que pode resultar em diarreia com quadro de enterite ulcerativa (CIMPRICH, R. E., ROONEY, J. R. *Corynebacterium equi* enteritis in foals. *Veterinary Pathology*. 1977 Mar;14(2):95-102). Todo esse contexto ilustra um provável ciclo de *R. equi*, que é eliminado no ambiente por animais infectados, e alcançam um novo hospedeiro nos arredores.

Potros com até seis meses de idade são mais suscetíveis à infecção, com maior incidência em animais com dois meses desde o nascimento, e a doença ocorre principalmente nos ambientes em que haja criação de cavalos. O quadro infeccioso tem duração variável, geralmente em torno de uma a três semanas, apresentando uma alta taxa de mortalidade. Os primeiros sinais da doença crônica progressiva são febre acima de 41°C, frequência respiratória aumentada, chiado bronco-vesicular com sibilos das vias aéreas, tosse, corrimento nasal e depressão (PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991 Jan;4(1):20-34). Quadro de diarreia grave é freqüente e indica a colonização da mucosa intestinal

por *R. equi*. Os sintomas podem progredir para um quadro de falência respiratória e o animal não tratado sucumbe à asfixia e morre. Ocasionalmente, a doença pode progredir de forma aguda, matando o animal em menos de 48 horas.

5 O tratamento de infecções por *R. equi* é prolongado, e consiste na associação de dois ou mais antibióticos. Um tratamento adequado, adotado desde os estágios iniciais de uma infecção por linhagens sensíveis, deve resultar em cura. No entanto, o tratamento prolongado com antibióticos tem um custo elevado como principal
10 desvantagem, além de favorecer a emergência de linhagens resistentes (MUSCATELLO, G., LEADON, D. P., KLAYT, M., OCAMPO-SOSA, A., LEWIS, D. A., FOGARTY, U., BUCKLEY, T., GILKERSON, J. R., MEIJER, W. G., VAZQUEZ-BOLAND, J. A. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of 'rattles'. *Equine Vet J.* 2007 Sep;39(5):470-8). Tendo a infecção
15 em potros, como referência, o cenário mais otimista é proporcionado pela cura, com o resultado habitual de diminuição da capacidade atlética dos animais acometidos, com um impacto negativo no comércio de equinos. Todos esses fatores assinalam a necessidade de desenvolvimento de estratégias alternativas para prevenir infecções por *R. equi*.

20 Considerando o papel de VapA na virulência de *R. equi*, é razoável que o desenvolvimento de vacinas seja baseado nesse subtipo. Entretanto, esforços na construção de vacinas para a produção desse constituinte, através da tecnologia do DNA recombinante, não apresentaram resultados satisfatórios (VANNIASINKAM, T., BARTON, M.
25 D., HEUZENROEDER, M. W. Immune response to vaccines based upon the VapA protein of the horse pathogen, *Rhodococcus equi*, in a murine model. *International Journal of Medical Microbiology.* 2005 Jan;294(7):437-45), embora encontremos alguns resultados promissores (OLIVEIRA, A. F., FERRAZ, L. C., BROCCHI, M., ROQUE-BARREIRA, M.

C. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. *Microbes and Infection*. 2007 Mar;9(3):382-90. Epub 2007 Jan 12).

5 Diversas tentativas de atenuação de *R. equi* para utilização em vacinação não foram bem sucedidas.

Até o presente momento, a única vacina disponível para a prevenção da rodococose equina é constituída por um extrato lipoprotéico, enriquecido com VapA, destinado a aplicação subcutânea em éguas prenhas para a imunização passiva dos potros. Essa vacina,
10 ainda, não apresenta eficácia comprovada (http://www.labproser.com.ar/prodce_01en.htm).

Para a eliminação de *R. equi*, assim como, em outros patógenos intra-celulares é importante que haja a modulação para uma
15 resposta imunitária mediada por células (Th1), uma vez que respostas mediada por anticorpos (Th2) seriam ineficientes em neutralizar esses patógenos.

Resultados em modelos experimentais têm mostrado que o desejável em preparações vacinais deve ser a indução de altos níveis do
20 isotipo 2a da imunoglobulina G (IgG2a), cuja secreção é estimulada por interferon-gama, citocina típica de respostas do tipo Th1 (OLIVEIRA, A. F., FERRAZ, L. C., BROCCHI, M., ROQUE-BARREIRA, M. C. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus*
25 *equi*. *Microbes and Infection*. 2007 Mar;9(3):382-90. Epub 2007 Jan 12; KANALY, S. T., HINES, S. A., PALMER, G. H. Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia. *Infection and Immunity*. 1995 Aug;63(8):3037-41). Nesse contexto, a construção de uma vacina

baseada no antígeno VapA, e que induz uma resposta do padrão Th1, seria o modelo exato para o sucesso de uma preparação vacinal. No entanto, as construções de vacinas baseadas em VapA, que classicamente modulam a resposta imunitária para um padrão Th1, não foram capazes de proteger modelos animais contra a infecção por *R. equi* (VON BARGEN, K., HAAS, A. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009 Sep;33(5):870-91. Epub 2009 Apr 23).

Diversas questões sobre a biologia da infecção por *R. equi* ainda não foram respondidas.

Existem diversos relatos sobre a associação entre a capacidade virulenta de linhagens e a expressão do antígeno VapA. Entretanto, o genoma de *R. equi* foi descrito por conter uma série de proteínas de superfície celular, que podem estar associadas na interação com células do hospedeiro durante o processo infeccioso (VAZQUEZ-BOLAND, J. A., PRESCOTT, J. F., MEIJER, W. G., LEADON, D. P., HINES, S. A. *Rhodococcus equi* comes of age. *Equine Veterinary Journal*. 2009 Jan;41(1):93-5).

A publicação internacional WO 1988/009669 destina-se a vacinas para imunização compreendendo microrganismos patogênicos ou derivados avirulentos sendo incapazes de produzir adenilato ciclase funcional e proteína receptora de AMP cíclico.

O pedido de patente brasileiro PI 0414353 provê proteínas de piroplasmídeo (*Boophilus microplus*), ácido nucléico, fragmento de cDNA, molécula de DNA recombinante, veículo recombinante vivo, célula hospedeira, vacina, método para a preparação de uma vacina, usos de uma proteína, de uma sequência de ácido nucléico e teste de diagnóstico.

A patente europeia EP 827.410 mostra um método de introdução de genes endógeno ou exógeno dentro de células animais utilizando bactérias vivas, como vetores.

5 A patente europeia EP 500.699 descreve métodos para imunização individual para proteção contra infecções por bactéria Gram-negativa, composições vacinais contendo *Salmonella* avirulenta viva.

A patente europeia EP 1.537.214 apresenta um sistema vetor-hospedeira exibindo uma regulação de lise de bactérias para habilitar a liberação de vetores vacinais genéticos ou produto de genes
10 desejáveis a uma célula eucariótica.

Destaca-se que a expressão do antígeno VapG por *R. equi* é elevada, tanto no tecido pulmonar como em cultivo *in vitro*, e é maior do que todos os outros antígenos Vap (JACKS, S., GIGUÈRE, S., PRESCOTT, J. F. In vivo expression of and cell-mediated immune
15 responses to the plasmid-encoded virulence-associated proteins of *Rhodococcus equi* in foals. *Clinical Vaccine Immunology*. 2007 Apr;14(4):369-74. Epub 2007 Feb 14). Contudo, esse constituinte ainda não fora utilizado em estratégias vacinais até o presente momento, indicando que a utilização desse fator como potencial imunógeno pode
20 ter sido subestimada.

Assim, de forma inesperada, a Depositante desenvolveu composições vacinais contendo vetores que produzam resposta imunológica contra *R. equi*.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

25 A figura 1 descreve apresenta o perfil eletroforético em gel de agarose do polinucleotídeo amplificado da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o DNA das linhagens vacinais recombinantes de *Salmonella* chi-3987, como molde.

A figura 2 mostra um diagrama de um plasmídeo *asd+* recombinante, mostrando a localização do gene *vapG*.

A figura 3 demonstra os resultados de persistência das linhagens recombinantes, controle (PYA controle) e expressando apenas VapG (*vapG*), no baço (3a) e no fígado (3b) de camundongos. A persistência é medida através da contagem de unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC) nos órgãos dos animais.

A figura 4 apresenta os resultados de recuperação de células de *R. equi* no baço e no fígado de camundongos, imunizados com linhagens vacinais de *Salmonella* e desafiados com dose endovenosa de cem milhões de células de *R. equi*.

A figura 5 demonstra os primeiros 70 aminoácidos da sequência polipeptídica de VapG, e realçam em cinza os resíduos envolvidos no sítio de clivagem dessa lipoproteína. As barras indicam prováveis sítios de clivagem do peptídeo sinal, e a barra maior indica maior probabilidade de clivagem entre os resíduos alanil ("A") e glutamil ("E").

A figura 6 indica o perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas extraídas de células da *Salmonella* atenuada, expressando integralmente o antígeno VapG recombinante de *R. equi*, apontado por um círculo preto.

A figura 7 mostra o padrão de interferon gama produzido como característica da resposta imune Th1 contra *R. equi*, através da imunização com a linhagem vacinal de *Salmonella* (*vapG*). * $p < 0,05$.

25

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê microrganismos vivos recombinantes, tais como, organismos procariotos, em particular, enterobactérias, preferencialmente, *Salmonella enterica*, contendo as SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2, capazes de expressar lipoproteínas VapG

e/ou VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4), opcionalmente, associadas a outros ativos, métodos de preparação de linhagens vacinais, antígenos (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) e composições vacinais, preferencialmente, vacinas vetorizadas. Adicionalmente, o
5 presente pedido de patente destina-se ao uso dos vetores vacinais no preparo de composições farmacêuticas, em particular, vacinas indicadas para a prevenção e/ou tratamento de infecções por *Rhodococcus equi*, seus anticorpos e/ou anti-soros, kits de diagnósticos e métodos de profilaxia e/ou tratamento de infecções de infecções por *R. equi*.

10 De forma geral, os microrganismos do presente pedido consistem vetores microbiológicos vivos, não patogênicos e recombinantes, com condições para a expressão de pelo menos um polipeptídeo de *R. equi*, e apresentando ao sistema imunológico em um ambiente de um receptor, no sentido de funcionar como um
15 apresentador de antígeno de origem heteróloga e gerar uma resposta imunitária contra *R. equi*.

Em uma primeira realização, a presente invenção destina-se microrganismos vivos recombinantes, tais como, organismos procariotos, em particular, enterobactérias, preferencialmente, *Salmonella enterica*,
20 contendo as SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2, capazes de expressar lipoproteínas VapG e/ou VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) e/ou suas derivações, como vetores vacinais.

Particularmente, o ácido nucléico heterólogo (SEQ. ID. N°. 1) codifica para o antígeno VapG de *R. equi* (SEQ. ID. N°. 3) e o ácido
25 nucléico heterólogo (SEQ. ID. N°. 2) codifica para o antígeno VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 4) O polipeptídeo de *R. equi* pode, ainda, conter outras derivações do antígeno VapG, como por exemplo, VapA, VapC, VapD, VapE, VapF, VapH e/ou polipeptídeos homólogos, onde porções da

região N-terminal são eliminadas, suprimindo o peptídeo sinal e os sítios de lipidificação da molécula.

As porções N-terminal e C-terminal representam as porções de início e término da tradução de uma proteína ou polipeptídeo, respectivamente. Para as cadeias polipeptídicas, do presente pedido (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4), as traduções iniciam-se no resíduo metioninil, numerado como "1" ("M").

Os polipeptídeos, da presente invenção podem compreender de 55% a 100% de identidade, preferencialmente, 70% de identidade com a proteína VapG de *R. equi*, incluindo quaisquer variações e fragmentos resultantes, que são capazes de estimular uma resposta imunológica contra *R. equi*. Em particular, o polipeptídeo imunogênico abrange a sequência contígua a partir de pelo menos 15 aminoácidos de quaisquer porções características da proteína VapG de *R. equi*, de forma preferencial, com 10 aminoácidos idênticos nas porções da proteína VapG de *R. equi*, apresentando identidade de 55% a 100%, mais particularmente, 70% de identidade com a porção molde da proteína VapG de *R. equi* (SEQ. ID. N°. 3), mais preferencialmente, ainda, compreendendo uma sequência de aminoácidos de 1 a 161 ou 11 a 172 de VapG (SEQ. ID. N°. 3) ou seus fragmentos relacionados. Ainda, a proteína VapG (SEQ. ID. N°. 3) apresenta porções N-terminais extraídas, sem os primeiros 5 até 50 aminoácidos da porção N-terminal ou sem os últimos 5 até 50 aminoácidos da porção C-terminal. Os polipeptídeos de *R. equi* podem ser expressos sob a forma de proteínas de fusão ou sob a forma de múltiplos polipeptídeos separadamente. Opcionalmente, o polipeptídeo de *R. equi* pode ser expresso sob forma de proteína de fusão compreendendo sequências polipeptídicas dos antígenos VapG e/ou VapA. De forma opcional, as sequências polinucleotídicas podem ser

associadas a outros ativos, como por exemplo, outras proteínas Vap e/ou adjuvantes para modulação da resposta imunitária.

Os polinucleotídeos, descritos na presente pedido, encontram-se, preferencialmente, contidos em um vetor
5 extracromossomal (plasmídeo), entretanto, podem ser integrados no cromossoma bacteriano.

Em uma segunda realização, esta invenção, ainda, descreve o método de preparação de linhagens vacinais de *Salmonella* compreendendo: i) mutações para a atenuação da virulência; ii) um ou
10 mais fragmentos gênicos de expressão, com cada fragmento compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos de origem heteróloga (SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2) sob controle transcricional de um promotor constitutivo ou induzível, onde a sequência de ácidos nucleicos é orientada de modo a codificar, parcial e/ou integralmente, um antígeno
15 de virulência de *R. equi* (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) e, opcionalmente, iii) uma mutação em um gene essencial para a sua multiplicação, tornando-a auxotrófica para componentes que são adicionados no meio de cultura, sem haver a necessidade de utilização de antibióticos para a seleção.

20 Particularmente, as linhagens de *Salmonella* atenuadas utilizadas na presente invenção compreendem as linhagens que contêm mutações em genes responsáveis pela síntese de compostos aromáticos (delta-*aro*), em genes que interfiram com mecanismos fisiológicos do hospedeiro (delta-*cya* e delta-*crp*), ou em genes que codificam para a
25 expressão de proteínas bacterianas ligantes de ácidos nucleicos (delta-*fis*, delta-*dps*, delta-*hfq*, delta-*hupA*, delta-*hupB* ou delta-*hha*). Preferencialmente, as linhagens atenuadas de *Salmonella* contendo uma mutação no gene *aro* (delta-*aro*) ou uma linhagem atenuada de

Salmonella contendo mutações nos genes *cya* e *crp* (delta-*cya* e delta-*crp*).

Outra estratégia de mutação para a seleção de linhagens de *Salmonella* recombinantes e garantia de estabilidade de um plasmídeo construído para a expressão da proteína recombinante refere-se à mutação em um gene associado com a biossíntese de componentes da parede celular, tais como, mutação no gene *asd*, que codifica para aspartato semialdeído desidrogenase, uma enzima que participa da síntese de estruturas da parede celular bacteriana, e torna a célula bacteriana dependente de ácido diamino-pimélico para o seu crescimento. Nessa configuração, o gene *asd* pode ser complementado através da introdução de um fragmento gênico no plasmídeo, com todas as características para a expressão do gene *asd*. Assim, o resultado da introdução desses plasmídeos em linhagens bacterianas delta-*asd*, onde delta significa ausência ou inativação do gene, é a seleção de clones recombinantes em meio de cultura sem suplementação, e que expressam a proteína recombinante de *R. equi*. Por fim, a mutação atenuante é o resultado da ausência ou inativação de pelo menos um gene associado com sua patogenicidade, onde, a *Salmonella* atenuada é derivada da linhagem parental *Salmonella enterica* serovar Typhimurium UK-1.

O promotor constitutivo guia a expressão da proteína recombinante independente da fase de crescimento da célula bacteriana, do metabolismo celular ou da presença de indutores. Também, o promotor induzível orienta a expressão da proteína recombinante sob condições de estresses nutricional e/ou oxidativo ou através da adição de um componente químico indutor. Como um exemplo opcional, pode-se utilizar um promotor induzível *in vivo* sendo dependente de estruturas do organismo receptor e orientando a expressão da proteína

recombinante através da maquinaria de transcrição das células do hospedeiro.

A linhagem atenuada de *Salmonella* utilizada no presente pedido compreende uma mutação no gene *aroA*, que codifica para a enzima 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que é um precursor comum na biossíntese de numerosos compostos aromáticos em bactérias e outros organismos. Particularmente, a linhagem delta-*aro* utilizada é H683 de *S. enterica* sorovariedade Typhimurium.

O presente pedido de patente, ainda, apresenta a utilização de promotores para expressão em bactérias, tais como, os promotores *tac*, *pac*, *rac*, *trc*, *lpp*, *dps* ou *recA* de enterobactérias, T3, T7 e/ou SP6 de bacteriófagos. Também, no caso de expressão em células eucarióticas podem ser utilizados promotores MET2, MET25 de leveduras, os promotores RSV, CMV, HTLV e SV40 de vírus e beta-Actin, mPGK, eiF4alpha, CAG e ENS-I de mamíferos.

Em uma configuração particular, os polipeptídeos de *R. equi* podem conter ajustes de códon para expressão em variados vetores, preferencialmente, *Escherichia coli*, por exemplo, a linhagem delta-*asd* chi-1776.

Em uma terceira realização, a presente invenção trata do antígeno VapG de *R. equi* (SEQ. ID. N°. 3) expresso de maneira a não conter os sítios de lipidificação, onde, opcionalmente, pode incluir o antígeno VapG, associado a outros antígenos Vap de *R. equi*, selecionado de um grupo de polipeptídeos apresentando ausências de até 50 aminoácidos da porção N-terminal (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4).

O antígeno recombinante (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) pode ser produzido e purificado por eletroforese, filtração, cromatografia, centrifugação e/ou associações desses métodos. Ainda, o antígeno substancialmente purificado pode conter de 60 a 99% da substância

isoladamente, desde que não contenha subprodutos da purificação que sejam tóxicos.

Em uma quarta realização, a presente invenção trata de composições vacinais contendo o vetor vacinal recombinante (SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2) capazes de expressar lipoproteínas VapG e/ou VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) em veículos farmacologicamente aceitáveis, preferencialmente, vacinas vetorizadas.

Ainda, a composição vacinal pode compreender população de células bacterianas homogêneas. No entanto, opcionalmente, as composições podem, também, apresentar uma pluralidade de células bacterianas de diferentes isolados, como por exemplo, uma população homogênea de *Salmonella* atenuada que compreende uma população de células capazes de expressar o antígeno VapG de *R. equi* e a pluralidade de células que compreende mais de uma população de *Salmonella* atenuada, com uma população de células expressando VapG de *R. equi* e uma segunda população expressando VapA, VapC e/ou VapH.

A composição vacinal da presente invenção pode apresentar a associação de um antígeno recombinante purificado, tal como, uma população de *Salmonella* atenuada capaz de expressar VapG associada ao antígeno VapA, VapC e/ou VapH recombinantes purificados, em um veículo e/ou diluente farmacologicamente aceitável. Em outra configuração, a composição vacinal contém a *Salmonella* atenuada capaz de expressar fusões de antígenos recombinantes, compreendendo duas ou mais sequências imunogênicas de antígenos de *R. equi* fusionadas em estrutura única. Os antígenos recombinantes podem ser fusionados por outras sequências polipeptídicas e/ou moléculas imuno-estimuladoras, tais como, citocinas e quimiocinas.

A presente invenção abrange também a co-expressão de um ou mais genes que codificam para proteínas imuno-estimulatórias, como

citocinas e quimiocinas, tais quais IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15 ou IL-16. Nesse caso, a co-expressão é definida como a construção de vetores que compreendem o fragmento polinucleotídico de origem heteróloga para a expressão de um ou mais genes de citocinas e/ou quimiocinas, associado a outro fragmento polinucleotídico de origem heteróloga para a expressão de polipeptídeo(s) relacionados com VapG de *R. equi*.

As composições do presente pedido patente também podem conter adjuvantes, como por exemplo, um adjuvante oligodesoxinucleotídeo CpG, compostos de alumínio (hidróxido de alumínio, óxido de alumínio ou fosfato de alumínio), adjuvantes oleosos (óleo mineral, adjuvantes completo ou incompleto de Freund), adjuvantes originários de ácido micólico (trealose dimicolato), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), peptidoglicanos (mureína, mucopeptídeo), glicoproteínas (N-Opaca, análogos de muramil-dipeptídeo), proteoglicanos, preparações estreptocócicas (OK432), saponina, óleos neutros (migliol), óleos vegetais, lipossomos, polióis, vitamina E, Carbopol, interleucinas e/ou suas combinações.

Também, as composições da invenção podem conter excipientes e/ou carreadores farmacologicamente aceitáveis, tais como, soluções líquidas, como salina, hipoclorito e/ou outros sais atóxicos em osmolaridades próximas da fisiológica, um solvente sólido ou um material para encapsulação, onde a vacina pode ser ressuspensa ou dissolvida. O carreador farmacologicamente aceitável, ainda, deve ser atóxico para o organismo receptor e compatível com o microrganismo vivo atenuado. Os excipientes e veículos farmacêuticos podem ser escolhidos entre amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, sílica gel, estearato de sódio, estearato de magnésio,

monoestearato de glicerol, ácido ascórbico, talco, cloreto de sódio, leite em pó, maltodextrina, glicerol, propileno, glicol, água, etanol, conservantes, edulcorantes e/ou suas combinações.

Particularmente, uma configuração da invenção indica uma
5 composição vacinal que compreende um microrganismo liofilizado, em especial, uma linhagem atenuada de *S. enterica* sorovariedade Typhimurium, com deleções nos genes *cya*, *crp* e *asd* (delta-*cya*, delta-*crp* e delta-*asd*) em suspensão contendo pelo menos um excipiente escolhido dentre lactose, sorbitol, fosfato dibásico de sódio, fosfato
10 monobásico de potássio, sacarose, salina estéril e/ou água.

As composições da atual invenção podem ser administradas por métodos invasivos, como por exemplo, via parenteral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdermal, intramucosa, intranasal, intragástrica e/ou métodos não-invasivos, tais como, oral,
15 retal, inalação, nasal e/ou ocular, preferencialmente, via oral e nasal.

As formas farmacêuticas do presente pedido de patente podem variar entre cápsulas de gelatina, pílulas, comprimidos, drágeas, elixires, suspensões, xaropes, suspensões para vaporizadores, preferencialmente vacinas. Opcionalmente, cápsulas de gelatina podem
20 servir como carreadores para vacinas liofilizadas.

Em uma quinta realização, a presente invenção destina-se ao uso dos vetores no preparo de composições farmacêuticas, em particular, vacinas vetorizadas indicadas para prevenção e/ou tratamento de infecções por *Rhodococcus equi*.

25 Em particular, as infecções referem-se a condições associadas à infecção por *R. equi*, tal como, pneumonia piogranulomatosa e/ou colites.

A resposta imunológica é caracterizada por um padrão de imunidade mediada por células associada a uma resposta imunológica

de mucosa, com produção do isotipo A de imunoglobulina (IgA), específico para a proteína de *R. equi* recombinante.

Em uma sexta realização, a presente invenção inclui anti-soros, anticorpos, isolados ou substancialmente purificados, produzidos
5 contra os antígenos recombinantes (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4).

Os anti-soros e anticorpos podem ser purificados através de cromatografia de afinidade com os antígenos recombinantes.

Em uma sétima realização, a invenção refere-se a um kit de diagnóstico contendo um ou mais antígenos Vaps (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ.
10 ID. N°. 4) de *R. equi* recombinantes (SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2), em conjunto com seus anticorpos específicos. Adicionalmente, o kit destina-se ao ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de infecções por *R. equi*.

Em uma oitava realização a presente invenção apresenta
15 métodos de profilaxia e/ou tratamento a partir de duas imunizações, sendo, uma inicial e outra de reforço, adequada para a administração das vacinas. Opcionalmente, no método de duas imunizações utilizam-se pelo menos uma composição vacinal da presente invenção, onde, a administração de uma ou mais composições vacinais pode ser feita em
20 um organismo receptor, apresentando o polipeptídeo recombinante no contexto do vetor vacinal para o sistema imunitário do receptor, obrigatoriamente um vertebrado, e uma segunda composição sendo utilizada como dose de reforço.

Em um protocolo de imunização da presente invenção, a
25 linhagem atenuada de *Salmonella* recombinante, utilizada para apresentar antígeno(s) de *R. equi* para o sistema imunitário, em uma determinada composição e administrada no primeiro dia de vida de um animal vertebrado, e uma segunda dose, contida em uma composição idêntica a primeira, sendo utilizada como reforço para uma resposta

imunológica contra *R. equi*, administrada quinze dias após a primeira dose.

De forma particular, o método para vacinar um organismo receptor contra *R. equi* ocorre através da administração oral para um eqüino com alto risco de contrair uma infecção por *R. equi* ou um eqüino que já apresente a infecção por *R. equi*, incluindo também outros hospedeiros vertebrados.

Com o intuito de melhor definir a presente invenção segue algumas definições da terminologia utilizada:

10 O termo “atenuado” refere-se a um microrganismo geneticamente modificado com o propósito de não causar doenças em humanos ou em modelos animais.

“Vetor vacinal” refere-se a uma bactéria, vírus ou molécula de ácido nucléico circular, avirulentos, utilizados para a expressão de antígenos heterólogos no ambiente de um hospedeiro, construído de maneira a estimular uma resposta imunológica protetora, montada a partir do antígeno recombinante como parte do microrganismo que o produz naturalmente.

20 O termo “resposta imunológica” refere-se a montagem de uma resposta pelo hospedeiro que confere imunidade protetora e pode ser considerada a resposta suficiente para prevenir o organismo receptor de desenvolver sintomas relacionados à infecção.

25 O termo “fragmento de expressão gênica” refere-se a uma construção de ácidos nucléicos compreendendo um ácido nucléico de origem heteróloga que está sob controle transcricional de um promotor.

O termo “polipeptídeo imunogênico” refere-se a uma porção de uma proteína associada à virulência de *R. equi* ou a proteína integralmente, assim como é expressa naturalmente por *R. equi*. O polipeptídeo imunogênico deve ser capaz de estimular uma resposta

imunológica quando expresso pelo vetor vacinal bacteriano no ambiente do organismo receptor.

O termo “farmaceuticamente aceitável” significa uma composição aprovada pelas agências reguladoras ou incluída nas Farmacopéias Nacionais e/ou Internacionalmente reconhecidas.

O termo “promotor” refere-se a uma sequência de nucleotídeos de ácidos nucléicos responsável pela ligação de complexos protéicos que compreendam uma enzima RNA polimerase, resultando no início da transcrição de um gene justaposto.

Os termos “ácido nucléico”, “nucleotídeo” e “polinucleotídeo” utilizados nas descrições referem-se à desoxiribonucleotídeos (DNA) ou ribonucleotídeos e seus polímeros, sejam na forma de fita única ou em dupla fita. Esses termos estão relacionados com ácidos nucléicos que contêm análogos naturais de nucleotídeos, que tenham propriedades de ligação idênticas aos ácidos nucléicos de referência, e são metabolizados de maneira similar aos nucleotídeos encontrados naturalmente. Ainda, o termo ácido nucléico é utilizado para descrever genes, DNA complementar (cDNA), e o RNA mensageiro (mRNA) transcrito de um gene. Ainda sobre os termos “ácido nucléico”, “nucleotídeo” e “polinucleotídeo”, eles compreendem moléculas de DNA de quaisquer origens (cDNA ou genômico), moléculas de RNA, moléculas análogas de DNA ou RNA, geradas a partir de reações com nucleotídeos análogos.

O termo “identidade”, relativo às sequências de ácidos nucléicos e proteínas, refere-se à comparação entre duas ou mais sequências polinucleotídicas ou entre duas ou mais sequências polipeptídicas, respectivamente.

O termo “transformação” é utilizado para referir-se a transferência de ácido nucléico para o interior de uma célula, e o termo

“transformação genética” refere-se a transferência e incorporação de DNA recombinante no interior de uma célula.

O termo “variante” é utilizado para referir-se a polinucleotídeos ou polipeptídeos que apresentam diferenças quando comparado com o ácido nucléico ou polipeptídeos de referência, no entanto mantém suas propriedades essenciais.

O termo “similar” refere-se ao fato de que a troca de um aminoácido de uma determinada posição em uma cadeia polipeptídica não resulta em alteração funcional e estrutural quando comparada com a molécula de referência.

EXEMPLOS

As linhagens e plasmídeos foram obtidas de fontes comerciais e sua utilização ocorreu segundo seus fabricantes. A identidade e a pureza de todos os compostos foram verificadas por meio de análise de LC-MS e RNM 1H.

CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PARA A EXPRESSÃO DE VAPG DE R. EQUI EM

LINHAGENS ATENUADAS DE SALMONELLA

As linhagens bacterianas utilizadas na presente invenção estão descritas na tabela 1. A linhagem de *Salmonella* utilizada foi a delta-*cya*, -*crp* e -*asd*, denominada chi-3987.

TABELA 1

LINHAGENS BACTERIANAS

Bactéria	Genótipo
<i>E. coli</i> chi.6212	F'endA1 hsdR17(r _k -m _k +) supE44 thi-1 reaA1 gyrA (Nalr) relA1 (Δ(lacIZYA-argF) U169 deoR (φ80 diacΔ(lacZ) M15) Δasd
<i>S. enterica</i> Typhimurium chi.3987 UK-1	pStV1 ⁺ Δ <i>cya</i> -12 Δ <i>crp</i> -11 Δ <i>asd</i> A1 Δ[zhf- 4::Tn10]
<i>S. enterica</i> Typhimurium H683	Δ <i>aro</i> Δ <i>asd</i>

A seqüência estrutural do gene *vapG* foi obtida por reação de amplificação de DNA (PCR), utilizando-se os iniciadores (SEQ. ID. N°. 5 e SEQ. ID. N°. 6), contendo sítios de clivagem para as enzimas endonucleases *Bam*HI e *Sa*II.

5 A amplificação por PCR foi realizada em volume final de 50 microlitros, através de um conjunto de reagentes comumente utilizados, e o produto dessa reação (SEQ. ID. NO. 1) está mostrado na figura 1. A reação de amplificação foi realizada através de métodos descritos no estado da arte. Com a amplificação, os fragmentos obtidos foram
10 constituídos dos sítios de clivagem pelas endonucleases *Bam*HI e *Sa*II, flanqueando o gene estrutural *vapG*, para possibilitar assim a clonagem do fragmento amplificado, digerido por estas endonucleases, no plasmídeo *asd+*, digerido com as mesmas endonucleases.

Os procedimentos de digestão e purificação foram feitos a
15 partir de reagentes disponíveis. A ligação do fragmento de amplificação ao plasmídeo *asd+*, ambos digeridos e purificados, foi feita através de reação com enzima DNA-Ligase T4.

O cassete de expressão do antígeno VapG foi inserido em plasmídeo *asd+*, através dos sítios de restrição das endonucleases
20 *Bam*HI e *Sa*II. Essa construção foi realizada sem otimização de códon, porém, os polinucleotídeos que codificam VapG podem conter modificações que não alterem a seqüência polipeptídica de expressão. Após a modificação do plasmídeo *asd+* com a introdução do cassete de expressão de *vapG*, esse plasmídeo recombinante está pronto para
25 introdução por eletroporação em linhagens de clonagem, como *Escherichia coli* delta-*asd* chi.6212, e nas linhagens vacinais de *Salmonella*. O plasmídeo *asd+* recombinante (*vapG*) foi esquematizado na figura 2.

O procedimento de eletroporação foi realizado através da adição de 5,0 microlitros da suspensão do plasmídeo recombinante a 40 microlitros de células bacterianas eletrocompetentes. A eletroporação foi realizada em Eletroporador BioRad nas condições de 12,5 quilo volts/cm, 200 ohms e 25 microFaraday. Os procedimentos de eletroporação foram realizados primeiro em células de clonagem (*E. coli* chi.6212), para posterior extração de plasmídeos e introdução em células vacinais de *Salmonella* (chi.3987). Todos os clones foram selecionados com base no crescimento em meios de cultivo sólidos artificiais, sem a adição de suplementos. Clones bacterianos delta-*asd* carregando o plasmídeo *asd+* cresceram nesses meios de cultivo sem a adição do suplemento ácido diamino-pimélico, indicando a atividade desses plasmídeos pelos clones selecionados. Alguns clones menores podem crescer após a incubação de um dia, e circundam clones maiores, tratando-se de colônias satélites que aproveitam do metabolismo dos clones positivos próximos para conseguirem crescer sem carrear os plasmídeos *asd+* recombinantes.

Linhagens controles foram transformadas com o plasmídeo *asd+* vazio, ou seja, sem conter cassetes de clonagem. Colônias selecionadas foram cultivadas em 3,0 mililitros de caldo de cultura artificial. As suspensões bacterianas em meio líquido foram processadas para a extração, análise e sequenciamento de DNA plasmidial, e parte foi separada para estocagem primária das amostras. Para as amostras que foram caracterizadas por conter o gene *vapG*, realizou-se cultivo posterior em caldo enriquecido (Luria-Bertani, LB) para construção de bancos celulares para estoque em temperatura negativa em 80°C. Todos esses procedimentos foram iguais para os clones vacinais e para os clones controles, contendo apenas plasmídeo *asd+* vazio.

MODELO DE IMUNIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos fêmeas isogênicos, entre 6 e 8 semanas de idade, da linhagem BALB/c. Foram formados dois grupos experimentais contendo 12 camundongos BALB/c. No grupo I, os animais foram imunizados com a linhagem vacinal contendo o plasmídeo *asd+* recombinante para o cassete de expressão de *vapG*, e no grupo II, os animais receberam a linhagem vacinal contendo o plasmídeo *asd+* vazio. Os camundongos foram inoculados, via oral, com 200 microlitros das suspensões bacterianas em uma única dose de aproximadamente 100 milhões de células bacterianas. Subgrupos de 4 animais de cada grupo foram sacrificados no terceiro, décimo e vigésimo dias após a inoculação, e o baço e o fígado desses animais foram removidos para o estudo de persistência bacteriana nos tecidos. Esses órgãos foram previamente pesados e divulsionados em tampão fosfato (PBS) utilizando-se homogeneizador elétrico. Desse homogeneizado, 100 microlitros foram cultivados por um dia em meio de cultivo sólido seletivo para bactérias Gram-negativas (Agar McConkey). A quantificação de células bacterianas foi feita através da contagem de colônias visualizadas no meio sólido, e foram estimadas em número de bactérias por grama de órgão, mostrada na figura 3. Para a avaliação de proteção induzida, camundongos BALB/c foram imunizados conforme protocolo descrito acima, contendo um quarto grupo de animais que receberam apenas o veículo da suspensão, constituído por tampão fosfato (PBS). Todos os animais foram desafiados com uma dose intravenosa letal de cerca de 100 milhões de células de *R. equi* da linhagem ATCC33701. Cinco dias após o desafio os animais foram submetidos à eutanásia para a retirada do baço e do fígado para a contagem de células de *R. equi* por grama de órgão (figura 4), como descrita acima. Colônias isoladas dos

tecidos foram avaliadas quanto à expressão de antígenos Vap por eletroforese em gel de poliacrilamida, como mostrado na figura 6.

Para a imunização oral foram formados dois grupos experimentais de camundongos BALB/c. No grupo I, os animais foram
5 imunizados com a linhagem vacinal contendo o plasmídeo *asd+* recombinante para o cassete de expressão de *vapG*, e no grupo II, os animais receberam a linhagem vacinal contendo o plasmídeo *asd+* vazio. Os camundongos foram inoculados por via oral com 200 microlitros das suspensões bacterianas contendo cerca de 100 milhões de células
10 bacterianas; foram feitas duas imunizações com intervalo de 14 dias.

Uma coleta de sangue foi feita antes da primeira imunização para obtenção de soro pré-imune (controle) e após a segunda imunização, em intervalos de 7 dias, num total de 6 semanas de coleta de soro imune (teste). Em cada ponto de amostragem foram coletados
15 soros de quatro camundongos (n=28). A coleta foi realizada por via sub-ocular e o soro foi recolhido através da centrifugação do sangue total para determinação do título de anticorpos (IgG total, IgG1 e IgG2a).

O material fecal foi coletado isoladamente (150-300 µg/animal) e imediatamente transferido para tubos de
20 microcentrifugação contendo 1,0 ml de PBS, inibidor de protease PMSF 1,0 mM e albumina sérica bovina (BSA) 1%. Os tubos foram incubados em geladeira por aproximadamente 16 horas e, em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas em alta rotação por 5 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos para a
25 determinação do título das imunoglobulinas citadas.

Um ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para qualificar, nas fezes e no soro de camundongos imunizados, a presença de anticorpos IgA, IgG total, IgG1 e IgG2a (soro) que reagem com antígenos de extrato bruto celular de *Rhodococcus equi*. Para tais

ensaios, placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com antígenos de extrato bruto de *R. equi*, utilizando como anticorpos primários aqueles contidos no soro ou fezes dos animais imunizados. As reações foram detectadas com sondas imunoenzimáticas (anti-
5 imunoglobulinas ligadas à enzima peroxidase), observando suas respectivas classes e subclasses de imunoglobulinas, e reveladas com substrato para peroxidase disponível comercialmente.

Para avaliar o padrão de resposta imunitária após a imunização, quatro grupos de camundongos BALB/c foram submetidos
10 ao mesmo protocolo de imunização descrito acima. Quinze dias após a primeira imunização, os animais receberam uma segunda dose de imunógeno. Após 30 dias da primeira imunização, os animais foram submetidos à eutanásia para a retirada do fígado para dosagem de interferon gama por método imunoenzimático (ELISA), mostrada na
15 figura 7.

LISTAGENS DE SEQUÊNCIAS

<110> USP - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO/ INVENT BIOTECNOLOGIA LTDA.

5 <120> "MICRORGANISMOS RECOMBINANTES, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE LINHAGENS VACINAIS, ANTÍGENOS, COMPOSIÇÕES VACINAIS VETORIZADAS, SEUS USOS, ANTICORPOS, KIT DE DIAGNÓSTICO E MÉTODOS DE TRATAMENTO E/OU PROFILAXIA"

<130> 10.1.1748.17.5

10 <160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 519

<212> DNA

15 <213> *Rhodococcus equi*

<400> 1

atgagtgttc ggaccctttt ggcggcaacg ctcgttgctg gaatattcagt cttggcaccg 60

gccggcattg cgaacgcgga aacttcaatg gtatccacta cagcagcatc gagggtcgcg 120

cacgctgcaa acacctacga ctttgcagag gcgaagagcg ggagctctat ccccgccaaa 180

20 gtagccgcag agcaggcaaa cagctattcg gtccacgggc ttgtcaccag cctcgccgta 240

taccagcact tttcactgac cgttgaaggc ggcggaaaga cgtttactgg tgattctggc 300

gggatttcga ttcccggggt tgcagtgctg gagggaaacc tattcaccga ggatctgcag 360

catttgata gcgacaccgt ctcgttcgag tacaacgccg taggcccgta cctgaacatc 420

aacttttttg acagccatgg cactctccta ggccacgtgc agtctggatc catcgggacc 480

25 gtctccgca tcggtggcgg aaccggaggg tggcaatag 519

<210> 2**<211> 1111****<212> DNA****<213> *Rhodococcus equi***5 **<400> 2**

atgaagactc ttcacaagac ggtttctaag gcgatcgag ccacagccgt agctgaggct 60
 ggggctatga ttcccgccgg ctgagctaat gcgaccgttc ttgattccgg tagcagcagt 120
 gcgattctca atagtggggc aggagtgcc attgtcggtt ctgggagcta tgacagctcg 180
 acgacttcgt taaaccttca gaaagacgaa ccgaacggtc gagcaagcga taccgccggg 240
 10 caagagcagc agtacgacgt tcacggagac gtcacgagcg cggtcgtcta ccagaggttt 300
 cacgtattcg ggccagaagg aaaggtcttc gatggcgatg cagggggact cacgcttcct 360
 ggggccggcg cgttctgggg gactctcttc acaaagacc ttcagcgtct ctacaaagac 420
 accgtctcgt tccagtacaa cgccgtgggg ccatacctga acatcaactt cttcgatagc 480
 tcaggtagct tctcggcca tatccagtcc ggtggagtta gtactgtggt gggcgtcggc 540
 15 ggcggctctg gtagctggca caacgcctag gtcgacaaga gaggatgata tcatgagtgt 600
 tcggaccctt ttggcggcaa cgctcgttgc tggaaatca gtcttggcac cggccggcat 660
 tgcaacgcg gaaacttcaa tggatccac tacagcagca tcgagtgtcg agcacgctgc 720
 aaacacctac gactttgcag aggcgaagag cgggagctct atcccccca aagtagccgc 780
 agagcaggca aacagctatt cggccacgg gcttgtcacc agcctcgccg tataccagca 840
 20 cttttcactg accgttgaag gcggcgaaa gacgtttact ggtgattctg gcgggatttc 900
 gattccccggg gttgcagtg tggagggaa cctattcacc gaggatctgc agcatttgta 960
 cagcgacacc gtctcgttcg agtacaacgc cgtaggcccc tacctgaaca tcaacttttt 1020
 tgacagccat ggcactctcc taggccacgt gcagtctgga tccatcggga ccgtctccgg 1080
 catcggtagc ggaaccggag ggtggcaata g 1111

25

<210> 3**<211> 172****<212> PRT****<213> *Rhodococcus equi***5 **<400> 3**

Met Ser Val Arg Thr Leu Leu Ala Ala Thr Leu Val Ala Gly Ile Ser

1 5 10 15

Val Leu Ala Pro Ala Gly Ile Ala Asn Ala Glu Thr Ser Met Val Ser

20 25 30

10 Thr Thr Ala Ala Ser Ser Val Glu His Ala Ala Asn Thr Tyr Asp Phe

35 40 45

Ala Glu Ala Lys Ser Gly Ser Ser Ile Pro Ala Lys Val Ala Ala Glu

50 55 60

Gln Ala Asn Ser Tyr Ser Val His Gly Leu Val Thr Ser Leu Ala Val

15 65 70 75 80

Tyr Gln His Phe Ser Leu Thr Val Glu Gly Gly Gly Lys Thr Phe Thr

85 90 95

Gly Asp Ser Gly Gly Ile Ser Ile Pro Gly Val Ala Val Leu Glu Gly

100 105 110

20 Thr Leu Phe Thr Glu Asp Leu Gln His Leu Tyr Ser Asp Thr Val Ser

115 120 125

Phe Glu Tyr Asn Ala Val Gly Pro Tyr Leu Asn Ile Asn Phe Phe Asp

130 135 140

Ser His Gly Thr Leu Leu Gly His Val Gln Ser Gly Ser Ile Gly Thr

25 145 150 155 160

Val Ser Gly Ile Gly Gly Gly Thr Gly Gly Trp Gln

165 170

<210> 4**<211> 189****<212> PRT****<213> *Rhodococcus equi***5 **<400> 4**

Met Lys Thr Leu His Lys Thr Val Ser Lys Ala Ile Ala Ala Thr Ala

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Ala Met Ile Pro Ala Gly Cys Ala Asn Ala Thr

20 25 30

10 Val Leu Asp Ser Gly Ser Ser Ser Ala Ile Leu Asn Ser Gly Ala Gly

35 40 45

Ser Gly Ile Val Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Thr Ser Leu

50 55 60

Asn Leu Gln Lys Asp Glu Pro Asn Gly Arg Ala Ser Asp Thr Ala Gly

15 65 70 75 80

Gln Glu Gln Gln Tyr Asp Val His Gly Asp Val Ile Ser Ala Val Val

85 90 95

Tyr Gln Arg Phe His Val Phe Gly Pro Glu Gly Lys Val Phe Asp Gly

100 105 110

20 Asp Ala Gly Gly Leu Thr Leu Pro Gly Ala Gly Ala Phe Trp Gly Thr

115 120 125

Leu Phe Thr Asn Asp Leu Gln Arg Leu Tyr Lys Asp Thr Val Ser Phe

130 135 140

Gln Tyr Asn Ala Val Gly Pro Tyr Leu Asn Ile Asn Phe Phe Asp Ser

25 145 150 155 160

Ser Gly Ser Phe Leu Gly His Ile Gln Ser Gly Gly Val Ser Thr Val

165 170 175

Val Gly Val Gly Gly Gly Ser Gly Ser Trp His Asn Ala

180 185

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> *Rhodococcus equi*

5 **<400> 5**

gcggccgctcg acaagagagg atgatatcat gagt 34

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> *Rhodococcus equi*

5 **<400> 6**

gcgcgctgca gctattgcca ccctccggtt c 31

REIVINDICAÇÕES

1. MICRORGANISMOS VIVOS RECOMBINANTES, caracterizado pelo fato de compreender organismos procariotos, particularmente, enterobactérias, preferencialmente, *Salmonella enterica*,
5 contendo as SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2.
2. MICRORGANISMOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato dos microrganismos compreenderem a capacidade de expressar lipoproteínas VapG e/ou VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) e/ou suas derivações.
- 10 3. MICRORGANISMOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato do ácido nucléico heterólogo (SEQ. ID. N°. 1) compreender a codificação para o antígeno VapG de *R. equi* (SEQ. ID. N°. 3).
- 15 4. MICRORGANISMOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato do ácido nucléico heterólogo (SEQ. ID. N°. 2) compreender a codificação para o antígeno VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4).
- 20 5. MICRORGANISMOS, de acordo com as reivindicações 2 a 4, caracterizado pelo fato do polipeptídeo de *R. equi* compreender, ainda, outras derivações do antígeno VapG, tais como, VapA, VapC, VapD, VapE, VapF, VapH e/ou polipetídeos homólogos.
- 25 6. MICRORGANISMOS, de acordo com as reivindicações 2 a 5, caracterizado pelo fato do polipeptídeo compreender a eliminação de porções da região N-terminal com o peptídeo sinal e os sítios de lipidificação da molécula suprimidos.
7. MICRORGANISMOS, de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato dos polipeptídeos compreenderem de 55% a 100% de identidade, preferencialmente, 70% de identidade com a

proteína VapG de *R. equi*, incluindo quaisquer variações e fragmentos resultantes.

8. MICRORGANISMOS, de acordo com as reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato dos polipeptídeos imunogênicos compreenderem uma sequência de pelo menos 15 aminoácidos, preferencialmente, com 10 aminoácidos idênticos nas porções da proteína VapG de *R. equi*.

9. MICRORGANISMOS, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato dos polipeptídeos compreenderem, particularmente, uma sequência de aminoácidos de 1 a 161 ou 11 a 172 de VapG (SEQ. ID. N°. 3) ou seus fragmentos.

10. MICRORGANISMOS, de acordo com as reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de compreenderem polipeptídeos de *R. equi* expressos sob a forma de proteínas de fusão ou sob a forma de múltiplos polipeptídeos separadamente.

11. MICRORGANISMOS, de acordo com as reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato dos polinucleotídeos compreenderem sua integração/incorporação em um vetor extracromossomal ou no cromossomo bacteriano, preferencialmente, em um plasmídeo.

12. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE LINHAGENS VACINAIS, de acordo com as reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de i) mutações para a atenuação da virulência; ii) um ou mais fragmentos gênicos de expressão, com cada fragmento compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos de origem heteróloga (SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2) sob controle transcricional de um promotor constitutivo ou induzível, onde a sequência de ácidos nucleicos é orientada para codificar, parcial e/ou integralmente, um antígeno de virulência de *R. equi* (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) e, opcionalmente, iii) uma mutação em um gene essencial para a sua

multiplicação, tornando-a auxotrófica para componentes que são adicionados no meio de cultura, sem haver a necessidade de utilização de antibióticos para a seleção.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato das linhagens compreenderem, preferencialmente, linhagens de *Salmonella* atenuadas.

14. MÉTODO, de acordo com as reivindicações 12 e 13, caracterizado pelo fato das linhagens compreenderem mutações em genes responsáveis pela síntese de compostos aromáticos (delta-*aro*), em genes que interfiram com mecanismos fisiológicos do hospedeiro (delta-*cya* e delta-*crp*) e/ou em genes que codificam para a expressão de proteínas bacterianas ligantes de ácidos nucleicos (delta-*fis*, delta-*dps*, delta-*hfq*, delta-*hupA*, delta-*hupB* ou delta-*hha*).

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato das linhagens compreenderem a ausência ou inativação de pelo menos um gene associado com sua patogenicidade, onde, a *Salmonella* atenuada é derivada da linhagem parental *Salmonella enterica* serovar Typhimurium UK-1.

16. MÉTODO, de acordo com as reivindicações 12 a 15, caracterizado pelo fato das linhagens atenuadas de *Salmonella* compreenderem uma mutação no gene *aroA*, que codifica para a enzima 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), particularmente, a linhagem H683 de *S. enterica* sorovariedade Typhimurium.

17. MÉTODO, de acordo com as reivindicações 12 a 16, caracterizado pelo de compreender a utilização de promotores para expressão em bactérias, tais como, os promotores *tac*, *pac*, *rac*, *trc*, *lpp*, *dps* ou *recA* de enterobactérias, T3, T7 e/ou SP6 de bacteriófagos.

18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato do método, ainda, compreender a utilização de

promotores MET2, MET25 de leveduras, os promotores RSV, CMV, HTLV e SV40 de vírus e beta-Actin, mPGK, eIF4alpha, CAG e ENS-I de mamíferos, no caso de expressão em células eucarióticas.

5 19. MÉTODO, de acordo com as reivindicações 12 a 18, caracterizado pelo de compreender ajustes de códon para expressão em variados vetores.

20. ANTÍGENO, de acordo com as reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de compreender as SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4.

10 21. ANTÍGENO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de compreender sua expressão sem os sítios de lipidificação.

15 22. ANTÍGENO, de acordo com as reivindicações 20 e 21, caracterizado pelo fato de compreender, opcionalmente, o antígeno VapG associado a outros antígenos Vap de *R. equi*, selecionado de um grupo de polipeptídeos apresentando ausências de até 50 aminoácidos da porção N-terminal.

20 23. ANTÍGENO, de acordo com as reivindicações 20 a 22, caracterizado pelo fato do antígeno recombinante compreender de 60 a 99% da substância isoladamente.

24. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com as reivindicações 1 a 23, caracterizadas pelo fato de compreenderem vacinas vetorizadas.

25 25. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com a reivindicação 24, caracterizadas pelo fato de compreenderem vetor vacinal recombinante (SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2) capazes de expressar lipoproteínas VapG e/ou VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) em veículos farmacologicamente aceitáveis.

26. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com as reivindicações 24 e 25, caracterizadas pelo fato de compreenderem a associação de um antígeno recombinante purificado, tal como, uma população de *Salmonella* atenuada capaz de expressar VapG associada ao antígeno VapA, VapC e/ou VapH recombinantes purificados, em um veículo e/ou diluente farmacêuticamente aceitável.

27. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com as reivindicações 24 e 26, caracterizadas pelo fato de compreenderem, particularmente, *Salmonella* atenuada capaz de expressar fusões de antígenos recombinantes, contendo duas ou mais sequências imunogênicas de antígenos de *R. equi* fusionadas em estrutura única.

28. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com as reivindicações 24 e 27, caracterizadas pelo fato de compreenderem, opcionalmente, fusão com outras sequências polipeptídicas e/ou moléculas imuno-estimuladoras, tais como, citocinas e quimiocinas.

29. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com a reivindicação 28, caracterizadas pelo fato das citocinas e quimiocinas compreenderem IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15 ou IL-16.

30. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com as reivindicações 24 a 29, caracterizadas pelo fato das composições compreenderem, opcionalmente, componentes adjuvantes, tais como, oligodesoxinucleotídeo CpG, compostos de alumínio (hidróxido de alumínio, óxido de alumínio ou fosfato de alumínio), adjuvantes oleosos (óleo mineral, adjuvantes completo ou incompleto de Freund), adjuvantes originários de ácido micólico (trealose dimicolato), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), peptidoglicanos (mureína, mucopeptídeo), glicoproteínas (N-Opaca, análogos de muramil-dipeptídeo), proteoglicanos, preparações estreptocócicas (OK432), saponina, óleos

neutros (migliol), óleos vegetais, lipossomos, polióis, vitamina E, Carbopol, interleucinas e/ou suas combinações.

31. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com as reivindicações 24 a 30, caracterizadas pelo fato das composições de
5 compreenderem, também, excipientes e/ou carreadores farmacologicamente aceitáveis, tais como, soluções líquidas, como salina, hipoclorito e/ou outros sais atóxicos, um solvente sólido ou um material para encapsulação, onde a vacina pode ser ressuspensa ou dissolvida.

32. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com as
10 reivindicações 24 a 31, caracterizadas pelo fato dos excipientes e veículos farmacêuticos compreenderem, ainda, amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, sílica gel, estearato de sódio, estearato de magnésio, monoestearato de glicerol, ácido ascórbico, talco, cloreto de sódio, leite em pó, maltodextrina, glicerol, propileno,
15 glicol, água, etanol, conservantes, edulcorantes e/ou suas combinações.

33. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com as reivindicações 24 a 32, caracterizadas pelo fato das composições compreenderem formas farmacêuticas, tais como, cápsulas de gelatina, pílulas, comprimidos, drágeas, elixires, suspensões, xaropes, suspensões
20 para vaporizadores, preferencialmente vacinas.

34. COMPOSIÇÕES VACINAIS, de acordo com as reivindicações 24 a 33, caracterizadas pelo fato das composições compreenderem, particularmente, cápsulas de gelatina como
carreadoras para vacinas liofilizadas.

25 35. USO DOS VETORES VACINAL, de acordo com as reivindicações 1 a 34, caracterizado pelo fato de compreender o preparo de composições farmacêuticas, em particular, vacinas indicadas para a prevenção e/ou tratamento de infecções por *Rhodococcus equi*.

36. USO, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato das infecções por *Rhodococcus equi* compreenderem, particularmente, pneumonia piogranulomatosa e/ou colites.

5 37. ANTI-SOROS E/OU ANTICORPOS, de acordo com as reivindicações 1 a 36, caracterizados pelo fato de serem isolados ou substancialmente purificados, produzidos contra os antígenos recombinantes (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4).

10 38. ANTI-SOROS E/OU ANTICORPOS, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato da purificação ser compreendida através de cromatografia de afinidade com os antígenos recombinantes.

15 39. KIT DE DIAGNÓSTICO, de acordo com as reivindicações 1 a 38, caracterizado pelo fato de compreender um ou mais antígenos Vaps (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) de *R. equi* recombinantes (SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2), em conjunto com seus anticorpos específicos.

40. KIT, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato do kit compreender um ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de infecções por *R. equi*.

20 41. MÉTODO DE PROFILAXIA E/OU TRATAMENTO, de acordo com as reivindicações 1 a 40, caracterizado pelo fato de compreender o tratamento e/ou profilaxia de infecções por *R. equi*.

25 42. MÉTODO DE PROFILAXIA E/OU TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato do método de profilaxia e/ou tratamento compreender administração de uma ou mais composições vacinais, sendo, uma dose inicial e uma dose de reforço.

43. MÉTODO DE PROFILAXIA E/OU TRATAMENTO, de acordo com as reivindicações 41 e 42, caracterizado pelo fato de compreender a administração da dose inicial no primeiro dia de vida e uma dose de reforço quinze dias após a primeira dose.

44. MÉTODO DE PROFILAXIA E/OU TRATAMENTO, de acordo com as reivindicações 41 a 43, caracterizado pelo fato da administração compreender métodos invasivos, tais como, via parenteral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, 5 transdermal, intramucosa, intranasal, intragástrica e/ou métodos não-invasivos, tais como, oral, retal, inalação, nasal e/ou ocular, preferencialmente, via oral e nasal.

FIGURA 1

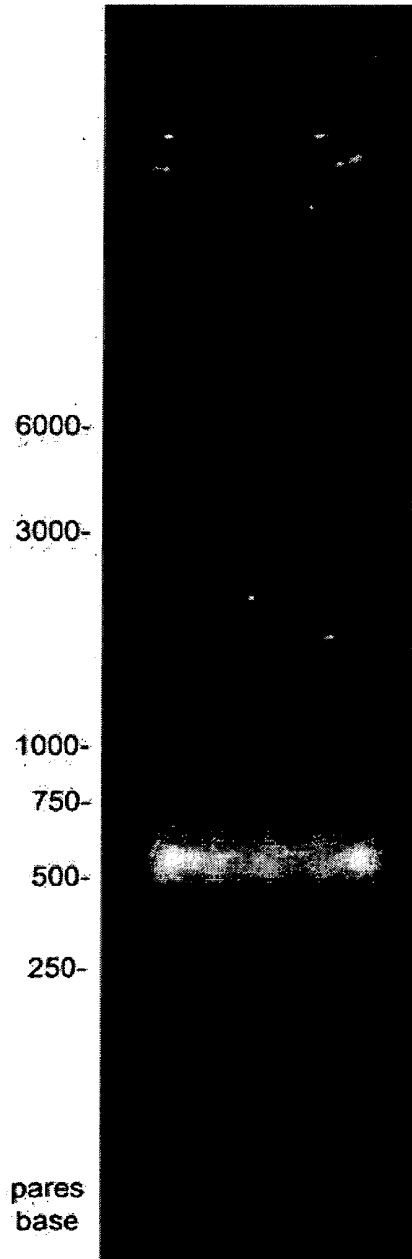


FIGURA 2

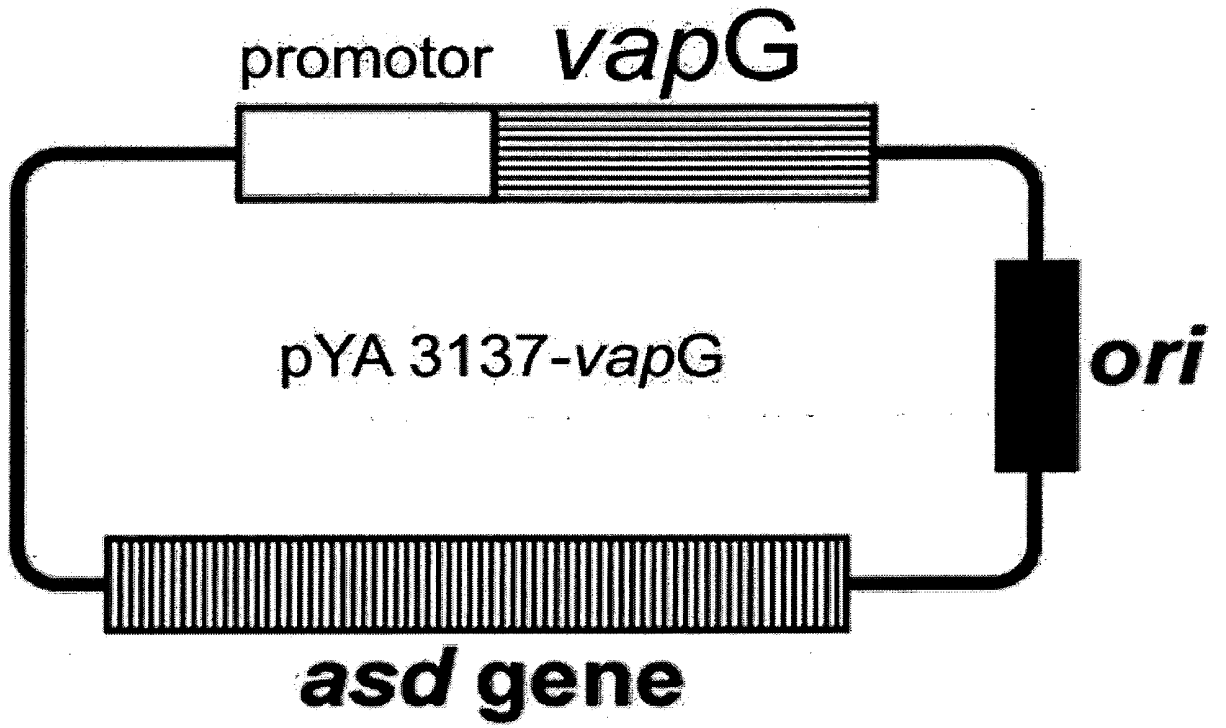


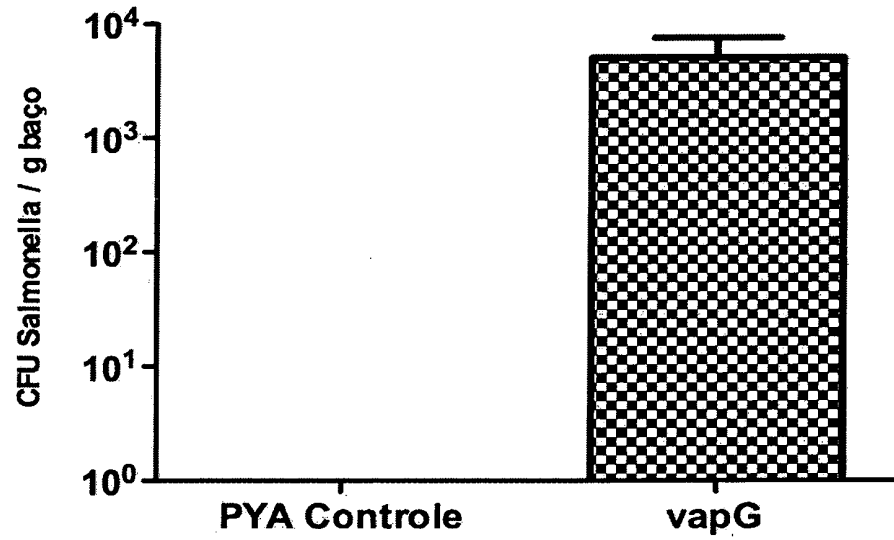
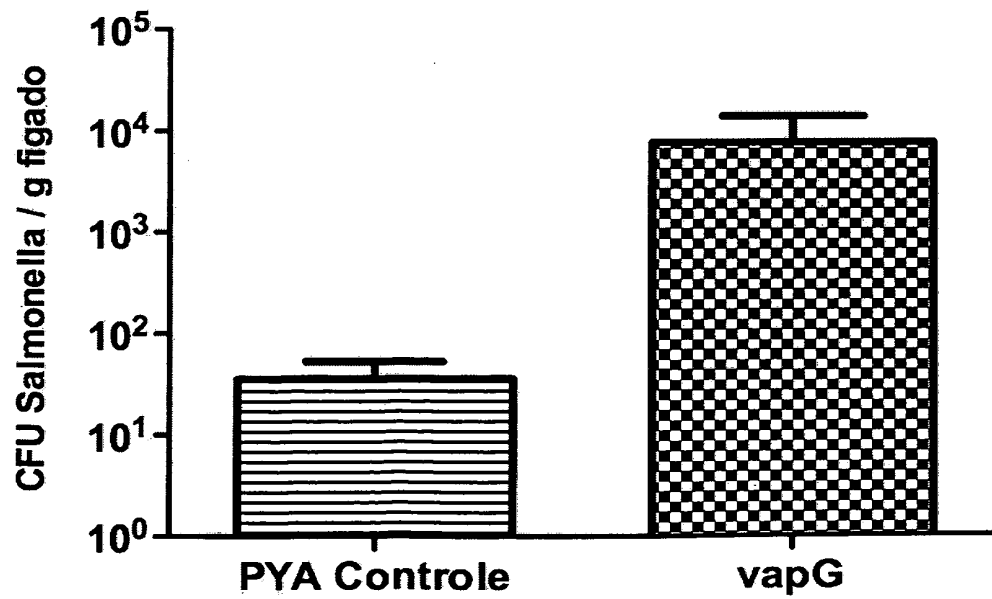
FIGURA 3a**FIGURA 3b**

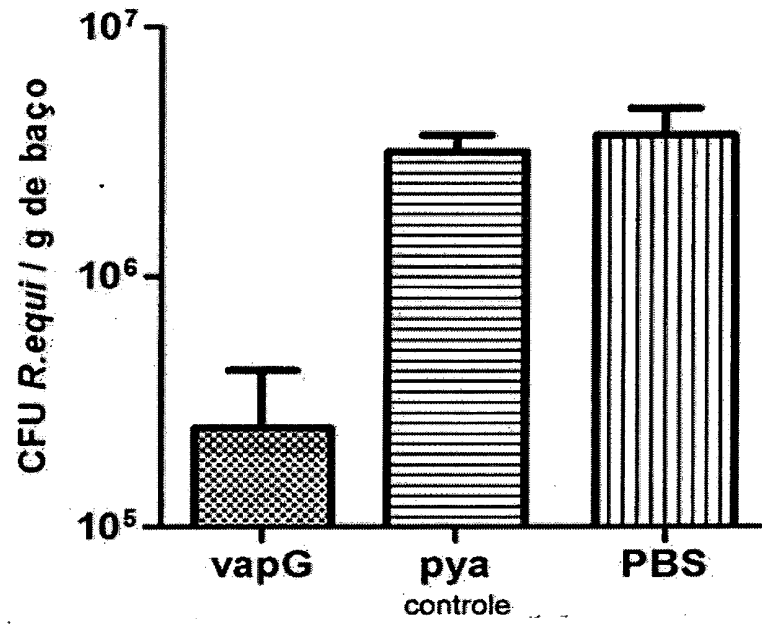
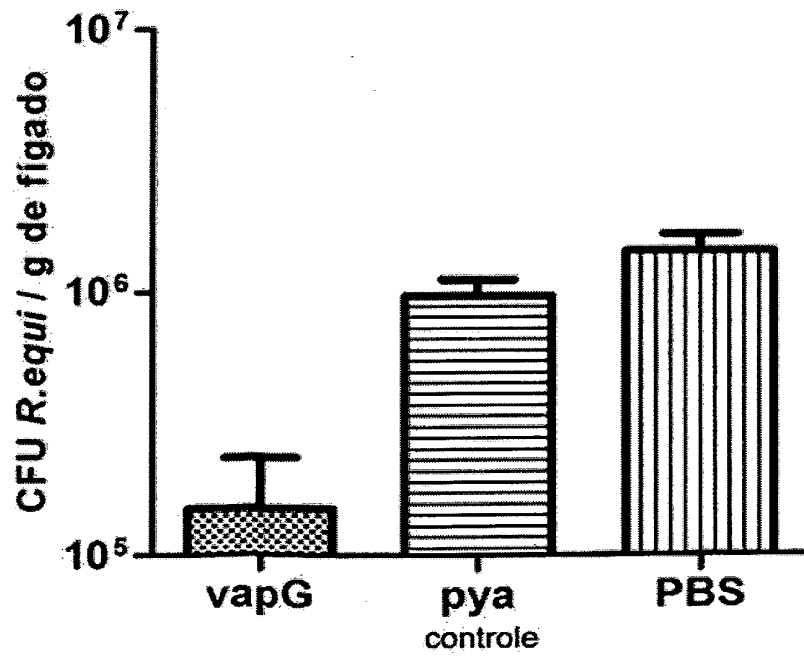
FIGURA 4a**FIGURA 4b**

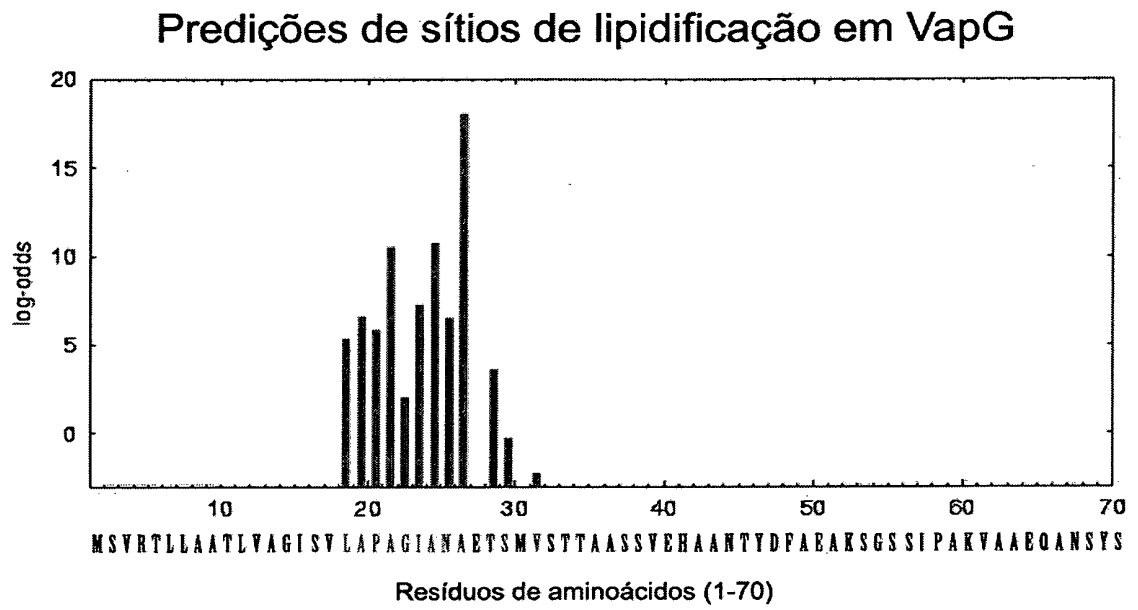
FIGURA 5

FIGURA 6

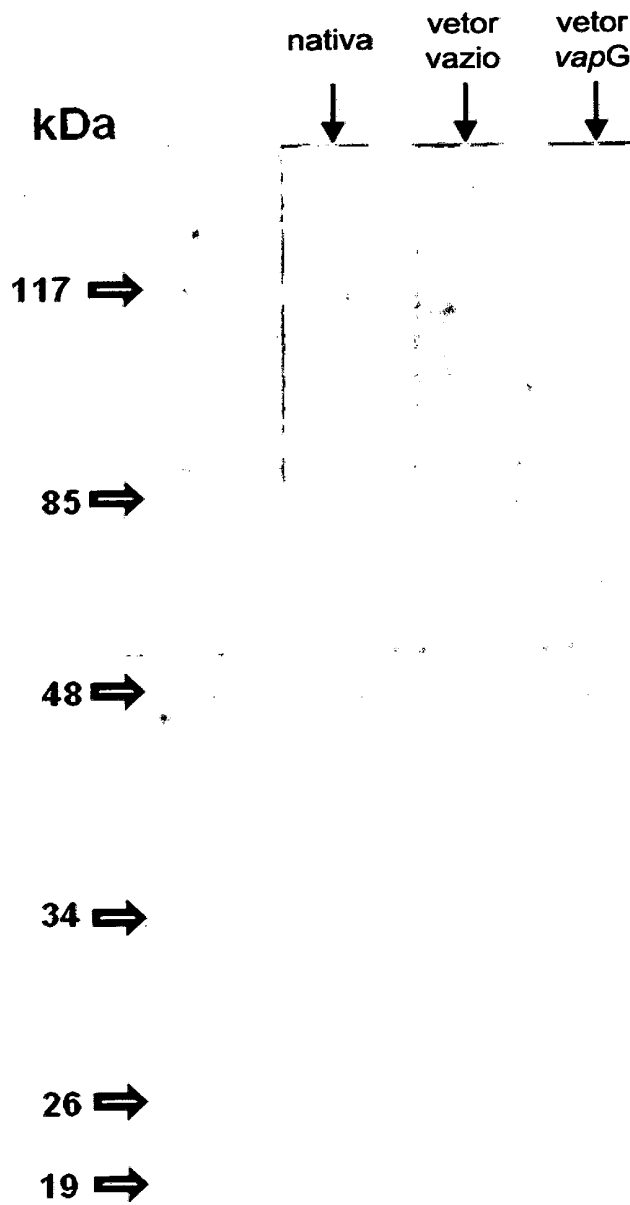
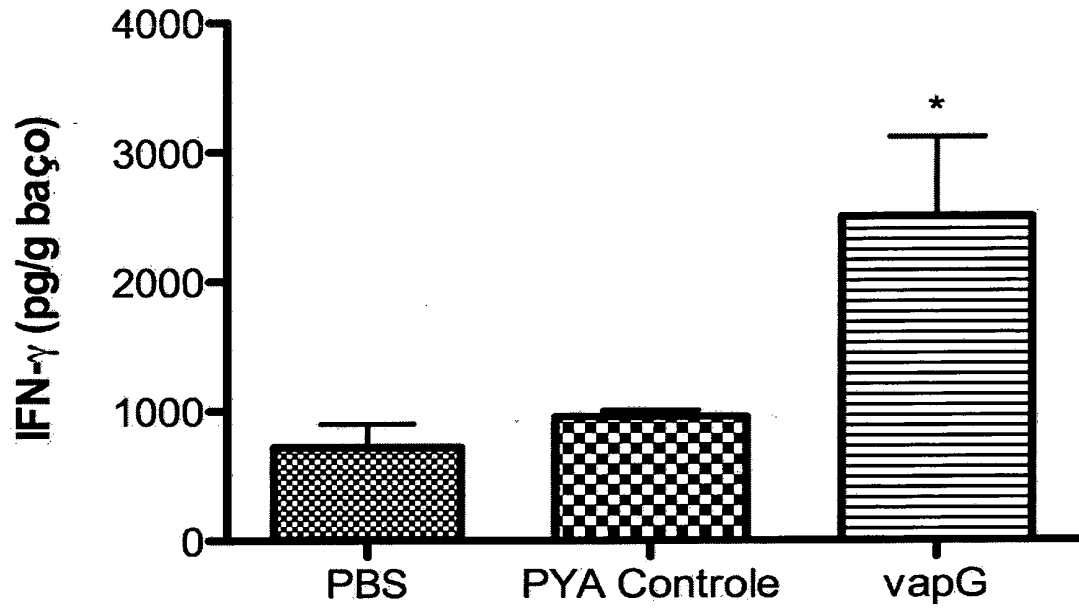


FIGURA 7

RESUMO

**“MICROORGANISMOS RECOMBINANTES, MÉTODOS DE
PREPARAÇÃO DE LINHAGENS VACINAIS, ANTÍGENOS,
COMPOSIÇÕES VACINAIS VETORIZADAS, SEUS USOS,
5 ANTICORPOS, KIT DE DIAGNÓSTICO E MÉTODOS DE TRATAMENTO
E/OU PROFILAXIA”**

A presente invenção provê microrganismos vivos recombinantes, tais como, organismos procariotos, em particular, enterobactérias, preferencialmente, *Salmonella enterica*, contendo as
10 SEQ. ID. N°. 1 e SEQ. ID. N°. 2, capazes de expressar lipoproteínas VapG e/ou VapA/VapG (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4), opcionalmente, associadas a outros ativos, métodos de preparação de linhagens vacinais, antígenos (SEQ. ID. N°. 3 e SEQ. ID. N°. 4) e composições vacinais, preferencialmente, vacinas vetorizadas. Adicionalmente, o
15 presente pedido de patente destina-se ao uso dos vetores vacinais no preparo de composições farmacêuticas, em particular, vacinas indicadas para a prevenção e/ou tratamento de infecções por *Rhodococcus equi*, seus anticorpos e/ou anti-soros, kits de diagnósticos e métodos de profilaxia e/ou tratamento de infecções de infecções por *R. equi*.