

TÍTULO: Proteína LemA de *Leptospira* spp. para uso como imunobiológico

Campo da invenção (Setor técnico)

A presente invenção se refere a uma molécula de DNA
5 (ácido desoxirribonucléico) presente no genoma da bactéria
Leptospira sp. que codifica para a proteína LemA. As
futuras invenções referem-se ao uso desta proteína
terapeuticamente, como vacina ou componente de formulações
vacinais, bem como, em seu uso no diagnóstico da infecção,
10 visando, portanto, a prevenção e/ou tratamento da infecção
causada por *Leptospira* spp. em humanos e animais.

Fundamentos para a invenção e estado da técnica

A leptospirose é uma zoonose causada por espécies
15 patogênicas de *Leptospira* spp. que afeta diferentes
espécies animais. Espiroquetas são bactérias móveis e
helicoidais, pertencentes à ordem Spirochaetales, que se
subdivide em duas famílias. A família *Leptospiraceae* que
compreende os gêneros *Leptonema*, *Turneria* e *Leptospira* e a
20 família *Spirochaetacea* que inclui os gêneros *Borrelia* e
Treponema (20). O gênero *Leptospira* é compreendido pelas
espécies *L. biflexa* (saprófitas), composta por 60 sorovares
e *L. interrogans* (patogênicas), composta por mais de 260
sorovares (20,31). Esta diversidade antigênica de sorovares
25 tem sido atribuída à composição do lipopolissacarídeo (LPS)
da parede celular destas espiroquetas, sendo um componente
importante em estudos epidemiológicos devido ao amplo grau
de variação antigênica (13).

A globalização e as desigualdades sociais produzem
30 padrões epidemiológicos divergentes para a leptospirose

(34,43). Considerada uma doença re-emergente de alta ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, que apresentam condições precárias de saneamento (9). É também associada a atividades ocupacionais, recreacionais, esportivas ou a desastres naturais (18) e apresenta uma taxa global estimada de 500.000 casos por ano, segundo WHO, *Leptospirosis worldwide*, 1999. *Wkly Epidemiol Rec* 1999; 74:237-242. No Brasil e demais países em desenvolvimento, associada a condições de pobreza e higiênico-sanitárias precárias, a leptospirose tem desencadeado epidemias com altas taxas de mortalidade (26).

O ciclo de transmissão da leptospirose envolve a interação entre reservatórios animais, um ambiente favorável e grupos humanos susceptíveis. Os fatores de risco associados à infecção dependem, portanto, de características da organização espacial dos ecossistemas e das condições de vida e trabalho da população (36). O homem pode infectar-se através do contato direto ou indireto com urina de animais domésticos ou silvestres, reservatórios de leptospirosas patogênicas e, embora haja um amplo espectro de espécies animais que servem de reservatório, os roedores destacam-se (10,27,31). A urina destes animais é a principal fonte de disseminação, já que as leptospirosas concentram-se nos túbulos contorcidos proximais dos rins (11). Concentrações significantes de bactérias ($>10^6$ cél.mL⁻¹) tem sido detectadas na urina de animais infectados, que podem permanecer assintomático e continuar a eliminar leptospirosas na urina ao longo de toda vida (42).

A infecção desencadeia uma série de sinais clínicos, sendo em sua fase inicial sugestiva de influenza, malária

ou dengue, necessitando de um diagnóstico diferencial efetivo em áreas com epidemia ou alta incidência destas doenças (19). Em sua forma aguda, a leptospirose pode afetar múltiplos órgãos, incluindo o fígado (icterícia), rins (nefrite), pulmões (hemorragia pulmonar) e cérebro (meningite), com taxas de mortalidade de 10-15%, associadas à doença de *Weil*, chegando a 70%, nos casos de síndrome hemorrágica pulmonar grave (20,21,45). Nestes casos graves, mesmo com estratégias de intervenção agressivas, as taxas de mortalidade permanecem altas. A expressão gênica aumentada de efetores imunes pró e antiinflamatórios, induzidos por uma grande carga infectante de leptospirosas patogências parece ser a causa de quadros de leptospirose severa (50).

Além de sua importância em saúde pública, a leptospirose causa impacto econômico para a agropecuária, com alta mortalidade nos rebanhos, abortos, natimortos, infertilidade e redução na produção de leite, além de ser causa freqüente de morte de animais domésticos (11). Esses problemas resultam em graves prejuízos para os produtores e, conseqüentemente, para a economia dos países acometidos, pois causam transtornos produtivos e reprodutivos nos animais (20). Em animais domésticos, como cães, suínos e vacas, há uma grande variedade de sintomas e complicações. As infecções tendem a ser crônicas e resultam na eliminação de leptospirosas no meio ambiente e conseqüente transmissão para seres humanos (2).

Medidas profiláticas são imprescindíveis no controle da leptospirose e, neste sentido, a quimioprofilaxia é empregada na pré-exposição à ambientes de risco e se faz

pelo emprego oral de doxiciclina em doses semanais de 200 mg, ministradas enquanto durar o risco. A eficácia em reduzir a incidência alcança 95%. A profilaxia pós-exposição, se faz pelo emprego de 100 mg de doxiciclina a cada 12 horas, durante cinco as sete dias (32). Quando há contaminação e desenvolvimento da infecção o tratamento contra a leptospirose se dá pela administração de antibióticos e, em seres humanos, está restrito a penicilina, ampicilina, amoxicilina, oxitetraciclina e doxiciclina. O efeito dos antibióticos é mais evidente na supressão da leptospirúria e a antibioticoterapia com penicilina e doxiciclina, reduzindo a duração e a gravidade dos sintomas, mas a sua influência na mortalidade é controversa (31).

Atualmente os estudos em leptospirose têm focado no desenvolvimento de insumos mais eficazes para diagnóstico precoce, controle e/ou prevenção desta enfermidade. O diagnóstico laboratorial confirmatório requer o isolamento do agente etiológico através de cultura. O teste sorológico padrão "microscopic agglutination test" (MAT) costuma ser utilizado para confirmação do diagnóstico, com soros coletados durante a fase aguda e convalescente da doença (20,31). O MAT consiste na reação de antígenos presentes na superfície de *Leptospira* com os anticorpos presentes no soro do paciente, sendo a reação positiva visualizada em microscopia de campo escuro. O MAT é tipicamente sorovar específico e pode ser utilizado na caracterização do perfil epidemiológico da infecção. Além disso, diluições de soro podem ser usadas para determinar o título de anticorpos. Embora o MAT seja considerado o teste padrão para

diagnóstico, ele apresenta alguns problemas como; a necessidade de amostras pareadas de soro, devido a sua baixa sensibilidade e necessidade de laboratórios referência para sua realização (20,31). Testes adicionais, como reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste na amplificação de fragmentos de DNA específicos e *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA), baseado na célula inteira, ou em proteínas recombinantes, como tem sido demonstrado em estudos recentes, estão sendo utilizados como alternativa. No entanto, o MAT ainda é requerido para confirmação do caso.

Sendo considerado um problema de saúde pública, somado as perdas econômicas no setor agropecuário, o uso de vacinas contra a leptospirose se justifica em populações de risco. Ainda não existem vacinas efetivas para uso humano, embora existam ensaios em fase pré-clínica e clínica neste sentido. Em Cuba, foram vacinadas mais de 10.000 pessoas com uma bacterina, obtendo-se 78% de proteção (33). Já na China, o protótipo de vacina testado em humanos não protegeu crianças menores de 14 anos (53). As vacinas em desenvolvimento para uso humano, assim como as disponíveis para uso animal, e que se baseiam na célula inteira inativada de isolados locais, caracterizam-se por induzir imunidade baixa e de curta duração, além de sorovar específica, pois induzem anticorpos contra o lipopolissacarídeo (LPS) destas bactérias, requerendo imunizações anuais (4,27,40,49). Estas vacinas em alguns casos podem prevenir o desenvolvimento da doença, mas não a leptospirose (3). Existem mais de 270 sorovares patogênicos de *Leptospira* spp. e esta diversidade

antigênica tem sido atribuída a composição do LPS (13). Estas limitações dificultam a obtenção de uma vacina multivalente efetiva.

Dentre as leptospirosas patogênicas que tiveram seu
5 genoma seqüenciado, *L. interrogans* contém cerca de 3530 prováveis seqüências codificadoras (CDS) no sorovar Copenhageni e 3613 no sorovar Lai, enquanto *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo apresenta 2909 e 2949 CDS para os isolados L550 e JB197, respectivamente (14). A
10 análise da seqüência genômica dos isolados de *Leptospira* seqüenciados tem possibilitado a identificação de novos alvos candidatos ao desenvolvimento da vacina ou de novos testes para diagnóstico. Atualmente, estudos celulares e moleculares destes antígenos têm focado em fatores de
15 móbilidade bacteriana, LPS, proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins*_OMPs) e fatores de virulência (51). Dentre eles, nosso grupo de pesquisa tem avaliado o potencial de OMPs, como a lipoproteína LipL32 (46) e as *Leptospiral immunoglobulin-like proteins* (Lig) (48).

20 Dentre as vacinas recombinantes existentes: (i) vacinas de subunidade, (ii) vacinas de DNA e (iii) vacinas vetorizadas, as de subunidade recombinante apresentam a clara vantagem de serem licenciadas pelos órgãos de regulamentação competentes (17), apresentarem pouco ou
25 nenhum efeito colateral e não apresentam risco do desenvolvimento da doença, no entanto, a resposta imune gerada por estas vacinas é principalmente humoral (28). Vacinas de DNA também não apresentam risco de causar a doença e tem a vantagem de possibilitar a indução de ambos
30 os tipos de imunidade protetora, humoral e celular (6). Já

as vacinas vetorizadas, como por exemplo, a utilização de *Mycobacterium bovis* BCG como vetor, oferece uma série de vantagens, tais como: é a vacina mais usada no mundo, pode ser administrada em dose única após o nascimento, não sendo
5 afetada pelos anticorpos maternos, é um importante adjuvante em experimentos animais, pode ser administrada via oral, é a vacina viva mais estável ao calor, seu custo de produção é baixo e induz tanto imunidade humoral quanto celular (7,38). Apesar de representar um importante avanço
10 tecnológico, o sucesso de muitas destas vacinas depende de sua associação com adjuvantes potentes, com o objetivo de aumentar sua imunogenicidade (29). O que se busca, portanto, é uma vacina que confira tanto uma resposta imune humoral quanto celular efetiva e, além disso, estabelecer
15 uma correlação entre os perfis Th1 e Th2 para melhor entendimento dos mecanismos de imunidade anti-*Leptospira*.

Nestas últimas décadas, o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas de Imunologia e Biologia Molecular, lançou base para avanços na tecnologia de
20 produção de vacinas, o que permitiu a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como, para o desenvolvimento de novas maneiras de administrar e apresentar esses antígenos às células do sistema imune (1). Atualmente, o maior foco no
25 desenvolvimento de vacinas de nova geração contra a leptospirose são as proteínas de membrana externa (OMPs), em sua forma inteira ou truncada, que induzam uma proteção cruzada entre sorovares patogênicos (8). Várias OMPs tem sido identificadas como potenciais candidatas à vacina,
30 sendo avaliadas em modelos animais, elas incluem;

LigA (39,48), LigB (52), Lp1454, Lp1118, Lp0607 (16), OmpL1, LipL41 (23), LipL32 (12,47), LIC12730, LIC10494 and LIC12922 (5). A OM de *Leptospira* spp. contém componentes abundantes, como lipoproteínas, preditas por análise de
 5 seqüenciamento genômico (14,37), algumas das quais são únicas deste patógeno (41). Podemos citar como exemplo a proteína OspA de *Borrelia burgdorferi*, Tpp47 de *Treponema pallidum* e LipL32 nas *Leptospira* spp. patogênicas (15,22,24).

10

Descrição da abordagem do problema técnico e vantagens

Neste contexto, os eventos descritos a seguir, apresentam a invenção baseada em uma lipoproteína hipotética de *Leptospira* spp., denominada LemA (LIC11058),
 15 que tem como objetivo explorar seu potencial terapêutico para uso como vacina e/ou diagnóstico no controle da leptospirose humana e animal.

Breve descrição das ilustrações

20 Para um melhor entendimento da presente invenção, seguem em anexo as seguintes figuras:

A Figura 1 representa a SEQ 1: seqüência de nucleotídeos do gene *lemA* disponível no genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni;

25 A Figura 2 representa a SEQ 2: seqüência de aminoácidos codificada pelo gene *lemA* disponível no genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni;

A Figura 3 representa a SEQ 3: seqüência de nucleotídeos do gene *lemA* truncado, ou seja, as regiões
 30 muito hidrofóbicas e as que codificam para o peptídeo sinal

e lipobox foram retiradas (destacado em negrito);

A Figura 4 representa a SEQ 4: seqüência de aminoácidos da proteína LemA truncada, ou seja, as regiões muito hidrofóbicas e as que codificam para o peptídeo sinal e lipobox foram retiradas (destacado em negrito), conforme SEQ 3;

A Figura 5 ilustra a distribuição do gene *lemA* (~ 400 bp) entre sorovares patogênicos de *Leptospira* spp. Os DNAs genômico de *L. interrogans* (sorovar Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Djasiman, Hebdomadis Icterohaemorrhagiae, Muenchen e Pomona), *L. borgpetersenii* (sorovar Ballum, Castellonis, Javanica, Mini, Poi e Sejroe), *L. kirshneri* (sorovar Cynopteri e Grippotyphosa) e *L. santarosai* (sorovar Pomona) foram submetidos a análises de PCR com oligonucleotídeos específicos, desenhados de acordo com o genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A amplificação do gene que codifica para 16S rRNA (~1.500 pb) foi utilizado para demonstrar a integridade dos DNAs genômicos. Nenhum DNA genômico foi adicionado na reação do controle negativo.

A Figura 6 é a representação gráfica do vetor de clonagem e expressão, pQE30, utilizado para produção da proteína LemA recombinante em sistema heterólogo baseado em *Escherichia coli*;

A Figura 7 demonstra a expressão da proteína LemA (~17,0 kDa) em culturas transformantes de *E. coli* TOP10F por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% corado com Comassie Blue. Coluna 1, Padrão de Massa Molecular; coluna 2, LemA i (induzido); coluna 3, LemA n.i (não induzido).

A Figura 8 representa um *Western blotting* com anticorpo

Monoclonal anti-cauda de poli-histidina conjugado com peroxidase. As bandas foram reveladas com 3,3-diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (DAB/H₂O₂). Coluna 1, Marcador SeeBlue® Plus Pre-Stained Standard 1x; 5 coluna 2, LemA (~17,0 kDa) e coluna 10, controle positivo LipL32 (32,0 kDa).

A Figura 9 mostra um SDS-PAGE 15% corado com Comassie Blue onde LemA foi expressa em *E. coli* e purificada através de cromatografia de afinidade, utilizando colunas Ni² 10 Sepharose HisTrap. Colunas 1 - 6: LemA (~17,0 kDa) purificada.

A Figura 10 demonstra a resposta imune humoral de anticorpos IgG específicos, presentes no soro de camundongos inoculados com LemA recombinante (100 µg) em 15 duas doses, com intervalo de 21 dias. A determinação destes anticorpos foi realizada através de ELISA utilizando 400 ng da referida proteína. Grupo controle negativo composto por camundongos imunizados com solução salina e 15% de hidróxido de alumínio. A medida das respostas imunes está 20 expressa com base na média das absorbâncias de todos os animais do grupo. **P* < 0,05 em comparação ao grupo controle.

A Figura 11 demonstra a antigenicidade da proteína LemA reagindo com *pool* soro de pacientes com leptospirose severa 25 (A) e *pool* de soro negativo para *Leptospira* spp. (B), através de um *Western blotting*. Coluna 1, Marcador SeeBlue® Plus Pre-Stained Standard 1x; 2, LemA (~17,0 kDa); 3, LipL32 (32,0 kDa). (C) SDS-PAGE demonstrando as proteínas utilizadas nos WB.

30 A Figura 12 é a representação gráfica do vetor de

clonagem e expressão em eucariotos, pTARGET, utilizado para produção da vacina de DNA expressando LemA;

A Figura 13 ilustra a expressão de LemA (~17,0 kDa) em células VERO transfectadas com a vacina de DNA (pTARGET/*lemA*), através de *Western blotting* com soro anti-LemA. Coluna 1, pellet de células transfectadas com o vetor pTARGET vazio; coluna 2, pellet de células transfectadas com pTARGET/*lemA*.

A Figura 14 demonstra os anticorpos IgG específicos induzidos em hamsters inoculados com LemA na forma de vacinas de subunidade (100 µg), vacina de DNA com o vetor recombinante pTARGET/*lemA* (100 µg) ou DNA *prime* (uma dose de vacina de DNA mais um *boost* de proteína recombinante) (100 µg). Todas as vacinas foram aplicadas em duas doses com intervalo de 21 dias. A proteína LemA recombinante (50 ng) expressa em *E. coli* foi usada como antígeno no ELISA e os resultados se encontram expressos baseados na média das absorbâncias de todos os animais. * $P < 0,05$ em comparação aos grupos controles.

A Figura 15 mostra a percentagem de sobrevivência e a sobrevivência de hamsters inoculados com LemA na forma de vacinas de subunidade (100 µg), vacina de DNA com o vetor recombinante pTARGET/*lemA* (100 µg) ou DNA *prime* (uma dose de vacina de DNA mais um *boost* de proteína recombinante) (100 µg), ambas as vacinas aplicadas em duas doses com intervalo de 21 dias e os animais desafiados com cepa virulenta de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (10 leptospiras, que equivale a 5x DL₅₀). O teste Wilcoxon Log-rank foi usado para determinar diferenças significativas entre os grupos imunizados e os grupos controles (* $P < 0,05$).

Descrição da invenção

Por conveniência o significado de alguns termos empregados nas especificações estão descritos abaixo.

5 LemA (epítipo M3 de *Listeria*) - é uma lipoproteína hipotética de *Leptospira* spp. cujos membros da família possuem hélice transmembrana com a porção amino-terminal extracelular. Sua subsequente degradação revela um epítipo semelhante ao presente na superfície dos fagócitos (30). A exata função celular desta proteína ainda não foi
10 elucidada.

lemA - refere-se a sequência de nucleotídeos que codificam para a proteína LemA.

LIC11058 - nomenclatura genômica de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, LIC. LIC11058 refere-se ao antígeno de
15 interesse desta invenção (LemA).

Na presente invenção a identificação do antígeno foi baseada na análise *in silico* de antígenos candidatos à vacina recombinante contra a leptospirose. Assim, genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni que codificam
20 lipoproteínas, foram selecionados no banco de dados GenBank e avaliados com ferramentas de bioinformática. O programa DOLOP (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/>) foi utilizado para prever quais sequências presentes no genoma codificam lipoproteínas e se estas são homólogas a
25 proteínas de superfícies previamente caracterizadas em outros organismos. O programa PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) foi utilizado para avaliar a localização das proteínas na bactéria. O programa Vector

NTI 8.0 (Informax inc.) serviu como ferramenta na identificação de regiões hidrofóbicas da proteína e também de sua sequência sinai. A presença de domínios transmembrana na proteína alvo foi avaliada através do

5 programa TMHMM Server v.2.0
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>).

O gene *lemA* (LIC11058) possui uma sequência de quinhentos e noventa e sete (597) nucleotídeos (SEQ 1 - Fig. 1) que codificam para cento e noventa e nove (199)

10 aminoácidos (SEQ 2 - Fig. 2), os quais originam uma proteína com massa molecular de cerca de 23,8 kDa, denominada LemA.

Para clonagem e expressão deste gene em um sistema procarioto de produção de proteínas heterólogas, as regiões

15 do peptídeo sinal e lipobox foram excluídas, devido ao caráter hidrofóbico dos aminoácidos desta porção. Portanto, o gene clonado é constituído de quatrocentos e sete (407) nucleotídeos (SEQ 3 - Fig. 3), correspondendo a cento e trinta e cinco (135) aminoácidos (SEQ 4 - Fig. 4), que

20 constituem uma proteína com massa molecular de cerca de 14,6 kDa.

Com base na sequência de nucleotídeos do gene *lemA* (SEQ 3) seguiram os processos de clonagem, expressão, purificação e avaliação do potencial como imunobiológico

25 deste antígeno, segundo os procedimentos a seguir:

Passo 1: DNA genômico de *L. interrogans* (sorovares Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Djasiman, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Muenchen e Pomona), *L. borgpetersenii* (sorovares Ballum, Castellonis, Javanica,

30 Mini, Poi e Sejroe), *L. kirshneri* (sorovares Cynopteri e

Grippotyphosa) e *L. santarosai* (sorovares Pomona) foram extraídos usando GFX Genomic DNA purification kit (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante para bactérias Gram-negativas. O DNA extraído foi analisado

5 através de eletroforese em tampão 1x tris-borato-EDTA (TBE) (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA), utilizando gel de agarose 1% (6 g de agarose, 60 mL de 1x TBE), a uma voltagem de 100 V, e este corado com GelRed™ (Invitrogen), com intuito de avaliar sua qualidade e

10 integridade, sendo, após, estocado a -20°C. Os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando oligonucleotídeos iniciadores desenhados de acordo com o genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (GenBank: AE016823), originalmente isolada de um paciente com leptospirose

15 severa (26): lemA_F: 5'- cgGGATCCATTCAAGAAGAAGATGAG - 3', lemA_R: 5'- cccAAGCTTCGAATTGTAACGTTGGTAT - 3'. O gene 16S foi amplificado usando os oligonucleotídeos fd1_F: 5' - CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' e rp2_R: 5' - CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT - 3' (35). As reações

20 de PCR foram realizadas de acordo com as seguintes condições: 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 sec, 50 °C por 30 sec e 72 °C por 30 sec, com uma extensão final de 72 °C por 7 min. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 2.5 µl de

25 tampão 10 ×, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 150 nM de cada oligonucleotídeo, 0,5 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 0,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 18 µl de água Milli-Q e 2 µl (50 ng) de DNA genômico, em termociclador Mastercycler (Eppendorf). O produto das

30 amplificações foi visualizado através de eletroforese em

gel de agarose 1%, conforme descrito acima. Estes resultados podem ser observados na Figura 5.

Passo 2: A sequência genômica de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA_GeneBank: AE016823) foi utilizada no desenho dos *primers* para amplificação do gene *lemA* (AAS69665). Os *primers* utilizados foram: *lemApQE_F* 5'-cgGGATCCATTCAAGAAGAAGATGAG, *lemApQE_R* 5' -cccAAGCTTCGAATTGTAACGTTGTATT, *lemApTARGET_F*: 5'-atgATTCAAGAAGAAGATGA e *lemApTARGET_R*: 5'-gggAAGCTTAATTGTAACGTTGTA, estando destacada na sequência o sítio das enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi empregada para amplificação do gene alvo (*lemA*) sob as seguintes condições: 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 sec, 50 °C por 30 sec e 72 °C por 30 sec, com uma extensão final de 72 °C por 7 min. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 2,5 µl de tampão 10x, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 150 nM de cada *primer*, 0,5 µl de Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 0,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 18 µl de água Milli-Q e 2 µl (50 ng) de DNA genômico. O produto da amplificação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão 1x TBE, a uma voltagem de 100 V e corado com GelRed™ (Invitrogen).

Passo 3: A clonagem dos genes foi realizada conforme descrito por Sambrook e Russell (44), com algumas modificações. O fragmento amplificado por PCR foi clonado no vetor pQE30 (Qiagen), que possui as seguintes características: origem de replicação em *Escherichia coli*, sítio de múltipla clonagem, gene de resistência ao

antibiótico ampicilina, operador *lac* e promotor do fago T5, que é reconhecido pela RNA polimerase de *E. coli*. Além disso, esse vetor permite a expressão das proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de seis resíduos de histidinas em sua porção amino-terminal. Uma representação gráfica deste vetor pode ser observada na Figura 6. O gene amplificado por PCR foi checado em gel de agarose 1% e purificado utilizando o GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo orientações do fabricante. Os fragmentos foram digeridos com suas respectivas enzimas de restrição e re-purificados com o mesmo kit. O vetor pQE30 foi digerido com as mesmas enzimas de restrição, desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina (CIP) (Boehringer Mannheim) e purificado com GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Para a reação de ligação foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e concentrações equimolares de inserto e vetor (18 ng de inserto, 6 ng de vetor, 4 µL de tampão 1x, 1 µL de enzima). A reação de ligação foi mantida a 16 °C por 2 h. O produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10F (capacitância de 25 µF, resistência de 200 Ω e voltagem de 2 kV). As células transformadas foram plaqueadas em ágar Luria-Bertani (LB) (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl) acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e incubadas a 37 °C, por 12 - 20 h. As colônias que cresceram nas placas, oriundas do processo de transformação, foram submetidas a uma triagem rápida com fenol-clorofórmio (25). Os clones caracterizados como recombinantes nesta triagem, ou seja, que apresentavam o plasmídeo pQE30 mais o inserto, foram

selecionados e cultivados em 5 mL de meio LB líquido acrescido de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de ampicilina, a 200 rpm de agitação, 37 °C, de 12 - 20 h. Deste cultivo utilizou-se 3 mL para extração de DNA plasmidial com GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare), e o DNA resultante desta extração submetido a digestão com enzimas de restrição para checar a presença e orientação do inserto. O restante do cultivo foi utilizado como inóculo e expandido para 9 mL de LB líquido acrescido de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de ampicilina e a cultura incubada a 37 °C, sob agitação de 200 rpm até atingir a densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) de 0,5 a 0,7. Neste momento, a cultura foi fracionada em duas alíquotas de igual volume (5 mL), sendo uma induzida com 1 mM de isopropil β -D-tiogalactosídeo (IPTG) e a outra servindo de controle negativo (não induzido), ambas incubadas durante 3,5 h, 200 rpm, 37 °C. Ao final do cultivo coletou-se uma alíquota (1 mL) de cada amostra, centrifugou-se 14.000 x g por 1 min e o pellet utilizado para verificar a expressão das proteínas recombinantes, através de uma eletroforese em um gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE 15%) com extrato protéico total de cada clone (Figura 7), como descrito por. A expressão das proteínas recombinantes foi também confirmada através da técnica de *Western blotting* (WB), conforme Sambrook e Russell (44), utilizando anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3.000 (Figura 8), segundo instruções do fabricante.

O vetor construído foi chamado de pQE30/lemA e sequenciado por eletroforese capilar utilizando di-deoxi-nucleotídeos marcados baseado no DYEnamic ET Dye Terminator

Cycle Sequencing Kit para MegaBACE DNA Analysis Systems - MegaBACE 500 (GE Healthcare). Os dados oriundos do seqüenciamento foram compilados e analisados no programa de alinhamento de seqüências ContigExpress (Informax inc.) e
5 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), localizado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Passo 4: No processo de purificação da proteína LemA fusionada a uma cauda de seis histidinas (LemA-His₆), um
10 clone recombinante foi selecionado e inoculado em 50 mL de LB acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina, mantido sob agitação de 200 rpm, por 12 - 20 h a 37 °C. Este volume de inóculo foi expandido para 500 mL de LB líquido acrescido de 100 µg.mL⁻¹. A cultura foi então cultivada em agitador
15 orbital a 200 rpm a 37 °C, até atingir densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) entre 0,5 - 0,7, quando então foi adicionado como indutor da expressão, 1 mM de IPTG e o cultivo mantido sob as mesmas condições por mais 3,5 h. Após o período de incubação a cultura foi centrifugada a 7.000 x g por 20 min
20 a 4 °C. O pellet foi suspenso em um tampão de solubilização (8 M de uréia, 200 mM de NaH₂PO₄, 0,5 M de NaCl e 5 mM de imidazole, pH 8,0) e incubado em agitador orbital a 60 rpm por 18 horas, em temperatura ambiente. As células foram então sonicadas (3 ciclos de 30 s, 20 kHz),
25 centrifugadas (10.000 x g por 60 min a 4 °C) e o sobrenadante coletado e filtrado em membrana de 0,8 µm (Millipore). A proteína LemA foi purificada através de cromatografia de afinidade utilizando colunas Ni² Sepharose HisTrap, sendo a proteína eluída da coluna com 200 mM de
30 imidazole. A fração contendo a proteína eluída foi

identificada através de SDS-PAGE 15%. A Figura 9 representa a purificação da proteína LemA. As alíquotas coletadas contendo a proteína recombinante foram unidas e dialisadas de forma lenta, utilizando-se membrana de celulose para diálise (25 mm x 16 mm) (Sigma). A membrana contendo a proteína foi acondicionada em um kitazato com capacidade para 1 L, contendo 500 mL do tampão utilizado na purificação (8 M de uréia, 200 mM de NaH_2PO_4 , 0,5 M de NaCl, 200 mM de imidazole, pH 8,0). As proteínas foram dialisadas contra 12 L de tampão fosfato salino 1x (PBS), pH 7,4, em sistema de fluxo contínuo, por 92 horas a 4°C, onde cerca de 16 trocas com foram feitas para diluir o tampão 8 M, fazendo com que a concentração de uréia baixasse até zero na amostra. A concentração da proteína purificada foi determinada usando BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA), com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). O rendimento da proteína LemA foi de 42,84 mg.L^{-1} .

Passo 5: A proteína recombinante LemA purificada foi utilizada para inocular camundongos e a resposta imune humoral monitorada através de ELISA (*Enzyme-linked immunossorbent assay*). Camundongos BALB/c (Biotério Central, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil) de 5 a 8 semanas de idade foram imunizados com a proteína recombinante. Utilizou-se 2 grupos com 5 animais cada, um para a vacina de subunidade e 1 para o controle. Cada animal recebeu a proteína LemA em duas doses de 100 μg cada, via intramuscular, com intervalo de 21 dias entre as doses. Utilizou-se neste experimento um grupo controle negativo, onde somente o adjuvante hidróxido de alumínio

[Al(OH)₃] na concentração de 15% em solução salina estéril foi inoculado nos animais. Esta mesma concentração de adjuvante foi utilizada nos animais inoculados com a proteína LemA. As coletas de sangue foram realizadas no dia
5 zero (pré-imune) e a cada 21 dias. O sangue foi coletado a partir do plexo venoso retrocular dos animais, centrifugado a 4.000 x g por 10 min e o soro armazenado a -20 °C.

Na avaliação da resposta imune humoral induzida nos animais imunizados, microplacas de poliestireno de 96
10 cavidades (Polysorp Surface, Nunc) foram sensibilizadas com 400 ng de proteína recombinante LemA, em tampão carbonato bicarbonato pH 9,8, a 4 °C por 12 - 20 h. As placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS acrescido de 0,5% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com caseína 0,25% por 1 h a 37 °C.
15 Após 3 lavagens com PBST (5 min por lavagem), adicionou-se os soros dos animais inoculados com a proteína recombinante e com o controle, na diluição 1:20 em PBST, incubou-se por mais 1 h a 37 °C e, após nova lavagem das placas (3 vezes, 5 min por lavagem), adicionou-se o soro anti-imunoglobulina
20 de camundongo conjugado com peroxidase (DAKO) na diluição 1:2.000 em PBST, incubando por mais 1 h a 37 °C. Após 5 lavagens com PBST (5 min por lavagem) foi adicionado o substrato ELISA-o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma-Aldrich, Brazil) Peroxidase (Sigma), incubou-se por
25 15 min a temperatura ambiente em local escuro e foi feita a leitura da densidade óptica a 492 nm, em leitor de ELISA Multiskan MCC/340 (Titertek). As amostras de soro de cada animal foram avaliadas em triplicata no ELISA. Os resultados referentes a este experimento podem ser
30 observados na Figura 10.

Passo 6: As proteínas recombinantes purificadas e dialisadas foram submetidas a um WB, Sambrook e Russell (44), com pool de soro humano de pacientes com leptospirose. A proteína LemA purificada foi submetida a um SDS-PAGE 15% e eletrotransferida para membrana de nitrocelulose Hybond™ ECL™ (Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com PBST acrescido de 5% de leite em pó desnatado, a 4 °C, 12 - 20 h e, após este período, lavada 3 vezes com PBST e incubada com soro humano de pacientes com leptospirose em fase convalescente, com título no teste de aglutinação microscópica (MAT) de 25.000, na diluição de 1:100, a temperatura ambiente por 1 h. A membrana foi então lavada 3 vezes com PBST e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Calbiochem), na diluição 1:500 em PBST. As bandas foram reveladas com cromógeno H₂O₂/4-cloro-1-naftol (10 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 0,1 mL de cloronaftol e 10 µL de peróxido de hidrogênio). As proteínas também foram testadas contra pool de soro humano negativo para leptospirose. As condições para o WB nesta análise foram as mesmas descritas acima. A diluição do soro negativo foi de 1:100. Os resultados podem ser observados na Figura 11.

Passo 7: Na construção da vacina de DNA o plasmídeo utilizado para imunização com ácido nucléico foi pTARGET™ expression vector (Promega, USA), que tem como características a resistência ao antibiótico ampicilina e o promotor do citomegalovírus, que permite a expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos. Uma imagem representativa deste vetor pode ser visualizada na Figura

12. O gene *lemA* foi amplificado através de PCR e clonado neste vetor, sob as mesmas condições já descritas. Células de *E. coli* TOP10 eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante e cultivadas em LB líquido
5 contendo $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina, sob agitação (200 rpm), por 12 - 20 h a 37°C . O vetor originário foi nomeado pTARGET/*lemA*, sendo checado através de digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento de DNA, conforme já descrito. A produção e purificação do DNA plasmidial foi feito
10 utilizando Perfectprep® Plasmid Maxi kit (Eppendorf), segundo instruções do fabricante. O DNA foi finalmente suspenso em tampão PBS 1x na concentração de 1 mg mL^{-1} , a qual foi determinada através do Qubit™ Fluorometer (Invitrogen).

15 Para confirmar que a construção pTARGET/*lemA* foi funcional e expressou a proteína de interesse, células VERO foram transfectadas com este plasmídeo e com ele também vazio (controle), utilizando como transfectante a Lipofectamina (Invitrogen), segundo instruções do
20 fabricante. Assim, células VERO foram mantidas em frascos com meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) suplementado com 100 IU.mL^{-1} de penicilina, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina e 10% (v/v) soro fetal bovino inativado pelo calor. Quando 60 - 75% de confluência foi observada, as células foram
25 transfectadas com 15 μg de pTARGET/*lemA* ou pTARGET vazio, pré-homogenizados com Lipofectamina em DMEM sem soro. Quarenta e oito horas após a transfecção as células foram removidas da placa, lavadas com PBS 1x, suspensas em meio DMEM e analisadas quanto a expressão da proteína LemA. As
30 células transfectadas foram suspensas em um tampão de

lise (PBS contendo 4% (v/v) NP-40) e colocadas em banho de gelo por 30 min. Os lisados foram avaliados através de WB, conforme Sambrook e Russell (44), onde as amostras foram submetidas a um SDS-PAGE 15% e eletrotransferida para
5 membrana de nitroceluse Hybond™ ECL™ (Amersham Biosciences). Após bloqueio em PBS com 5% de leite em pó desnatado, 12 - 20 h a 4°C e três lavagens (5 min por lavagem) em PBST, a membrana foi incubada por 1 h com soro anti-LemA (1:100 em PBS), seguido por 3 lavagens (5 min por
10 lavagem) em PBST. Anticorpos IgG anti-mouse conjugados com peroxidase (Sigma), na diluição de 1:6.000 em PBS, foram adicionados e a membrana incubada por 1 h. Esta foi então lavada 5x em PBST e a reação revelada com ECL™ WB Detection Reagents (GE Healthcare). A expressão da proteína
15 LemA pelas células VERO transfectadas com a construção pTARGET/lemA pode ser observada na Figura 13.

Passo 8: O potencial de imunoproteção da proteína LemA sob as formas de vacina de subunidade recombinante e vacina de DNA foi avaliado em hamsters. Para tanto, fêmeas de 4 - 6
20 semanas de idade foram divididas em 5 grupos de 8 animais cada, com alimento e água *ad libitum*. Os animais foram imunizados com a proteína recombinante LemA (100 µg) ou pTARGET/lemA (100 µg) através da via intramuscular. A vacina de subunidade foi inoculada juntamente com 15% do
25 adjuvante Al(OH)₃. As estratégias de imunização foram: pTARGET/lemA + rLemA (DNA + boost de proteína), pTARGET/lemA + pTARGET/lemA (DNA + DNA) e LemA + LemA (proteína + proteína). As vacinas foram administradas em duas doses com 21 dias de intervalo. Amostras de sangue
30 foram coletadas pelo plexo retro-ocular antes de cada

imunização e também do desafio, sendo o soro coletado como descrito anteriormente e estocado a -20°C . Quarenta e dois dias após a primeira dose todos os animais foram desafiados intraperitonealmente com uma dose de 10^1 leptospiras, que equivale a $5 \times \text{DL}_{50}$ de *L. interrogans* serovar Copenhageni. Os grupos controle negativo foram inoculados com PBS + 15% de $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou com o plasmídeo pTARGET vazio (100 μg), já o grupo controle positivo foi imunizado com 10^9 células de leptospiras inativadas pelo calor, preparadas conforme descrito (46). Os hamsters foram monitorados diariamente para sinais clínicos de leptospirose e eutanasiados quando sinais de doença terminal aparecessem.

A resposta imune humoral composta por anticorpos IgG nos hamsters imunizados foi avaliada através de ELISA. Para isso, placas de ELISA (Polysorp Surface, Nunc) foram sensibilizadas overnight a 4°C com 50 ng por poço da proteína recombinante LemA, diluída em tampão carbonato bicarbonato, pH 9,6. As placas foram lavadas 3 vezes com PBST (5 min por lavagem) e incubadas com 200 μl de PBST com 5% de leite em pó desnatado, a 37°C por 1 h. O soro dos animais imunizados com as vacinas recombinantes e com os controles foi adicionado na diluição de 1:50 e as placas incubadas a 37°C por 1 h, seguido de três lavagens (5 min por lavagem) com PBST. Anticorpos anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase, na diluição de 1:8.000 (Serotec, USA) foram adicionados e as placas incubadas a 37°C por 1 h, lavadas 5 vezes com PBST e a reação detectada com OPD (Sigma-Aldrich, Brazil) e peróxido de hidrogênio. As reações foram paradas através da adição de 0.1 M de ácido sulfúrico e as absorbâncias determinadas a 492 nm com

leitor Multiskan MCC/340 ELISA (Titertek Instruments, USA). As amostras de soro foram avaliadas em triplicate no ELISA. Os dados referentes a esta análise estão representados na Figura 14.

5 **Passo 9:** Os hamsters que sobreviveram até 34 dias após o desafio (Figura 15) foram eutanasiados para avaliação histopatológica de rim e pulmão e de capacidade esterilizante das vacinas, através de cultura a partir de tecido renal. Neste caso, para cada órgão, cerca de 1 - 2 g
10 de tecido foi coletado assépticamente, macerado e transferido para 5 mL de meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) suplementado com *Leptospira* Enrichment EMJH (Difco, USA), sendo as culturas mantidas a 30 °C. Durante oito semanas as culturas foram observadas
15 através de microscopia de campo escuro, para identificar crescimento de leptospiros. Para os estudos de histopatologia, as amostras de tecido de rim e pulmão foram fixadas em 10% de formalina (pH 7.0) e embebidas em parafina. Seis cortes de 5 - 6 µm dos órgãos foram corados
20 com hematoxilina e eosina e examinadas por patologista qualificado com intuito de identificar evidências de nefrite intersticial e hemorragia pulmonar. Como resultados destas avaliações, foi constatado que as vacinas não conferiram imunidade esterilizante, assim como, 100% dos
25 animais sobreviventes apresentaram hemorragia pulmonar e de 40 - 100 % algum tipo de lesão renal.

Referências

1. Ada, G. and I. Ramshaw. 2003. DNA vaccination. *Expert.Opin.Emerg.Drugs* 8:27-35.
- 5 2. Adler, B. and M. A. de la Pena. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet.Microbiol.* 140:287-296. doi:S0378-1135(09)00116-3 [pii];10.1016/j.vetmic.2009.03.012 [doi].
- 10 3. Alt, D. P., R. L. Zuerner, and C. A. Bolin. 2001. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219:636-639.
- 15 4. Andre-Fontaine, G., C. Branger, A. W. Gray, and H. L. Klaasen. 2003. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet.Rec.* 153:165-169.
- 20 5. Atzingen, M. V., A. P. Goncales, Z. M. de Moraes, E. R. Araujo, B. T. De, S. A. Vasconcellos, and A. L. Nascimento. 2010. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. *J.Med.Microbiol.* 59:1005-1015. doi:jmm.0.021485-0 [pii];10.1099/jmm.0.021485-0 [doi].
- 25 6. Babiuk, L. A., S. L. Babiuk, B. I. Loehr, and van Drunnen Littel-van den Hur. 2000. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 76:1-23.
- 30 7. Bastos, R. G., S. Borsuk, F. K. Seixas, and O. A. Dellagostin. 2009. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. Vaccine 27:6495-6503. doi:S0264-410X(09)01220-1

[pii];10.1016/j.vaccine.2009.08.044 [doi].

8. Bethlem, E. P. and C. R. Carvalho. 2000. Pulmonary leptospirosis. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 6:436-441.
- 5 9. Bharadwaj, R. 2004. Leptospirosis--a reemerging disease? *Indian J.Med.Res.* 120:136-138.
- 10 10. Bharti, A. R., J. E. Nally, J. N. Ricaldi, M. A. Matthias, M. M. Diaz, M. A. Lovett, P. N. Levett, R. H. Gilman, M. R. Willig, E. Gotuzzo, and J. M. Vinetz. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect.Dis.* 3:757-771.
- 15 11. Bharti, A. R., J. E. Nally, J. N. Ricaldi, M. A. Matthias, M. M. Diaz, M. A. Lovett, P. N. Levett, R. H. Gilman, M. R. Willig, E. Gotuzzo, and J. M. Vinetz. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases* 3:757-771.
- 20 12. Branger, C., C. Sonrier, B. Chatrenet, B. Klonjowski, N. Ruvoen-Clouet, A. Aubert, G. Andre-Fontaine, and M. Eloit. 2001. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect.Immun.* 69:6831-6838.
13. Bulach, D. M., T. Kalambaheti, A. Pena-Moctezuma, and B. Adler. 2000. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* 2:375-380.
- 25 14. Bulach, D. M., R. L. Zuerner, P. Wilson, T. Seemann, A. McGrath, P. A. Cullen, J. Davis, M. Johnson, E. Kuczek, D. P. Alt, B. Peterson-Burch, R. L. Coppel, J. I. Rood, J. K. Davies, and B. Adler. 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential.
- 30

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 103:14560-14565. doi:0603979103
[pii];10.1073/pnas.0603979103 [doi].

- 5 15. Chamberlain, N. R., J. D. Radolf, P. L. Hsu, S. Sell,
and M. V. Norgard. 1988. Genetic and physicochemical
characterization of the recombinant DNA-derived 47-
kilodalton surface immunogen of *Treponema pallidum*
subsp. *pallidum*. *Infect.Immun.* 56:71-78.
- 10 16. Chang, Y. F., C. S. Chen, R. U. Palaniappan, H. He, S.
P. McDonough, S. C. Barr, W. Yan, S. M. Faisal, M. J.
Pan, and C. F. Chang. 2007. Immunogenicity of the
recombinant leptospiral putative outer membrane
proteins as vaccine candidates. *Vaccine* 25:8190-8197.
doi:S0264-410X(07)01042-0
[pii];10.1016/j.vaccine.2007.09.020 [doi].
- 15 17. Clark, T. G. and D. Cassidy-Hanley. 2005. Recombinant
subunit vaccines: potentials and constraints.
Dev.Biol.(Basel) 121:153-163.
- 20 18. Desai, S., T. U. van, M. Lierz, W. Espelage, L. Zota,
A. Sarbu, M. Czerwinski, M. Sadkowska-Todys, M.
Avdicova, J. Reetz, E. Luge, B. Guerra, K. Nockler,
and A. Jansen. 2009. Resurgence of field fever in a
temperate country: an epidemic of leptospirosis among
seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007.
Clin.Infect.Dis. 48:691-697. doi:10.1086/597036
25 [doi];10.1086/597036 [pii].
- 30 19. Ellis, T., A. Imrie, A. R. Katz, and P. V. Effler.
2008. Underrecognition of leptospirosis during a
dengue fever outbreak in Hawaii, 2001-2002.
Vector.Borne.Zoonotic.Dis. 8:541-547.
doi:10.1089/vbz.2007.0241 [doi].

20. Faine, S. B., Adler, B., Bolin, C., and Perolat, P. *Leptospira* and Leptospirosis. Melbourne: MediSci; 2nd Ed. 1999.

5 Ref Type: Serial (Book, Monograph)

21. Gouveia, E. L., J. Metcalfe, A. L. de Carvalho, T. S. Aires, J. C. Villasboas-Bisneto, A. Queirroz, A. C. Santos, K. Salgado, M. G. Reis, and A. I. Ko. 2008. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 14:505-508.
22. Haake, D. A., G. Chao, R. L. Zuerner, J. K. Barnett, D. Barnett, M. Mazel, J. Matsunaga, P. N. Levett, and C. A. Bolin. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 68:2276-2285.
23. Haake, D. A., M. K. Mazel, A. M. McCoy, F. Milward, G. Chao, J. Matsunaga, and E. A. Wagar. 1999. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect. Immun.* 67:6572-6582.
24. Howe, T. R., L. W. Mayer, and A. G. Barbour. 1985. A single recombinant plasmid expressing two major outer surface proteins of the Lyme disease spirochete. *Science* 227:645-646.
25. Jouglard, S. D., S. Simionatto, F. K. Seixas, F. L. Nassi, and O. A. Dellagostin. 2006. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Can. J. Microbiol.* 52:747-752.

26. Ko, A. I., R. M. Galvao, C. M. Ribeiro Dourado, W. D. Johnson, Jr., and L. W. Riley. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354:820-825.
5
27. Koizumi, N. and H. Watanabe. 2005. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J.Postgrad.Med.* 51:210-214.
28. Koizumi, N. and H. Watanabe. 2005. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J.Postgrad.Med.* 51:210-214.
10
29. Leclerc, C. 2003. New approaches in vaccine development. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 26:329-341. doi:S0147-9571(03)00018-3 [pii];10.1016/S0147-9571(03)00018-3 [doi].
15
30. Lenz, L. L., B. Dere, and M. J. Bevan. 1996. Identification of an H2-M3-restricted *Listeria* epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity*. 5:63-72. doi:S1074-7613(00)80310-6 [pii].
31. Levett, P. N. 2001. Leptospirosis. *Clin.Microbiol.Rev.* 14:296-326.
20
32. Lomar, A. V., D. Diament, and J. R. Torres. 2000. Leptospirosis in Latin America. *Infectious Disease Clinics of North America* 14:23-+.
33. Martinez, R., A. Perez, M. C. Quinones, R. Cruz, A. Alvarez, M. Armesto, C. Fernandez, J. Menendez, I. Rodriguez, M. Baro, M. Diaz, J. Rodriguez, G. Sierra, A. M. Obregon, M. E. Toledo, and N. Fernandez. 2004. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. *Rev.Panam.Salud Publica* 15:249-
25
30

255.

34. McBride, A. J., D. A. Athanazio, M. G. Reis, and A. I. Ko. 2005. Leptospirosis. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 18:376-386.
- 5 35. Morey, R. E., R. L. Galloway, S. L. Bragg, A. G. Steigerwalt, L. W. Mayer, and P. N. Levett. 2006. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J.Clin.Microbiol.* 44:3510-3516. doi:44/10/3510 [pii];10.1128/JCM.00670-06 [doi].
- 10 36. Murhekar, M. V., A. P. Sugunan, P. Vijayachari, S. Sharma, and S. C. Sehgal. 1998. Risk factors in the transmission of leptospiral infection: *Indian Journal of Medical Research* 107:218-223.
- 15 37. Nascimento, A. L., A. I. Ko, E. A. Martins, C. B. Monteiro-Vitorello, P. L. Ho, D. A. Haake, S. Verjovski-Almeida, R. A. Hartskeerl, M. V. Marques, M. C. Oliveira, C. F. Menck, L. C. Leite, H. Carrer, L. L. Coutinho, W. M. Degraeve, O. A. Dellagostin, H. El-Dorry, E. S. Ferro, M. I. Ferro, L. R. Furlan, M. Gamberini, E. A. Giglioti, A. Goes-Neto, G. H. Goldman, M. H. Goldman, R. Harakava, S. M. Jeronimo, I. L. Junqueira-de-Azevedo, E. T. Kimura, E. E. Kuramae, E. G. Lemos, M. V. Lemos, C. L. Marino, L. R. Nunes, R. C. de Oliveira, G. G. Pereira, M. S. Reis, A. Schrieffer, W. J. Siqueira, P. Sommer, S. M. Tsai, A. J. Simpson, J. A. Ferro, L. E. Camargo, J. P. Kitajima, J. C. Setubal, and M. A. Van Sluys. 2004. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J.Bacteriol.* 186:2164-2172.
- 20
- 25
- 30

38. Ohara, N. and T. Yamada. 2001. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 19:4089-4098.
- 5 39. Palaniappan, R. U., S. P. McDonough, T. J. Divers, C. S. Chen, M. J. Pan, M. Matsumoto, and Y. F. Chang. 2006. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. *Infect.Immun.* 74:1745-1750.
- 10 40. Petersen, A. M., K. Boye, J. Blom, P. Schlichting, and K. A. Krogfelt. 2001. First isolation of *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge from two human patients with Weil's syndrome. *J.Med.Microbiol.* 50:96-100.
- 15 41. Picardeau, M., D. M. Bulach, C. Bouchier, R. L. Zuerner, N. Zidane, P. J. Wilson, S. Creno, E. S. Kuczek, S. Bommezzadri, J. C. Davis, A. McGrath, M. J. Johnson, C. Boursaux-Eude, T. Seemann, Z. Rouy, R. L. Coppel, J. I. Rood, A. Lajus, J. K. Davies, C. Medigue, and B. Adler. 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS.One.* 3:e1607. doi:10.1371/journal.pone.0001607 [doi].
- 20 42. Plank, R. and D. Dean. 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infection* 2:1265-1276.
- 25 43. Reis, R. B., G. S. Ribeiro, R. D. Felzemburgh, F. S. Santana, S. Mohr, A. X. Melendez, A. Queiroz, A. C. Santos, R. R. Ravines, W. S. Tassinari, M. S.
- 30

- Carvalho, M. G. Reis, and A. I. Ko. 2008. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2:e228. doi:10.1371/journal.pntd.0000228 [doi].
- 5 44. Sambrook, J. and D. W. Russel. 2001. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 10 45. Segura, E. R., C. A. Ganoza, K. Campos, J. N. Ricaldi, S. Torres, H. Silva, M. J. Cespedes, M. A. Matthias, M. A. Swancutt, L. R. Lopez, E. Gotuzzo, H. Guerra, R. H. Gilman, and J. M. Vinetz. 2005. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin.Infect.Dis.* 40:343-351.
- 15 46. Seixas, F. K., E. F. da Silva, D. D. Hartwig, G. M. Cerqueira, M. Amaral, M. Q. Fagundes, R. G. Dossa, and O. A. Dellagostin. 2007. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine* 26:88-95.
- 20 47. Seixas, F. K., C. H. Fernandes, D. D. Hartwig, F. R. Conceição, J. A. Aleixo, and O. A. Dellagostin. 2007. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. *Can.J.Microbiol.* 53:472-479.
- 25 48. Silva, E. F., M. A. Medeiros, A. J. McBride, J. Matsunaga, G. S. Esteves, J. G. Ramos, C. S. Santos, J. Croda, A. Homma, O. A. Dellagostin, D. A. Haake, M. G. Reis, and A. I. Ko. 2007. The terminal portion of
- 30

leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. Vaccine.

- 5 49. Sonrier, C., C. Branger, V. Michel, N. Ruvoen-Clouet, J. P. Ganiere, and G. Andre-Fontaine. 2000. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. Vaccine 19:86-94.
- 10 50. Vernel-Pauillac, F. and C. Goarant. 2010. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. PLoS.Negl.Trop.Dis. 4:e582. doi:10.1371/journal.pntd.0000582 [doi].
51. Wang, Z., L. Jin, and A. Wegrzyn. 2007. Leptospirosis vaccines. Microb.Cell Fact. 6:39. doi:1475-2859-6-39 [pii];10.1186/1475-2859-6-39 [doi].
- 15 52. Yan, W., S. M. Faisal, S. P. McDonough, T. J. Divers, S. C. Barr, C. F. Chang, M. J. Pan, and Y. F. Chang. 2009. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. Microbes.Infect. 11:230-237. doi:S1286-4579(08)00335-3 [pii];10.1016/j.micinf.2008.11.008 [doi].
- 20 53. Zhuo, J. T., S. S. Wang, and W. L. Lan. 1995. A discussion on setting up target age group for immunization against leptospirosis. Zhonghua Liu Xing.Bing.Xue.Za Zhi. 16:228-230.
- 25

REIVINDICAÇÕES

Estará claro para pessoal hábil nesta área que modificações e variações podem ser feitas para os compostos e processos desta invenção. Assim, pretende-se que a presente invenção cubra tais modificações e variações, desde que entrem no âmbito das reivindicações anexadas e suas equivalentes. Assim, a invenção é limitada para as reivindicações a seguir:

Reivindico:

10 **1) Processo de clonagem, expressão e purificação da proteína LemA de *Leptospira* spp. em sua forma recombinante para uso como vacina de subunidade e diagnóstico, caracterizada por** prever as seguintes etapas:

- 15 a) obter o fragmento de DNA a partir do genoma de *Leptospira* spp., que codifica para a sequência de aminoácidos da proteína de interesse, bem como, para os complementares a esta sequência, através da técnica de PCR;
- 20 b) purificar o fragmento de interesse amplificado por PCR, utilizando "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)";
- 25 c) proceder a ligação do fragmento de DNA de interesse purificado, no vetor de clonagem e expressão pQE30, ambos digeridos com as enzimas de restrição, utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen);
- d) inserir o produto da ligação (vetor + inserto) em células competentes de *E. coli*;
- 30 e) plaquear as bactérias transformadas em ágar LB, acrescido do antibiótico ampicilina e incubá-las por 12 - 20 h, 37 °C;

- f) fazer uma triagem rápida com fenol-clorofórmio, com intuito de identificar supostos recombinantes;
- g) crescer estes supostos recombinantes em caldo LB acrescido de ampicilina, por 12 - 20 h a 37 °C e fazer extração de DNA plasmidial utilizando "GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare)";
- h) checar a presença do inserto e orientação do mesmo, através de digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento de DNA;
- i) induzir a expressão da proteína recombinante de interesse nos clones bacterianos selecionados como positivos para a presença do inserto, cultivados em 10 mL de LB até DO₆₀₀ entre 0,5 - 0,7, através da adição de 1 mM de IPTG por cerca de 3,5 h, a 37 °C;
- j) observar a expressão nos clones recombinantes através de SDS-PAGE 15% e confirmá-la através de *Western blotting* com anticorpo anti-cauda de histidina;
- k) selecionar um clone e expandir a produção da proteína recombinante para 500 mL de LB acrescido de ampicilina e quando o crescimento atingir DO₆₀₀ entre 0,5 - 0,7, induzir com 1 mM de IPTG, por cerca de 3,5 h, a 37 °C;
- l) solubilizar a proteína expressa na células de *E. coli*, utilizando tampão com 8M de uréia e purificá-la através de cromatografia de afinidade em colunas Ni² Sepharose HisTrap, sendo a proteína eluída da coluna com 200 mM de imidazole;
- m) dialisar a proteína recombinante contra 12 L de tampão PBS 1x, pH 7,4 em sistema de fluxo contínuo, por 92 horas a 4 °C.

30 **2) Processo de clonagem do gene que codifica para a proteína**

LemA de *Leptospira* spp. em vetor de expressão em mamífero para uso como vacina de DNA, caracterizada por prever as seguintes etapas:

- 5 a) obter o fragmento de DNA a partir do DNA genômico de *Leptospira* spp., que codifica para a sequência de aminoácidos da proteína de interesse, bem como para os complementares a esta sequência, através da técnica de PCR;
- 10 b) purificar o fragmento de interesse amplificado por PCR, utilizando "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)";
- c) proceder a ligação do fragmento de DNA de interesse purificado, no sistema pTARGET expression vector (Promega, USA);
- 15 d) inserir o produto da ligação (vetor + inserto) em células competentes de *E. coli* TOP10;
- e) plaquear as bactérias transformadas em ágar LB, acrescido do antibiótico ampicilina e incubá-las por 12-20 h, 37 °C;
- 20 f) fazer uma triagem rápida com fenol-clorofórmio, com intuito de identificar supostos recombinantes;
- g) crescer estes supostos recombinantes em caldo LB acrescido de ampicilina, por 12 - 20 h a 37 °C e fazer extração de DNA plasmidial utilizando "GFX™ Micro
- 25 Plasmid Prep Kit (GE Healthcare)";
- h) checar a presença do inserto e orientação do mesmo, através de digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento de DNA;
- i) expandir a produção e purificar o DNA plasmidial
- 30 utilizando Perfectprep® Plasmid Maxi kit (Eppendorf) e

- j) eluir o DNA em tampão PBS 1x;
- k) determinar a expressão da proteína de interesse em células VERO transfectadas com o plasmídeo pTARGET/lemA, através da técnica de *Western blotting* com anticorpo policlonal anti-LemA.

3) Formulações com potencial vacinal à base da proteína recombinante LemA de *Leptospira* spp. em suas diferentes construções, caracterizada por composição farmacêutica utilizada para induzir resposta imune contra espiroquetas patogênica, que corresponde a uma quantidade imunologicamente eficaz de proteína purificada ou sequências funcionalmente equivalentes, em um veículo farmacêuticamente aceitável, que pode ou não conter um adjuvante. Esta composição farmacêutica composta por espiroquetas patogênicas baseia-se em *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospira*.

4) Formulações com potencial vacinal à base anticorpos gerados contra a proteína LemA de *Leptospira* spp. a partir de suas diferentes construções, caracterizada por composição farmacêutica utilizada para induzir resposta imune contra espiroquetas patogênica, que corresponde a uma quantidade imunologicamente eficaz de anticorpos que se ligam a peptídeos ou sequências funcionalmente equivalentes do mesmo, em um veículo farmacêuticamente aceitável, que pode ou não conter um adjuvante. Esta composição farmacêutica composta por espiroquetas patogênicas baseia-se em *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospira*.

5) Composição para diagnóstico ou para detecção *in vitro* da ocorrência de infecção por *Leptospira* spp., caracterizada por conter um reagente que se liga a componentes

específicos do patógeno, que podem ser oligonucleotídeos para a identificação do gene *lemA* ou anticorpos contra a proteína LemA ou sequências funcionalmente equivalentes, e reagentes de detecção desta ligação.

- 5 **6) Kit para diagnóstico *in vitro* de infecção por *Leptospira* spp., caracterizada por** ser útil na detecção da proteína LemA, anticorpos que se ligam a ela ou sequências funcionalmente equivalentes à mesma, contendo um ou mais recipientes que acondicionam ou um nucleotídeo que
- 10 hibridiza com o gene *lemA* ou a proteína LemA para detecção de anticorpos anti-LemA ou funcionalmente equivalentes ao mesmo.

Figura 1**SEQ 1**

TTGAAAACTAAAATTGATTTCAAATTGTTTTTGATAACGACTCTGACTCTTTTGGTTTT
 5 CTCCAATTGCGGTTATAATACAATTCAAGAAGAAGATGAGGCGATCAACGCATCTTGGG
 CGGAAATACTCAATCAATACCAGAGGAGATCGGATCTAATTCCAAATCTGGTTAACACA
 GTAAAAGGTTATGCAACCCAAGAAGAAAAAGTATTGATCGCAGTAACAAAAGCCAGAGC
 GGGAGTAGGTTCCATTCAAGCAGATGAAAAAAGTTTAAATAATCCCGAACTTTTTTAAAA
 AATATTCACAAGCGCAAGCACAGATGACTTCCGCACTTTCTAACTACTTGTAATTGCA
 10 GAAAATTATCCCGAATTAAAATCCAACGAAAAGTTTAGAGATCTACAAGCTCAACTAGA
 AGGAACCGAAAACAGAATTACCGTAGCCAGAAACAGATATATTCAAGCGGTACAAAAT
 ACAACGTTACAATTGAAAATTTCCAAATAATTTAACTGCAAAGTTTTTCGGATTGAA
 ACCAAACCTTCTTTTAGTGTAGAAAACGAAAAGAAATTTCTAAACCGCCTGAAGTTAA
 ATTTTAA

15

Figura 2**SEQ 2**

20

LKTKIDFKLFLITTLTLLVFSNCGYNTIQEEDAEINASWAEILNQYQRRSDLI PN LVNT
 VKGYATQEEKVLI AVTKARAGVGS IQADEKTLNNPEL FKKYSQAQAQMTSALS KLLVIA
 ENYPELKS NENFRDLQAQLEG TENRITVARNRYIQAVQKYNVTIRKFPNNLTAKFFGFE
 TKPSFSVENEKEISKPPEVKF*

25

Figura 3**SEQ 3**

TTGAAACTAAAATTGATTTCAAATTGTTTTTGATAACGACTCTGACTCTTTTGGTTTT
 5 **CTCCAATTGCGGTTATAATACA**ATTCAAGAAGAAGATGAGGCGATCAACGCATCTTGGG
 CGGAAATACTCAATCAATACCAGAGGAGATCGGATCTAATTCCAAATCTGGTTAACACA
 GTAAAAGGTTATGCAACCCAAGAAGAAAAAGTATTGATCGCAGTAACAAAAGCCAGAGC
 GGGAGTAGGTTCCATTCAAGCAGATGAAAAAACTTTAAATAATCCCGAACTTTTTAAAA
 AATATTCACAAGCGCAAGCACAGATGACTTCCGCACTTTCTAAACTACTTGTAATTGCA
 10 GAAAATTATCCCGAATTAAAATCCAACGAAAACCTTTAGAGATCTACAAGCTCAACTAGA
 AGGAACCGAAAACAGAATTACCGTAGCCAGAAACAGATATATTCAAGCGGTACAAAAAT
 ACAACGTTACAATTG**AAAATTTCAAATAATTTAACTGCAAAGTTTTTCGGATTGAA**
ACCAAACCTTCTTTTAGTGTAGAAAACGAAAAGAAATTTCTAAACCGCCTGAAGTTAA
ATTTTAA

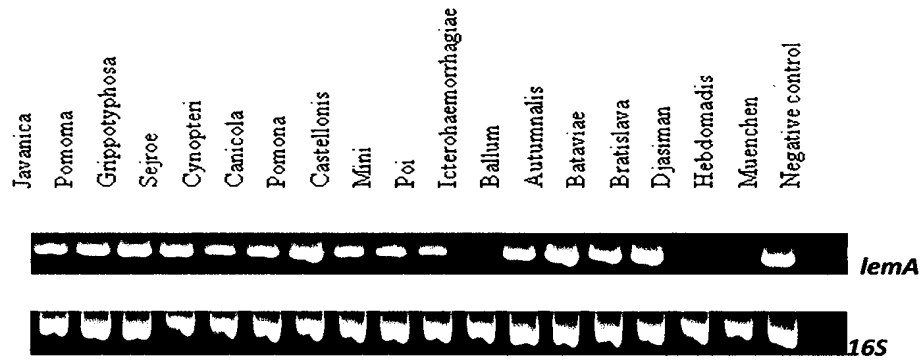
15

Figura 4**SEQ 4**

20

LKTKIDFKLFLITTLTLLVFSNCGYNTIQEEDEAINASWAEILNQYQRRSDLI PNLVNT
 VKGYATQEEKVLI AVTKARAGVGS IQADEKTLNNPELFKKYSQAQAQMTSALS KLLVIA
 ENYPELKS NENFRDLQAQLEG TENRITVARNRYIQAVQK**YNVTIRKFPNNLTAKFFGFE**
TKPSFSVENEKEISKPEVKF*

25

Figura 5

5

Figura 6

10

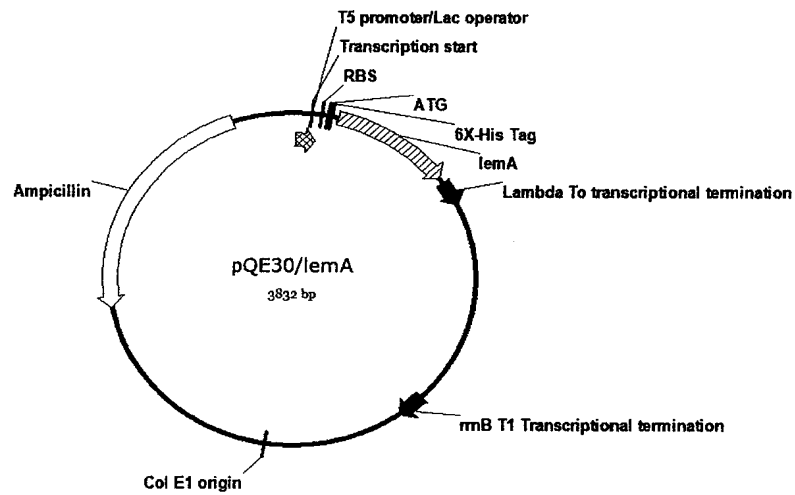
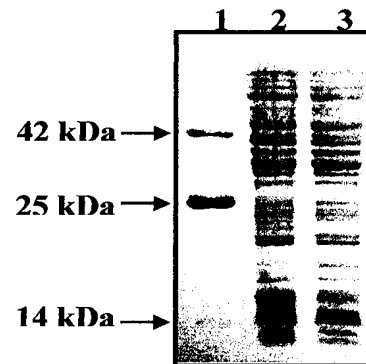
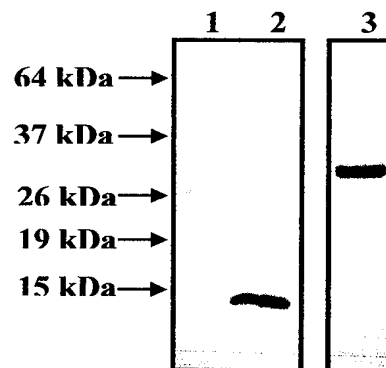
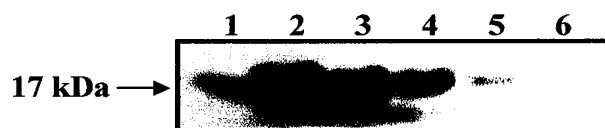


Figura 7

5

Figura 8

10

Figura 9

5

10

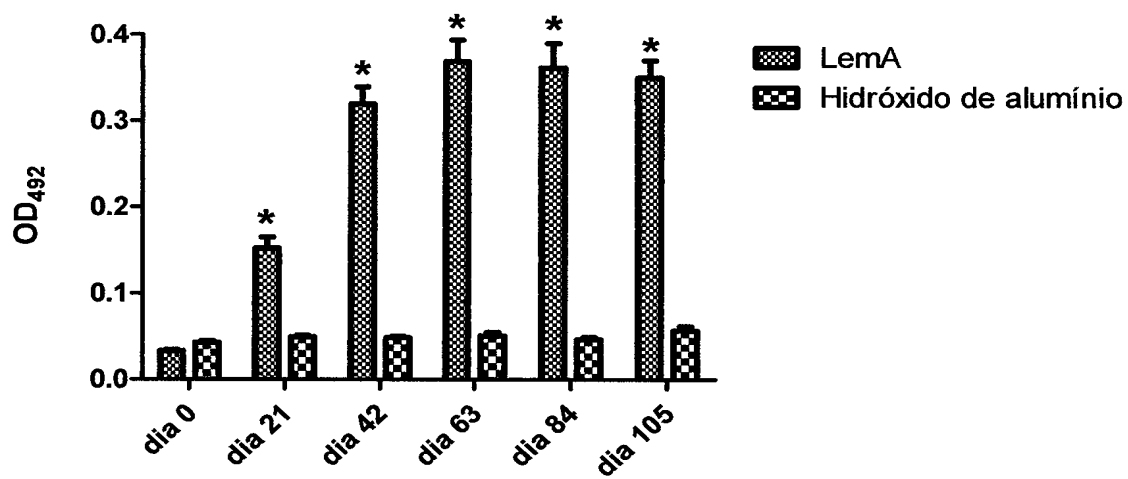
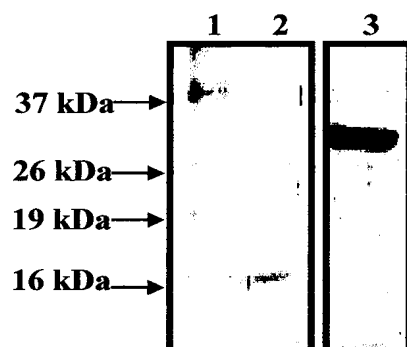
Figura 10

Figura 11

5

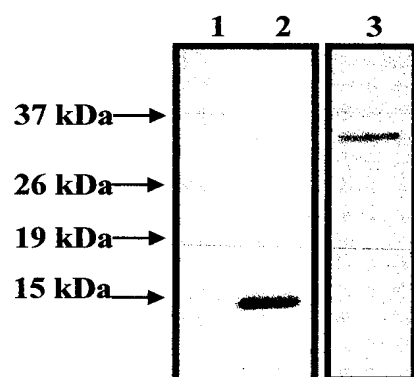
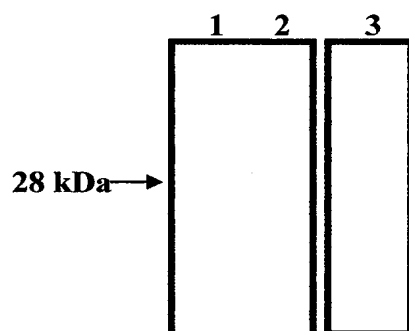
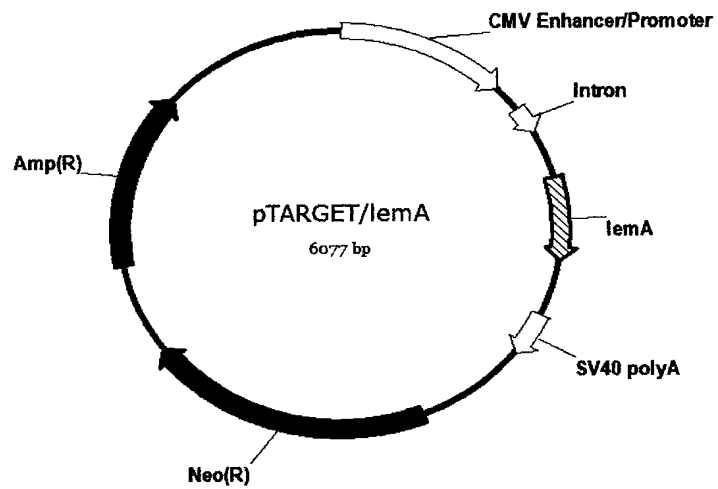


Figura 12

5

Figura 13

10

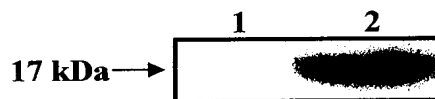
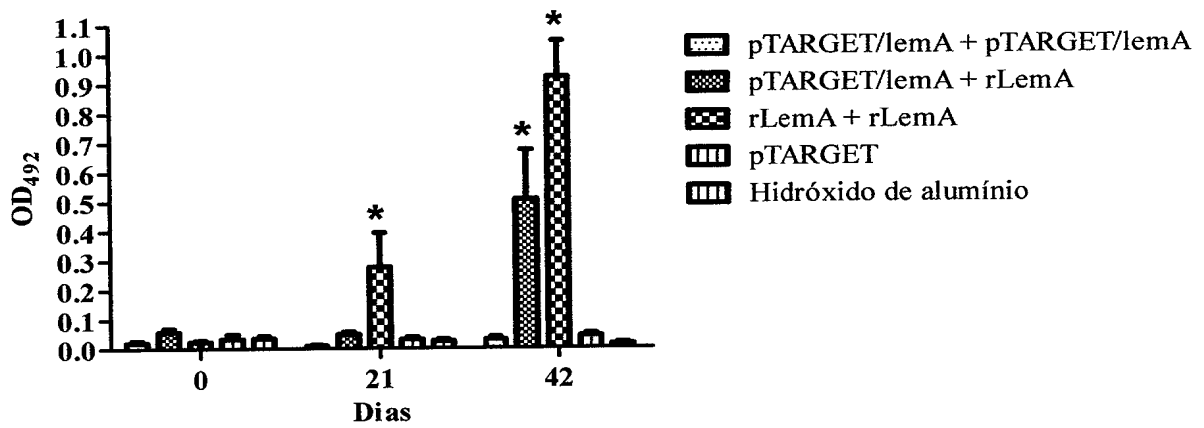
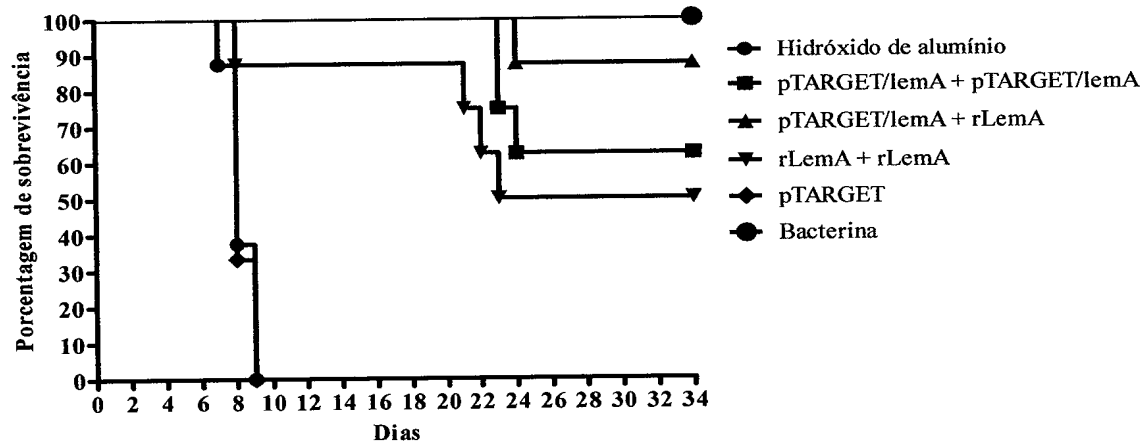


Figura 14

5

Figura 15

10

Resumo da invenção

"Proteína LemA de *Leptospira* spp. para uso como imunobiológico", refere-se ao isolamento de uma molécula de DNA, originalmente derivada de *L. interrogans*, que codifica para a proteína LemA (LIC11058), apresentando massa molecular de aproximadamente 24 kDa, composta por 199 aminoácidos, que poderá ser usada terapeuticamente como vacina ou componente vacinal, ou como componente no diagnóstico da leptospirose. Esta proteína é um marcador sorológico de infecção, pois o soro de pacientes com leptospirose é capaz de reconhecê-la em sua forma recombinante. De acordo com a presente invenção a proteína LemA, bem como a sequência que a codifica, poderão ser usados no diagnóstico e prevenção da infecção *Leptospira* spp. causadora de doença em humanos e demais mamíferos, incluindo os de importância veterinária.