



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

(21) PI 1102019-9 A2



* B R P I 1 1 0 2 0 1 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 19/04/2011

**(43) Data da Publicação: 25/06/2013
(RPI 2216)**

(51) Int.Cl.:

A61K 39/112

A61P 31/04

C12N 1/21

C12N 15/09

C12N 15/74

C12R 1/42

(54) Título: PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DE LINHAGEM ATENUADA MUTANTE DE UMA BACTÉRIA PATOGÊNICA, VACINA, VETOR VACINAL E USO DA REFERIDA VACINA

(73) Titular(es): Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

(72) Inventor(es): LUCIANE BENEDITA DUARTE PIVETTA,
Marcelo Brocchi

(57) Resumo: Patente de Invenção para: "PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DE LINHAGEM ATENUADA MUTANTE DE UMA BACTÉRIA PATOGÊNICA, VACINA, VETOR VACINAL E USO DA REFERIDA VACINA".

A presente invenção revela uma nova alternativa para a prevenção de salmonelose, a partir de mutantes capazes de promover imunização do hospedeiro. Em especial tais mutantes são nulos para os genes hupA e/ou HuB de HU e foram testados quanto a atenuação da virulência e capacidade de desencadear resposta imune efetiva e protetora contra a salmonelose, em especial a salmonelose murina, gerando resultados promissores. Adicionalmente, a presente invenção é destinada a um processo de produção desta linhagem atenuada, capaz de promover imunização, a vetores vacinais e vacinas para o tratamento de salmonelose e a seu uso no combate a tal infecção e possivelmente outras doenças, quando se tratanto de vetores multifatoriais.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção para: **"PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DE LINHAGEM ATENUADA MUTANTE DE UMA BACTÉRIA PATOGÊNICA, VACINA, VETOR VACINAL E USO DA REFERIDA VACINA"**.

5 Campo da Invenção

A presente invenção se refere a um processo de produção de linhagens mutantes atenuadas, capazes de promover imunização, a vetores vacinais e vacinas para o tratamento de salmonelose e a seu uso no combate a tal
10 infecção. Especificamente, tais mutantes são nulos para os genes *hupA* e *hupB* de HU e foram testados quanto a atenuação da virulência e capacidade de desencadear resposta imune efetiva e protetora contra a salmonelose.

Fundamentos e Antecedentes da Invenção

15 ***Salmonella***

O gênero *Salmonella* sp pertence à família *Enterobacteriaceae* e é formado por bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e geralmente flagelados (Mastroeni e Maskell, 2006). A classificação sorológica dessa bactéria
20 fundamenta-se na identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), este último quando presente.

Estudos de hibridação de DNA sugerem a existência de duas espécies de *Salmonella*: *S. enterica* e *S. bongori*. A

espécie *S. enterica* é subdividida em 7 subgrupos, sendo que a grande maioria das sorovariedades patogênicas para o homem está incluída no subgrupo I (Boyd et al. 1996).

As sorovariedades de *S. enterica* patogênicas podem
5 causar, em mamíferos, infecções com diferentes graus de gravidade, desde gastroenterites localizadas na mucosa intestinal até infecções sistêmicas graves, dependendo da sorovariedade bacteriana e do tipo de hospedeiro envolvido (Bäumler et al., 1998).

10 *S. enterica* Typhi é o agente causador da febre tifóide, uma infecção sistêmica grave no homem (Guzman et al., 2006). *S. enterica* Choleraesuis causa infecções sistêmicas graves, principalmente em suínos, embora também possa causar infecções em humanos (Mastroeni e Maskell,
15 2006; Salyers e Whitt, 2002). *Salmonella enterica* Dublin é uma sorovariedade associada principalmente a bovinos. Como *S. enterica* Typhi em humanos, a sorovariedade Dublin é invasiva e pode causar gastroenterites e septicemia nesses animais (Mastroeni e Maskell, 2006). *S. enterica*
20 Typhimurium e Enteritidis são causas comuns de gastroenterites em humanos, mas também podem estar associadas a infecções extra-intestinais (Mastroeni e Maskell, 2006). Em camundongos, *S. enterica* Typhimurium e Enteritidis causam um tipo de infecção muito semelhante à

febre tifóide humana. Desta forma, camundongos BALB/c são utilizados como o modelo murino de infecção sistêmica por *S. enterica*.

Salmonelose e doença

5 A salmonelose é uma das doenças infecciosas mais frequentes tanto em humanos quanto em outros animais. A infecção por *S. enterica* inicia-se com a ingestão de água ou alimentos contaminados, particularmente alimentos derivados de aves e suínos. Estes microrganismos são

10 patógenos intracelulares facultativos e, uma vez ingeridos, apresentam a capacidade de aderir e invadir células da mucosa intestinal, preferencialmente células M (Jones et al., 1994). Uma vez ultrapassada a mucosa intestinal, *S. enterica* invade, persiste e prolifera no interior de

15 vacúolos de células do sistema retículo endotelial podendo assim, alcançar diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro, causando infecção sistêmica (Salyer e Whitt, 2002). Estas infecções representam, ainda hoje, um grave problema de saúde pública, devido sua alta incidência e gravidade,

20 principalmente em áreas subdesenvolvidas do mundo, onde as condições de higiene e saneamento básico são ainda precárias (Woc-Colburn e Bobak, 2009; Boyle et al., 2007; Coburn et al. 2007; Figueroa-Ochoa e Verdugo-Rodrigues, 2005; Graham, 2002).

No Brasil a salmonelose é um problema sério de saúde pública especialmente em regiões mais pobres (Fernandes et al. 2006, Ghilardi et al., 2006).

A dose infectante média (DI_{50}) de *S. enterica* capaz de
5 produzir infecções clínicas ou subclínicas em humanos está entre 10^5 - 10^{10} organismos ingeridos. O processo infeccioso é localizado no íleo, cólon e linfonodos mesentéricos após a ingestão de alimento contaminado, com o aparecimento de sintomas tais como diarreia, vômito e dores abdominais
10 (revisado por Darwin e Miller, 1999). A maioria dos casos de gastroenterites ocorre em crianças com menos de 10 anos de idade, e os sintomas tendem a ser mais severos neste grupo, podendo a infecção tornar-se sistêmica.

Uma importante barreira encontrada por *S. enterica* no
15 processo infeccioso, após sua passagem pelo epitélio intestinal, são os macrófagos da submucosa (Mastroeni e Maskell, 2006; Salyers e Whitt, 2002). Os macrófagos detectam e internalizam o patógeno bacteriano a fim de eliminá-lo do hospedeiro.

20 As sorovariedades de *S. enterica*, capazes de causar infecção sistêmica, invadem os macrófagos e então ativam mecanismos de virulência que permitem a evasão das funções microbicidas do fagócito, permitindo a sobrevivência e replicação no ambiente intracelular (Mastroeni e Maskell,

2006; Salyers e Whitt, 2002; Alpuche-Aranda, et al., 1994). A migração de macrófagos infectados para outros órgãos do sistema monocítico fagocitário facilita a disseminação da bactéria no hospedeiro.

5 **Salmonella e Vacinas**

A busca por uma vacina efetiva contra a febre tifóide compõe um importante capítulo na história da Microbiologia. Várias estratégias e formulações vacinais foram testadas tais como bacterianas, vacinas de subunidades e linhagens vivas atenuadas (revisado por Bueno et al., 2009; Galen et al., 2009; Guzman et al., 2006). O antígeno capsular Vi purificado, livre ou conjugado com proteínas carreadoras é imunogênico quando administrado por via intramuscular ou subcutânea e tem se mostrado eficaz em alguns estudos (Guzman et al., 2006; Strugnell e Wijburg, 2006). Contudo, devido a suas características e modo de administração, é incapaz de induzir o sistema imune ao nível de mucosa (MALT, do inglês *mucosal associated lymphoid tissue*). Desta maneira, esforços foram canalizados no desenvolvimento de vacinas constituídas por linhagens vivas atenuadas, ideais para induzir resposta imune ao nível do MALT.

A primeira vacina viva atenuada desenvolvida contra a febre tifóide é composta pela linhagem *S. enterica* Typhi Ty21a. Esta linhagem foi obtida por mutagênese química da

linhagem parental Ty2 (Germanier e Furer, 1983). Esta vacina oral é segura, mas devido a sua grande atenuação, requer várias doses para induzir imunidade, que frequentemente é de curta duração (Guzman et al., 2006; 5 Strugnell e Wijburg, 2006).

Os resultados alcançados com a linhagem Ty21a levaram vários grupos a construírem novas linhagens vacinais de *S. enterica*, contendo deleções em genes alvo específicos que atenuaram a virulência. Adicionalmente, essas linhagens 10 apresentam uma característica fundamental para vacinas vivas, a estabilidade da atenuação, uma vez que a mesma foi alcançada por deleção de um ou mais genes (revisado por Guzman et al., 2006). Esses mutantes foram construídos inicialmente em *S. enterica* Typhimurium, devido à 15 disponibilidade do modelo murino de infecção, sendo as mutações promissoras transferidas para linhagens de *S. enterica* Typhi, muitas vezes a própria Ty2 (revisado por Guzman et al., 2006). Sendo assim, linhagens Δ aroA, Δ aroC, Δ aroD de *S. enterica*, deficientes na via biossintética dos 20 aminoácidos aromáticos (Tacket et al., 1997), mutantes Δ cyA Δ crp, incapazes de expressar adenilato ciclase e o receptor para cAMP (Curtiss e Kelly, 1987; Tacket et al., 1997), mutantes *phoP-phoQ* (Hohmann et al., 1996) entre outros,

foram construídos e demonstraram-se imunogênicos, apesar da atenuação da virulência. No entanto, com frequência, testes em voluntários humanos indicaram a ocorrência de bacteremia e/ou a necessidade de várias doses para a indução de
5 imunidade (Guzman *et al.*, 2006; Strugnell e Wijburg, 2006). De fato, diversos estudos têm demonstrado o desafio de se ajustar o grau de atenuação da linhagem vacinal para, de um lado, não comprometer a resposta imune e de outro, ser livre de efeitos colaterais.

10 A capacidade de invadir, sobreviver e proliferar no interior de macrófagos, polimorfonucleares e células dendríticas, aliada à disponibilidade de mutantes atenuados fazem de *S. enterica* um excelente carreador de antígenos a células do sistema imune. Assim, linhagens atenuadas de *S.*
15 *enterica* podem ser manipuladas geneticamente de tal forma a expressar antígenos heterólogos, construindo-se linhagens vacinais multifatoriais. Diferentes antígenos derivados de outras bactérias, vírus, fungos, parasitas e mesmo de células de mamífero foram expressos em linhagens vacinais
20 de *S. enterica*. Estas linhagens foram capazes de induzir resposta imune protetora não somente contra a salmonelose, mas também contra o organismo doador do antígeno heterólogo (Cheminay e Hensel, 2007; Kwon *et al.*, 2007; Loessner *et al.*, 2007; Mahoney *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2006). Uma

característica fundamental de tais linhagens é, além de ser muito improvável a reversão da atenuação, a capacidade de expressar o antígeno heterólogo de forma estável e em quantidades suficientes para induzir o sistema imune.

5 No início, a clonagem e expressão de antígenos em *S. enterica* eram alcançadas através da utilização de plasmídeos carregando genes de resistência a antibióticos (Cárdenas e Clements, 1992). Alguns estudos demonstraram, no entanto, que na ausência de pressões seletivas, tais
10 plasmídeos eram instáveis e, portanto, perdidos após poucos ciclos de replicação *in vivo* (Cárdenas e Clements, 1992; Dunstan *et al.*, 2003) ou até mesmo durante o cultivo *in vitro* (Everest *et al.*, 1995).

Para resolver tais problemas, estratégias como a
15 utilização de promotores induzidos *in vivo* no controle de expressão do antígeno (Cheminay e Hensel, 2007; Marshall *et al.*, 2000), construção de sistemas letais balanceados (Curtiss *et al.*, 1990; Everest *et al.*, 1995) ou a integração do gene heterólogo no cromossomo de *S. enterica*
20 (Hone *et al.*, 1988; Strugnell *et al.*, 1990; Everest *et al.*, 1995) foram descritos.

O nucleóide bacteriano e os genes-alvo: *hupA* e *hupB*

Bactérias contêm proteínas que compõem o nucleóide bacteriano ("nucleoid-associated proteins", Nap) juntamente

com o DNA cromossômico. Diferente das histonas de eucariotos, as proteínas bacterianas parecem não formar com o DNA complexos análogos aos nucleossomas (Thanbichler et al., 2005). Dentro deste grupo encontram-se 12 proteínas sendo que as mais estudadas são HU, FIS, IHF, HNS e DPS (Dorman, 2009; Dorman e Kane, 2009; Cróinín e Dorman et al., 2007; Dorman et al., 2006; Drlica e Rouviere-Yaniv, 1987).

HU é uma proteína heterodimérica codificada por dois genes, sendo eles *hupA* e *hupB*. Esta proteína parece não reconhecer nenhuma sequência específica para a ligação ao DNA, mas apresenta grande afinidade a regiões *supercoiled* ou que apresentem distorções na estrutura do DNA (Pinson et al., 1999). Swinger et al. (2004) demonstraram que essa proteína é capaz de induzir e estabilizar curvaturas de diferentes ângulos no DNA. Alguns estudos sugerem que HU participe do reparo do DNA por recombinação (Swinger et al., 2004).

Há poucos dados na literatura sobre a proteína HU e *Salmonella* especificamente (Mangan et al., 2011), embora haja mais relatos entre essa proteína e *Escherichia coli*. Ainda assim, os estudos descritos focaram-se no funcionamento da proteína demonstrando a regulação de fatores de patogenicidade, mas não investigaram a possível atenuação promovida pela deleção dos genes *hupA* ou *hupB* e a

indução de proteção no modelo murino.

O gene *hupA* de *Salmonella* foi comparado ao gene *hupA* de *E.coli* por clonagem e sequenciamento, o que revelou que as subunidades HU α dessas bactérias são idênticas e que as
5 sequências fora das ORFs são altamente conservadas (Higgins & Hillyard, 1988).

Esses estudos revelam que a proteína HU afeta processos celulares como compactação do DNA, replicação, recombinação, regulação gênica, além de participar no
10 crescimento termo sensível, adaptação na fase estacionária de crescimento, lisogenia e transposição do bacteriófago Mu e é capaz de se ligar inespecificamente ao DNA (Bi et al., 2009). Em *S. enterica* HU coordena a expressão de genes envolvidos no metabolismo central e virulência (Mangan et
15 al., 2011).

O gene *hupB* já foi descrito como sendo um modulador negativo na expressão de *hila*, que é um gene crucial na expressão do fenótipo invasivo de *Salmonella* (Fahlen et al., 2000). No entanto, há controvérsias sobre a ação de
20 *hupB*, pois estudos posteriores realizados por outro grupo de pesquisa apontaram que esse gene tem uma ação positiva na regulação de *hila* (Schechter et al., 2003).

Berger et al. (2009) construíram um duplo mutante

$\Delta hupA\Delta hupB$ de *E.coli* para verificar as alterações na estrutura genômica promovida pela ausência da proteína HU. Por esse estudo, foi possível observar que a ausência de HU provoca um rearranjo espacial no padrão de transcrição, causando uma perturbação da homeostase topológica que é compensada por uma maior acessibilidade de sítios de DNA pela topoisomerase.

O sistema de recombinação λ Red

Em bactérias entéricas, a obtenção de recombinantes utilizando moléculas lineares de DNA é um evento altamente raro, devido à instabilidade da molécula de DNA linear, que uma vez no interior da célula é rapidamente degradada pela atividade de nucleases do sistema de recombinação RecBCD. Para contornar esta dificuldade, um sistema baseado no uso da maquinaria de recombinação do bacteriófago λ (o sistema λ Red) foi proposto.

Datsenko e Wanner (2000) descreveram a construção e o emprego de um sistema baseado no bacteriófago λ para a construção de linhagens mutantes de bactérias entéricas. Este sistema é composto por plasmídeos acessórios, sendo o plasmídeo pkD3 utilizado na construção de cassetes de recombinação por PCR (Datsenko e Wanner. 2000).

Durante a busca de anterioridade, o documento US

2004/101531 reivindica a deleção dos genes *cya* e *crp* de *Salmonella*. Embora a estratégia da presente invenção tenha sido similar, a deleção ocorreu em outros genes, *hupA* e *hupB*, o que conferiu atenuação da bactéria e consequente
5 aplicação da mesma como vetor vacinal. Portanto, nota-se que uma estratégia de imunização baseada no silenciamento gênico de HU não foi descrita nem sequer sugerida pelo referido documento.

O pedido de patente brasileiro PI 0006291-0,
10 depositado em 27 de dezembro de 2000 em nome de Intervet International B.V. e intitulado: "*Bactéria do Gênero Salmonella, Vacina para a Proteção de Animais contra a Salmonelose, Uso de uma Bactéria, e, Processo para a Preparação de uma Vacina*", se refere a bactérias de
15 *Salmonella* para uso como uma vacina. A invenção também diz respeito a vacinas com base nas ditas bactérias, que são úteis para a prevenção da patogênese microbiana. Além disso, o referido documento diz respeito ao uso de tais bactérias ou à fabricação de tais vacinas.

20 Como pode ser observado, o referido documento PI 0006291-0 diz respeito somente à atenuação promovida pela deleção de outro gene, isto é, o gene *recA*.

A patente americana US 7,045,122, depositada em 15 de novembro de 2001, em nome de AKZO NOBEL N.V e intitulada:

"*Salmonella Vaccine*" refere-se a cepas vivas atenuadas de *Salmonella* compreendendo uma primeira mutação atenuante, que não são capazes de produzir RecA funcional. A invenção também relata que estas bactérias são para uso em vacinas.

5 Como pode ser observado, o referido documento US 7,045,122 também diz respeito somente a atenuação promovida pela deleção de um gene, isto é, o gene *recA*.

 O pedido de patente internacional WO/2010/096888, depositado em 25 de fevereiro de 2010, em nome de
10 Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e intitulado: "*Vacinas Compreendendo Linhagens Atenuadas, Processo de Construção de Linhagens Atenuadas, Vetores Vacinais e seu Uso no Tratamento da Salmonelose*" revela uma nova
15 alternativa para a prevenção de salmonelose, a partir de mutantes capazes de promover imunização do hospedeiro. Em especial tais mutantes são nulos para os genes *himA* e *himD* de IHF e foram testados quanto a atenuação da virulência e capacidade de desencadear resposta imune efetiva e protetora contra a salmonelose, em especial a salmonelose
20 murina.

 Como pode ser observado, no referido documento WO/2010/096888 a atenuação é promovida pela deleção dos genes *ihfA* ou *ihfB*.

 O documento de patente americano US 2004/101531

descreve vacinas e composições imunogênicas que utilizam bactérias patogênicas vivas atenuadas, tal como *Salmonella*, para distribuir antígenos ectópicos para o sistema imune da mucosa dos animais vertebrados. As bactérias patogênicas atenuadas são preparadas para secretar o antígeno para o espaço periplasmico das bactérias ou para dentro das bactérias.

Como pode ser observado, no referido documento US 2004/101531 é descrito a deleção dos genes *cya* e *crp* de *Salmonella*.

O emprego de linhagens bacterianas vivas atenuadas como vacina está historicamente associado à indução de resposta imunológica efetiva e persistente. O vetor vacinal é constituído por uma bactéria que expressa antígenos (proteínas) de outras espécies de microorganismos obtidos através do método de DNA recombinante. Quando apresentados ao sistema imune do hospedeiro (organismo alvo) estes microorganismos estimulam a produção de anticorpos contra a doença de interesse, sem que ela cause sintomas ou danos graves ao hospedeiro.

Embora estudos venham demonstrando estratégias de imunização baseada no silenciamento gênico, em nenhum dos casos foi revelado e nem sequer sugerido um processo que permita uma estratégia de imunização baseada no

silenciamento gênico de HU.

É sabido que mutações atenuadoras diferentes conferem propriedades biológicas, como imunogenicidade, diferentes.

Sumário da Invenção

5 Para solucionar os problemas acima mencionados, a presente invenção propiciará vantagens significativas em relação aos processos de imunização baseada no silenciamento gênico de HU, possibilitando um aumento do seu desempenho e apresentando uma relação custo/benefício
10 mais favorável.

A presente invenção se refere em um primeiro aspecto, a construção de mutantes nulos de *S. enterica* para os genes (*hupA* e/ou *hupB*) codificadores de HU (Heat Unstable Protein) com o intuito de desenvolver linhagens atenuadas
15 quanto a virulência, mas capazes de causar infecção transitória e induzir o sistema imune de forma efetiva, constituindo-se em potenciais linhagens vacinais.

É um objeto da presente invenção uma bactéria atenuada compreendendo pelo menos um gene codificador de HU
20 silenciado em uma bactéria patogênica.

A presente invenção refere-se também a uma vacina baseada em bactérias atenuadas compreendendo pelo menos um gene codificador de HU silenciado em uma bactéria patogênica, capaz de induzir e estimular uma resposta imune

no hospedeiro vertebrado.

Breve Descrição dos Anexos

A estrutura e operação da presente invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma podem ser mais bem entendidas mediante referência aos desenhos em anexo e a seguinte descrição:

O Anexo 1 é um gel de agarose 1% mostrando o cassete de recombinação gerado por PCR utilizando os primers *hupA-f* e *hupA-r*;

10 O Anexo 2a e 2b é um gel de agarose 1% mostrando o produto de amplificação por PCR do gene *cat* presente em *ST662ΔhupA:cat* e *ST662ΔhupB:cat*, com os iniciadores *hupADT1f* e *hupADT1r* e *hupBDTf* e *hupBDTr*, respectivamente;

15 O Anexo 3 é um gel de agarose 1% demonstrando a excisão do gene *cat* das linhagens *ST662ΔhupA:cat* e *ST662ΔhupB:cat* para a construção do duplo mutante *ST662ΔhupAΔhupB*;

20 O Anexo 4 é um gel de agarose 1% demonstrando os produtos de amplificação por PCR das regiões referentes aos genes *hupA* e *hupB*, respectivamente;

O Anexo 5 é um esquema demonstrando a deleção dos genes *hupA* e *hupB* e a posição dos iniciadores de detecção, representados como setas.

Descrição Detalhada da Invenção

Embora a presente invenção possa ser suscetível a diferentes modalidades, é mostrada nos desenhos e na seguinte discussão detalhada, uma modalidade preferida com
5 o entendimento de que a presente modalidade deve ser considerada uma exemplificação dos princípios da invenção e não pretende limitar a presente invenção ao que foi ilustrado e descrito aqui.

O Anexo 1 é um Gel de agarose 1% com o fragmento
10 gerado por PCR, correspondente ao cassete de recombinação do gene *hupA* para a construção da linhagem mutante. Da esquerda para a direita, as amostras referem-se ao Marcador de Peso Molecular 1 kb DNA ladder (Fermentas); controle negativo e o cassete de recombinação do gene *hupA*, com
15 cerca de 1200 pb, compreendendo o gene *cat* e regiões flanqueadoras compostas por sítios FRT (FLP Recognition Targets) e regiões adjacentes aos gene-alvo.

Os Anexos 2a e 2b é uma construção dos mutantes $\Delta hupA$ e $\Delta hupB$ de *S. enterica*. Gel de agarose 1% com os produtos
20 de PCR utilizando-se respectivamente os primers *hupADT* e *hupBDT* (primers de detecção) para confirmação da mutagênese. O controle positivo corresponde à linhagem selvagem 662ST, com amplificação do gene íntegro e regiões

flanqueadoras, gerando fragmento de 396 pb para *hupA* e 371 pb para *hupB*, enquanto os mutantes apresentam banda de aproximadamente 1.2 kb, equivalente ao gene *cat* e regiões flanqueadoras. MPM: Marcador de Peso Molecular 1 kb DNA ladder (Fermentas); CN: Controle Negativo (sem DNA); CP: Controle Positivo (DNA genômico da linhagem selvagem).

O Anexo 3 mostra a eliminação do cassete de resistência ao cloranfenicol em mutantes $\Delta hupA$ e $\Delta hupB$ de *S. enterica*, demonstrando as "cicatrices" de cerca de 100 pb, correspondentes também aos sítios FRT. Foram utilizados os primers *hupADT1* para as linhagens mutantes $\Delta hupA$ e *hupBDT* para os mutantes $\Delta hupB$. MPM - Marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder (Fermentas); CN - Controle negativo; CmR - linhagens portadoras do gene *cat*.

O Anexo 4 é um gel de agarose 1% demonstrando os produtos de PCR para regiões flanqueadoras ao gene *hupA* e *hupB*, respectivamente. Da esquerda para a direita: Marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder (Fermentas); Controle negativo; Controle positivo para *hupA*, composto por DNA genômico da linhagem selvagem 662ST, com fragmento referente ao gene íntegro *hupA* (importante salientar que neste caso os iniciadores *hupADT2* foram utilizados, gerando fragmento de 702 pb para *hupA*); Linhagem 662ST $\Delta hupA$, com

fragmento amplificado pelos primers *hupADT2*, referente ao gene *cat* e regiões flanqueadoras; Linhagem duplo mutante 662ST Δ *hupA* Δ *hupB*, amplificado pelos primers *hupADT2*; Controle positivo, composto pelo DNA genômico da linhagem selvagem 662ST, com fragmento referente ao gene íntegro *hupB*; Linhagem 662ST Δ *hupB*, com fragmento amplificado pelos primers *hupBDT*, referente ao gene *cat* e regiões flanqueadoras; Linhagem duplo mutante 662ST Δ *hupA* Δ *hupB*, amplificado pelos primers *hupBDT*.

10 O Anexo 5 é um esquema demonstrativo das etapas de construção das linhagens mutantes Δ *hupA* e Δ *hupB* e posição dos primers de detecção *hupADT* e *hupBDT*, representados como setas. Inicialmente o gene-alvo está íntegro, demonstrado em branco. Posteriormente, o gene-alvo é substituído pelo gene *cat* (cloranphenicol acetyl transferase), também demonstrado em branco. Na última etapa, o gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol é eliminado, restando apenas uma "cicatriz" composta por sítios FRT (região hachurada).

20 *Modalidade Preferencial da Invenção*

Bactéria Patogênica

As bactérias patogênicas de acordo com a presente invenção são bactérias capazes de provocar doenças e/ou

morte em seus hospedeiros. Exemplos de bactérias patogênicas incluem, sem limitações, bactérias gram negativas, em especial membros das famílias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Francisellaceae*,
5 *Legionellales*, *Pseudomonadaceae* ou *Pasteurellaceae*, incluindo os gêneros *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia* spp., *Yersinia* spp., e *Vibrio* spp.

Em especial, bactérias patogênicas da presente invenção são escolhidas dentre as espécies que possuem em
10 seu genoma pelo menos um gene codificador de HU, preferencialmente, mas não exclusivamente, *S. enterica* sorovar Typhimurium (662ST).

Gene codificador de HU

O gene codificador de HU da presente invenção é uma
15 sequência de DNA que apresenta homologia de pelo menos 80% com pelo menos uma sequência escolhida dentre *hupA* ou *hupB*, as quais são escolhidas dentre as espécies que possuem em seu genoma pelo menos um gene codificador de HU, preferencialmente, mas não exclusivamente, *S. enterica*
20 sorovar Typhimurium (662ST).

Bactéria Atenuada

Para efeitos da presente invenção, entende-se como bactéria atenuada uma bactéria patogênica que possui pelo menos um gene codificador de HU silenciado.

Por "silenciamento" entende-se um processo de deleção de determinada sequência do genoma de uma bactéria. Em especial, o silenciamento foi proporcionado por um cassete de recombinação.

5 Cassete de recombinação

O cassete de recombinação, de acordo com a presente invenção, é um cassete compreendendo pelo menos uma sequência capaz de silenciar pelo menos um gene codificador de HU em uma bactéria patogênica.

10 O cassete de recombinação é composto por iniciadores, que possuem 2 partes contínuas, sendo a primeira uma sequência de aproximadamente 40 bases homólogas ao gene alvo e a segunda aproximadamente 20 bases homólogas a uma região presente nos plasmídeos a serem utilizados.

15 As regiões de homologia com o gene codificador de HU foram selecionadas a partir da sequência do banco de dados do projeto Genoma *S. enterica* (NC_003197) (Washington University, St. Louis, USA) e escolhidas de modo que fossem próximas aos códons de iniciação e terminação do gene.

20 O cassete de recombinação compreende ainda genes acessórios, como genes de resistência a antibióticos.

Processo de Transformação e Recombinação

O processo de recombinação das bactérias da presente invenção é um processo que se baseia no sistema de

recombinação λRed . O sistema de recombinação λRed do bacteriófago λ inclui 3 genes: γ , β e *exo* (presentes no plasmídeo pKD46), que codificam respectivamente as proteínas Gam, Bet e Exo.

5 Gam inibe o sistema ExoV do hospedeiro, enquanto Bet e Exo promovem a recombinação de fragmentos lineares no DNA alvo.

Os plasmídeos acessórios contêm genes de resistência a antibióticos (Km^R ou Cm^R) flanqueados por sítios FRT (*FLP recombinação recognition targets*), formando o módulo de
10 recombinação. Assim, estes plasmídeos são utilizados na criação do cassete de recombinação.

Para a geração do cassete de recombinação, sequências de aproximadamente 40 pb homólogas ao gene alvo são geradas
15 nas extremidades desse módulo por PCR. Assim, o cassete de recombinação é o módulo flanqueado por sequências homólogas ao gene alvo.

Para a geração de mutantes, o plasmídeo pKD46 é transformado por eletroporação na linhagem hospedeira e os
20 transformantes são submetidos à eletroporação com o cassete de recombinação. A expressão dos genes γ , β e *exo* inibe a degradação da fita linear de DNA, permitindo a recombinação do cassete. Esta recombinação obedece à homologia de DNA

conferida pelas sequências flanqueadoras, de tal forma que a recombinação envolverá sequências homólogas.

Os recombinantes são então selecionados utilizando-se as marcas de resistências carreadas pelo módulo de recombinação. Essas construções permitem uma subsequente remoção do cassete de resistência pela FLP recombinase expressa por um gene plasmidial, no caso o plasmídeo pCP20. Desta forma, é possível construir deleções ou inserções de genes em bactérias entéricas, utilizando fragmentos de DNA lineares, gerados por PCR.

Em especial, o processo de transformação da presente invenção compreende as etapas de:

- a) expressão das proteínas Gam, Bet e Exo do bacteriófago λ presentes no plasmídeo pKD46, promovendo a recombinação de fragmentos lineares no DNA alvo; e
- b) troca alélica do gene codificador de HU pelo cassete de recombinação compreendendo um gene acessório;
- c) eliminação do gene acessório presente no cassete de recombinação.

20 ***Linhagens bacterianas selecionadas para mutagênese***

Para este estudo foi selecionada uma linhagem selvagem virulenta de *S. enterica*, da sorovariedade Typhimurium (662ST).

As amostras selecionadas foram estocadas em glicerol

2,5 M, segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001) e incorporado aqui, por referência, em sua totalidade.

Teste de sensibilidade das linhagens de *S. enterica*

5 *Typhimurium* a antibióticos

A susceptibilidade das linhagens selecionadas foi testada para os antibióticos ampicilina, canamicina, cloramfenicol, estreptomicina e tetraciclina. Para isso, foi utilizado o método de microdiluição.

10 Neste teste foi possível observar uma Concentração Inibitória Mínima (MIC) inferior a 10µg/mL para os antibióticos ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina e MIC num intervalo de 10-25 µg/mL para canamicina. Este teste indicou que plasmídeos com marcas de
15 resistência a ampicilina e ao cloranfenicol podem ser utilizados.

Sistema utilizado para mutagênese

A mutagênese dos genes *hupA* e *hupB* foi obtida pelo sistema λ Red conforme descrito por Datsenko e Wanner
20 (2000) e incorporada aqui, em sua totalidade, por referência. Este sistema é constituído das linhagens e plasmídeos demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens bacterianas com seus respectivos

plasmídeos pertencentes ao sistema λ Red.

Linhagem	Plasmídeo	Referência
BT 340	pCP20	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	pKD3	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	pKD4	Datsenko e Wanner, 2000
BW25113	pKD46	Datsenko e Wanner, 2000

Extração e purificação de plasmídeos

Do estoque à -80°C foi retirada uma amostra de cada cepa contendo os plasmídeos. A linhagem BW25113/pKD46 foi
5 semeada em meio LB ágar contendo ampicilina ($100\mu\text{g/mL}$); BW25141/pKD3 e BT340/pCP20 foram semeadas em meio LB ágar contendo ampicilina ($100\mu\text{g/mL}$) e cloranfenicol ($25\mu\text{g/mL}$).

Para extração e purificação dos plasmídeos pKD46 e pCP20, a temperatura de incubação utilizada foi 30°C , uma
10 vez que tais plasmídeos contêm origem de replicação termo-sensível. Após a extração, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% segundo o protocolo de Sambrook e Russell (2001), incorporada aqui, por referência, em sua totalidade.

15 ***Iniciadores utilizados para gerar os cassetes de recombinação***

Os iniciadores para essa metodologia são compostos de 2 partes contínuas, sendo a primeira uma sequência de

aproximadamente 40 bases homólogas ao gene alvo e a segunda 20 bases homólogas a uma região presente no plasmídeo pKD3.

A região utilizada para amplificar a sequência contida no plasmídeo foi selecionada através do programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), baseado na sequência do plasmídeo pKD3 (AY048742) (Datsenko e Wanner, 2001). Desse modo, foram desenhados os iniciadores hupA-f, hupA-r, hupB-f e hupB-r, descritos na Tabela 2.

10 Tabela 2. Iniciadores utilizados na construção do cassete de recombinação

Primers	Sequência (5'-3')
hupA-f (SEQ ID 1)	TAGCAAGCGATAAACACATTGTAAGGATAACTTATGAACAAGGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC
hupA-r (SEQ ID 2)	TTCGATAAAACTGTTTCACAGTTATGCGTCTTACTTAACTGCCATAT GAATATCCTCCTTAGTTC
hupB-f (SEQ ID 3)	GGTGCGATATAAATTATAAAGAGGAAGAGAAGAGTGAATAAAGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC
hupB-r (SEQ ID 4)	CTTTGTCACATCCCCCGAGGGGATCACGCTTAGTTTACCGCCATAT GAATATCCTCCTTAGTTC

Construção do cassete de recombinação por PCR

Para a construção do cassete de recombinação foram utilizados os iniciadores descritos anteriormente, para a amplificação de uma região do plasmídeo pKD3. As reações foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 20 µmol de cada iniciador, 20 a 30 ng de DNA plasmidial, 1mM de

cada dNTP, 2U de Taq DNA polimerase e 2 mM de MgCl₂ em tampão apropriado provido com a enzima.

Para a reação de PCR, o DNA plasmidial foi desnaturado por aquecimento a 94° C por 2 minutos, e a amplificação
5 realizada em 30 ciclos constituída dos seguintes passos:
(1) denaturação a 94° C por 30 segundos; (2) "anelamento" a 56° C por 30 segundos; (3) extensão a 72° C por 1 minuto e 30 segundos. Procedeu-se uma extensão final por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de
10 agarose 1% (Sambrook e Russell, 2001).

Assim, os primers hupA-f, hupA-r, hupB-f e hupB-r foram utilizados para amplificar uma região de aproximadamente 1,2 Kbp (Anexo 1) do plasmídeo pKD3. A região amplificada foi utilizada para compor o cassete de
15 recombinação com os genes *hupA* e *hupB*, respectivamente. Para fins ilustrativos, demonstra-se no Anexo 1 o cassete de recombinação gerado por PCR utilizando os primers hupA-f e hupA-r.

Sequenciamento de nucleotídeos

20 O sequenciamento de nucleotídeos foi realizado conforme protocolos padrões. Os resultados são apresentados abaixo.

Sobreposição do sequenciamento do duplo mutante $\Delta hupA\Delta hupB$ com os primers hupBDT "forward" e "reverse":

TCGTACTTCGAAGGATTCAGGTGCGATATAAATTATAAAGAGGAAGAGAAGAGTGAATA
AAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGA
ATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGCGGTAAACTAAGCGTGATCCCCTCGGGGGAT
GTGACAAAGTACAAGGGCGCATCAAC (SEQ ID No. 1)

5 A sobreposição das bases sequenciadas a partir dos
primers hupBDT f e r (sublinhados) condizem a regiões
 flangeadoras do gene *hupB*, não mais existente na linhagem
 duplo recombinante $\Delta hupA\Delta hupB$, conforme confirmado pela
 presença de uma cicatriz do plasmídio pKD3 no lugar desse
 10 gene (Box cinza).

Duplo mutante $\Delta hupA\Delta hupB$ sequenciado com *primer*
 hupADT2f:

GGCTCAGGGCAGACCTGCGCGAGGCTGGCGAGAGCA-TATCGGTATAAATTTTCAGCAA
 TGACACCAGAAAACGTGATTTACGTCTGATTTGTTCGTGCCATAAAGGCTTCCCTTATGCC
 15 CCCCCTCTGGTCTACATTTGGGAGGC-AAAAAAGTGGCTATCGGTGCGTGTATGCAGG
 AGAGTGCTTTTCTGGCATTTC-TCGCACTC-ATGCT**TAGCAAGCGATAAACACATTGT**
AAGGATAACTTATGAACAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTA
 GAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCATTTAAATGGCGCGCCTTACGCCCCGCCCT
 GCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCA
 20 CAAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATA
 ATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAAT
 CAAAACGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAACATATTCTCAATAAAC
 CCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTACCCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTG
 TAGAAACTGCCGAAATCGTCGTGGTATTCCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTT
 25 GCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCCTCT
 TTCATTGCCATACGTAATTCCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAGATG-GAATAA-GC
 CG-ATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGTCTTAAAGGCGTATATCA (SEQ ID
 No. 2)

Neste caso a sequência é maior, pois no local do gene *hupA* foi inserido o gene *cat* e regiões plasmidiais flanqueadoras (~1,2 kb). No box cinza, está destacada a sequência correspondente à região flanqueadora ao gene *hupA* de *Salmonella*, que logo em seguida é interrompida por sequências presentes no plasmídeo pKD3, correspondentes ao P1 e ao gene *cat*. Os traços simbolizam bases não identificadas no sequenciamento.

Duplo mutante $\Delta hupA\Delta hupB$ sequenciado com o primer
 10 *hupADT2r* (sequência complementar e invertida):

CAAACCCTTTAGG-AAATAGGCCAGGTTT-CACCGTAACACG--ACATCTTGCGAATAT
 ATGTGTAGAAACTGCCGAAATCGTCGTGGTATTCACCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTC
 AGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCAC
 CGTCTTTCATTGCCATACGTAATTCCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGA
 15 ATAAAGGCCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAAT
 ATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAT
 GTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCC
 ATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGACAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGA
 TCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTC
 20 GCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCT
 GCGAAGTGATCTTCTGTC-CAGGTAGGCGCGCCGAAGTTCCTATAC (SEQ ID No
 3).

Nesse sequenciamento foram detectadas apenas bases referentes ao plasmídeo pKD3, já que o início e o final da

sequência apresentaram baixa qualidade no eletroferograma e por isso foram desconsideradas. As regiões de alinhamento com o plasmídeo correspondem a uma região do gene *cat* (nucleotídeos 263 a 993 do plasmídeo).

5 ***Transformação das linhagens de S. enterica Typhimurium com o plasmídeo pKD46***

A transformação das linhagens selecionadas com o plasmídeo pKD46 foi realizada por eletroporação, seguindo protocolo descrito em Ausubel et al. (2007), incorporado
10 aqui, por referência, em sua totalidade.

O eletroporador (Eletroporador Bio Rad. Gene Pulser II, Hercules - CA, USA) foi ajustado para 1,5 KV, 25 μ F e 200 ohms e cubetas de 0,1 cm foram utilizadas. As amostras foram eletroporadas então incubadas por 1 hora em meio SOC.
15 Posteriormente as culturas foram plaqueadas em meio LB ágar provido de ampicilina (100 μ g/mL) e incubadas à 30°C durante a noite.

A presença do plasmídeo foi avaliada pela análise do perfil plasmidial por eletroforese em gel de agarose. As
20 linhagens selecionadas foram estocadas em glicerol 2,5 M segundo protocolo proposto por Sambrook e Russell (2001).

Troca alélica dos genes hupA e hupB pelo cassete de recombinação

Para a etapa de recombinação gênica foi utilizada a

linhagem 662ST/pKD46, como descrito anteriormente, e o cassete de recombinação gerado por PCR.

O preparo das células competentes foi feito partindo-se de um pré-inóculo com 5 mL de meio LB provido de
5 ampicilina (100 µg/mL), que foi incubado durante a noite à 30 °C. Desta cultura 0,5 mL foram inoculados em 50 mL de meio LB com o mesmo antibiótico e 1mM de L-arabinose (Sigma), usado como indutor da expressão dos genes γ , β , e
10 *exo*, sendo esta nova cultura crescida à 30 °C sob agitação (150 rpm) até atingir D.O₆₀₀ de 0,7. Os frascos foram resfriados em banho de gelo por 15 minutos e as culturas foram centrifugadas por 10 minutos à 5000 g (4° C). O precipitado foi ressuscitado em 4 mL de água deionizada esterilizada previamente resfriada a 4 °C e centrifugado
15 novamente nas mesmas condições. Esta etapa de lavagem foi repetida três vezes utilizando-se glicerol 10% e o sedimento formado após a última lavagem foi ressuscitado em 400 µL e distribuído em alíquotas de 90 µL pelo protocolo de Sambrook e Russell (2001) e incorporado aqui,
20 por referência, em sua totalidade.

Foram selecionados três tubos contendo as alíquotas aos quais foram adicionados 10 µL do produto gerado pela PCR; esses foram colocados em gelo por 1 minuto. O eletroporador foi ajustado para 1,5 KV, 25 µF e 200 ohms e

as amostras eletroporadas e recolhidas em meio SOC, onde foram incubadas à 37° C por 1 hora e depois plaqueadas em meio LB-ágar com cloranfenicol (25µg/mL). As culturas foram incubadas durante a noite à 37 °C. Das colônias crescidas, 5 foram selecionadas algumas para a confirmação por PCR, sendo denominadas 662STΔhupACm^R e 662STΔhupBCm^R. As colônias selecionadas foram estocadas em glicerol 2,5 M segundo protocolo proposto por Sambrook e Russell (2001), e incorporado aqui, por referência, em sua totalidade. Em 10 seguida, o plasmídio pKD46 foi curado.

Eliminação do gene cat de resistência ao antibiótico

Para a eliminação do gene de resistência ao antibiótico, foram utilizadas células competentes preparadas das linhagens 662STΔhupACm^R e 662STΔhupBCm^R e o 15 plasmídeo pCP20. A eletroporação foi feita conforme descrito anteriormente e os transformantes foram selecionados em placas de LB-ágar com ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas durante a noite à 30 ° C. Algumas das colônias crescidas foram selecionadas para 20 confirmação por PCR e denominadas 662STΔhupA e 662STΔhupB. Estas linhagens foram estocadas em glicerol 2,5M como descrito anteriormente por Sambrook e Russell (2001) e incorporado aqui, por referência, em sua totalidade.

Detecção e caracterização das mutações em *hupA* e *hupB* por PCR

Detecção do gene *cat*

O gene *cat* (*chloramphenicol acetyl transferase*) nos
 5 mutantes de *S. enterica* foi inicialmente detectado por PCR. Foi desenhado um par de iniciadores internos a este gene, tendo-se como base a sequência do plasmídeo pKD3 (AY048742) (Datsenko e Wanner, 2001) e constituinte do cassette de recombinação. Estes foram desenhados com o software Primer
 10 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Os iniciadores estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores utilizados para detecção do gene *cat*

Iniciador	Sequência	Referência
cmDT - f (SEQ ID 5)	5'-GAACTTCGGAATAGGAACTTCA-3'	Mendes et al., não publicado
cmDT - r (SEQ ID 6)	5'-TGTGACGGAAGATCACTTCG-3'	Mendes et al., não publicado

*** Estes primers já constaram de uma publicação.**

15 As reações foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 20 pmol de cada iniciador, 20 a 30 ng de DNA genômico de cada transformante, 1mM de cada dNTP, 2U de Taq DNA polimerase e 2 mM de MgCl₂ em tampão apropriado provido com a enzima.

Para a reação de PCR, o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94 °C por 2 minutos e a amplificação realizada em 35 ciclos constituída dos seguintes passos: (1) denaturação a 94 °C por 30 segundos; (2) "anelamento" a 55 °C por 30 segundos; (3) extensão a 72 °C por 1 minuto. Procedeu-se uma extensão final por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% utilizado o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001), incorporado aqui, por referência, em sua totalidade.

Detecção das mutações por iniciadores externos aos genes hupA e hupB

Foram construídos dois pares de iniciadores externos aos genes *hupA* e um par a *hupB* para a detecção das mutagêneses (Tabela 4). Esses foram desenhados com o auxílio do software Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), baseado na sequência de *S. enterica* Typhimurium LT2 (NC_003197).

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores externos aos genes *hupA* e *hupB*

Primers	Sequência (5'-3')
<i>hupADT1-f</i> (SEQ ID 4)	AGTGCTTTTCTGGCATTTC

hupADT1-r (SEQ ID 5)	ACAGACAAAAGGGGCTGATG
hupADT2-f (SEQ ID 6)	CGACTGCGAAGAACGTGATA
hupADT2-r (SEQ ID 7)	AAAGCCGCTGGCAGTAAAC
hupBDT-f (SEQ ID 8)	TCGTACTTCGAAGGATTCAGG
hupBDT-r (SEQ ID 9)	GTTGATGCGCCCTTGTACTT

Transdução com bacteriófago P22

A seleção de recombinantes de *S. enterica* por eletroporação muitas vezes seleciona linhagens contendo LPS (lipopolissacarídeos) incompletos, já que estes são mais
 5 facilmente transformáveis, mas são mais sensíveis ao sistema imune e muitas vezes incapazes de estabelecer uma infecção sistêmica em camundongos.

Para realizar a transdução a bactéria recombinante doadora foi cultivada em 3 ml de LB sem antibiótico durante
 10 a noite a 37 °C. No dia seguinte, uma alíquota de 100 µL do fago foi adicionada a 900 µL de LB fresco, atingindo a densidade de aproximadamente 10⁹ UFC/mL. Essa alíquota de 1 ml foi adicionada ao pré-inóculo cultivado, com uma

densidade bacteriana de aproximadamente 10^9 UFC/mL.

A cultura foi então novamente cultivada na estufa a 37 °C durante a noite. Nesse mesmo dia, a linhagem selvagem 662ST também foi cultivada em 3 ml de LB na estufa a 37 °C
5 durante a noite. Como controle, o bacteriófago foi plaqueado em LB Ágar, para verificação de contaminação bacteriana.

No terceiro dia, a cultura com a bactéria doadora e o fago foi centrifugada a 5000 g por 10 minutos a 4 °C, para
10 que as bactérias sedimentassem, separando-se do fago. Para garantir o isolamento de fagos e bactérias, o sobrenadante foi cuidadosamente filtrado e armazenado em um novo recipiente. Como controle o sobrenadante foi estriado em LB Ágar para verificar se não houve resquício de bactérias.

15 Alíquotas de fagos e bactérias selvagens receptoras foram misturadas, seguindo-se as seguintes proporções: 10 µl de fago + 100 µl de bactéria; 50 µl de fago + 100 µl de bactéria; 50 µl de fago + 50 µl de bactéria e 10 µl de fago + 50 µl de bactéria. Os recipientes contendo fagos e
20 bactérias foram incubados a 37 °C por 20 minutos para a adsorção. Após esse período, as alíquotas foram plaqueadas em LB Ágar com cloranfenicol para a seleção das bactérias transduzidas.

No dia seguinte, as colônias crescidas foram repicadas para os meios seletivos SS, MacConkey com cloranfenicol e novamente para LB com cloranfenicol e novo PCR de confirmação com os primers Cmdt e *hupAdt* ou *hupBdt* foi
5 realizado.

Caracterização dos mutantes $\Delta hupA$, $\Delta hupB$ e $\Delta hupA\Delta hupB$ de *S. enterica*

Curva de crescimento *in vitro*

As linhagens recombinantes foram inoculadas em 5 mL de
10 meio LB e incubadas à 37 °C durante a noite. No dia seguinte, 500 µL do pré-inóculo foi adicionado à 50 mL de meio LB 1% glicose e a nova cultura incubada à 37 °C sob agitação (150 rpm), sendo retiradas alíquotas a cada hora, durante cinco horas e diluições seriadas foram plaqueadas
15 em triplicata sobre LB-ágar para contabilização no dia seguinte.

A comparação das curvas exibidas pelas linhagens apresentou algumas diferenças no crescimento.

**Determinação da Dose Letal Média (DL_{50}) por via oral em
20 *Camundongos***

Para determinação da DL_{50} por via oral, as linhagens 662ST, 662ST $\Delta hupA$, 662ST $\Delta hupB$ e 662ST $\Delta hupA\Delta hupB$ foram cultivadas em meio LB a 37°C durante a noite. No dia

seguinte, 0,5 mL dessas culturas foram inoculados em 50 mL de meio LB-glicose 1% e incubado a 37°C sob agitação (150rpm) até que atingissem o título desejado. As células foram sedimentadas por centrifugação (5000g por 5 min) e lavadas no mesmo volume de tampão salina-fosfato (PBS, pH 7,4). Este passo foi repetido uma segunda vez e o sedimento ressuspendido em PBS (mesmo volume inicial). Diluições seriadas foram preparadas em PBS e usadas para infectar camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas. As diluições foram plaqueadas em meio LB-ágar para a determinação da UFC. O inóculo via oral foi feito utilizando agulha de gavagem modelo IC800 (INSIGHT, Ribeirão Preto-SP, Brasil).

A quantidade de bactérias inoculadas variou de acordo com cada grupo, de 10^2 à 10^9 UFC/mL, sendo utilizados três camundongos por diluição. Os animais foram acompanhados por 30 dias após a administração do inóculo.

Os valores de DL_{50} por via oral em camundongos BALB/c foram calculados pelo método "Moving Average Interpolation" (Welkos e O'Brien, 1994).

Tabela 5 - DL_{50} de linhagens de *S. enterica* inoculadas por via oral em camundongos BALB/c

Linhagem	DL_{50} (CFU.mL ⁻¹)	Referência
662ST	$1,5 \times 10^4$	Presente invenção

662ST Δ hupA	$3,2 \times 10^7$	Presente invenção
662ST Δ hupB	$3,5 \times 10^5$	Presente invenção
662ST Δ hupA Δ hupB	$> 10^8$	Presente invenção

É importante salientar que de experimento para experimento existe alguma variação nos valores de DL50, uma vez que este é um experimento que envolve várias variáveis biológicas.

5 **Desafio via oral**

A capacidade de desencadear resposta imune contra *S. enterica* foi testada em dois momentos: No primeiro, os animais foram imunizados com uma única dose de *S. enterica* e desafiados 28 dias após a mesma.

10 Em um segundo experimento, animais foram imunizados oralmente com duas doses da linhagem duplo mutante nos dias 0 e 14 e desafiados com a linhagem selvagem no 30º dia após a segunda dose. Os experimentos posteriores de desafio prosseguiram para a linhagem duplo mutante, já que esta
15 apresentou os resultados mais promissores.

A dose (UFC) utilizada foi de 10^8 para a linhagem duplo mutante, dose esta estabelecida a partir dos ensaios prévios. Os animais foram desafiados com doses de 10^7 CFU de linhagem ST662.

20 Para estes experimentos foram utilizados 7 camundongos

BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade por grupo. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o desafio e avaliados quanto à sua sobrevivência.

Nas imunizações duplas com 662ST Δ hupA Δ hupB todos os
5 animais sobreviveram ao desafio com a linhagem selvagem enquanto que o grupo com imunização única apresentou uma taxa de 85% após 30 dias de experimento. Os animais do grupo placebo, inoculados com PBS, morreram entre o 5º e o 10º dia após serem desafiados com as linhagens selvagens.
10 Algumas variações na taxa de sobrevivência dos camundongos com imunização dose única foram observadas entre diferentes experimentos.

Como pode ser observada, a presente invenção possibilita o uso de um vetor vacinal vivo para o
15 desenvolvimento de vacinas contra a salmonelose e outras doenças, com propriedades imunogênicas próprias, já que as linhagens atenuadas desenvolvidas podem ser empregadas na entrega de antígenos heterólogos ao sistema imune do hospedeiro.

20 Adicionalmente, a presente invenção possibilita a utilização como vacina viva para induzir proteção contra salmonelose; um potencial uso como vetor vacinal multifatorial, ou seja, as linhagens atenuadas podem expressar antígenos de outras doenças; além da utilização

BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade por grupo. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o desafio e avaliados quanto à sua sobrevivência.

Nas imunizações duplas com 662ST Δ hupA Δ hupB todos os
5 animais sobreviveram ao desafio com a linhagem selvagem enquanto que o grupo com imunização única apresentou uma taxa de 85% após 30 dias de experimento. Os animais do grupo placebo, inoculados com PBS, morreram entre o 5º e o 10º dia após serem desafiados com as linhagens selvagens.
10 Algumas variações na taxa de sobrevivência dos camundongos com imunização dose única foram observadas entre diferentes experimentos.

Como pode ser observada, a presente invenção possibilita o uso de um vetor vacinal vivo para o
15 desenvolvimento de vacinas contra a salmonelose e outras doenças, com propriedades imunogênicas próprias, já que as linhagens atenuadas desenvolvidas podem ser empregadas na entrega de antígenos heterólogos ao sistema imune do hospedeiro.

20 Adicionalmente, a presente invenção possibilita a utilização como vacina viva para induzir proteção contra salmonelose; um potencial uso como vetor vacinal multifatorial, ou seja, as linhagens atenuadas podem expressar antígenos de outras doenças; além da utilização

na terapia contra o câncer.

Salmonella enterica vem sendo utilizada como agente biológico no tratamento de alguns tipos de tumores sólidos. Isso porque esta bactéria apresenta tropismo para massas 5 tumorais. O tratamento de diferentes tumores com *S. enterica* tem resultado em diminuição ou mesmo desaparecimento da massa tumoral. No entanto, para este tipo de emprego, a linhagem deve ser atenuada. Assim, as linhagens mutantes desenvolvidas da presente invenção 10 apresentam o potencial de serem utilizadas na terapia de tumores. No entanto, estudos específicos são necessários para verificar este potencial e indicar outras modificações nas linhagens de *S. enterica* que eventualmente sejam necessárias.

15 A linhagem duplo mutante (662ST Δ hupA Δ hupB) ainda apresenta a vantagem adicional de menor probabilidade de reversão da atenuação para os níveis de patogenicidade da linhagem selvagem, já que dois genes foram nocauteados. Essa vantagem não está presente em linhagens com mutação 20 única, já que a reaquisição do gene perdido poderia recuperar a virulência total da linhagem.

A presente invenção tem utilização como vacina viva para induzir proteção contra salmonelose ou como potencial uso como vetor vacinal multifatorial, ou seja, as linhagens

atenuadas podem expressar antígenos de outros patógenos.

Adicionalmente a presente invenção pode ser utilizada na terapia contra o câncer. *Salmonella enterica* vem sendo utilizada como agente biológico no tratamento de alguns
5 tipos de tumores sólidos. Isso porque esta bactéria apresenta tropismo para massas tumorais. O tratamento de diferentes tumores com *S. enterica* tem resultado em diminuição ou mesmo desaparecimento da massa tumoral. No entanto, para este tipo de emprego, a linhagem deve ser
10 atenuada. Assim, as linhagens mutantes desenvolvidas da presente invenção apresentam o potencial de serem utilizadas na terapia de tumores.

Assim, embora tenham sido mostradas apenas algumas modalidades da presente invenção, será entendido que várias
15 omissões, substituições e alterações no processo de construção da linhagem atenuada de *Salmonella enterica* podem ser feitas por um técnico versado no assunto, sem se afastar do espírito e escopo da presente invenção.

É expressamente previsto que todas as combinações dos
20 elementos que desempenham a mesma função substancialmente da mesma forma para alcançar os mesmos resultados estão dentro do escopo da invenção. Substituições de elementos de uma modalidade descrita para outro são também totalmente pretendidos e contemplados.

Também é preciso entender que os desenhos não estão necessariamente em escala, mas que eles são apenas de natureza conceitual. A intenção é, portanto, ser limitada, tal como indicado pelo escopo das reivindicações anexas.

5 Referências

- Ali-Azam T, Iwata A, Nishimura A, Ueda S, Ishihama A. 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol* 181: 6361-70.
- 10 ➤ Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI. 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med*. 179: 601-8.
- Atkins HS, Morton M, Griffin KF, Stokes MG, Nataro JP, 15 Titball RW. 2006. Recombinant *Salmonella* vaccines for biodefence. *Vaccine*. 24: 2710-7.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman 20 JG, Smith JA, Struhl K. 2007. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun*. 66:4579-87.

- Berger M, Farcas A, Geertz M, et al. 2009. Coordination of genomics structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO reports*. 11(1):59-64.
- 5 ➤ Bi H, Sun L, Fukamachi T, Saito H, Kobayashi H. 2009. HU Participates in Expression of a Specific Set of Genes Required for Growth and Survival at Acidic pH in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 58:443-8.
- Boyd EF, Wang FS, Whittam TS, Selander RK. 1996. Molecular genetic relationships of salmonellae. *Appl Environ Microbiol.* 62: 804-8.
- 10 ➤ Boyle EC, Bishop JL, Grassl GA, Finlay B.B. 2007. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. *J Bacteriol.* 189: 1489- 95.
- 15 ➤ Bueno SM, González PA, Kalergis AM. 2009. Use of genetically modified bacteria to modulate adaptive immunity. *Curr Gene Ther.* 9: 171-84.
- Cárdenas L, Clements JD. 1992. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clin Microbiol Rev.* 5: 328-42.
- 20 ➤ Cheminay C, Hensel M. 2008. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *International Journal of Medical Microbiology.* 298:87-98.

- Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol.* 85: 112-8.
- 5 ➤ Cróinín TO e Dorman CJ. 2007. Expression of the Fis protein is sustained in late-exponential- and stationary-phase cultures of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium grown in the absence of aeration. *Mol Microbiol* 66: 237-51.
- 10 ➤ Curtiss R, Galan JE, Nakayama K, Kelly SM. 1990. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Res Microbiol.* 141: 797-805.
- 15 ➤ Curtiss R, Kelly SM. 1987. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect Immun.* 55:3035-43.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6640-5.
- 20 ➤ Darwin KH, Miller VL. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 12: 405- 28.
- Dorman CJ. 2009. Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Adv Appl Microbiol.* 67: 47-64.

- Dorman CJ, Kane KA. 2009. DNA bridging and antibridging: a role for bacterial nucleoid-associated proteins in regulating the expression of laterally acquired genes. *FEMS Microbiol Rev.* 33:5 87-92.
- 5 ➤ Dorman CJ, Danino V, Cróinín TO, Hinton JCD. 2006. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 59: 1831-47.
- 10 ➤ Drlica K, Rouviere-Yaniv J. 1987. Histonalike proteins of bacteria. *Microbiol Rev.* 51: 301-19.
- Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnell RA. 2003. In vitro and in vivo stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 186: 240-5.
- 15 ➤ Everest P, Frankel G, Li J, Lund P, Chatfield S, Dougan G. 1995. Expression of LacZ from the *htrA*, *nirB* and *groE* promoters in a *Salmonella* vaccine strain: influence of growth in mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett.* 37: 111-9.
- 20 ➤ Fahlen TF, Mathur N, Jones BD. 2000. Identification and characterization of mutants with increased expression of *hila*, the invasion gene transcriptional

activator of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 28:25-35.

- 5
- Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi AC, Dias AM, Almeida IA, Melo LC. 2006. *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 48: 179-84.
- Figueroa-Ochoa IM, Verdugo Rodríguez A. 2005. Molecular mechanism for pathogenicity of *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol*. 47: 25-42.
- 10
- Germanier R, Fürer E. 1983. Characteristics of the attenuated oral vaccine strain "*S. typhi*" Ty 21a. *Dev Biol Stand*. 53: 3-7.
- Galen JE, Pasetti MF, Tennant S, Ruiz-Olvera P, Sztein MB, Levine MM. 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunol Cell Biol*. 87: 400-12.
- 15
- Ghilardi AC, Tavechio AT, Fernandes SA. 2006. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 101: 281-6.
- 20
- Graham SM. 2002. Salmonellosis in children in developing and developed countries and populations. *Curr Opin Infect Dis*. 15: 507-12.

- Guzman CA, et al. 2006. Vaccines against typhoid fever. *Vaccine*. 24: 3804-11.
- Higgins NP, Hillyard DR. 1988. Primary Structure and Mapping of the *hupA* Gene of *Salmonella typhimurium*.
5 *Gene*. 170:5751-8.
- Hofer E, dos Reis EM. 1994. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 36:7-9.
- Hohmann EL, Oletta CA, Killeen KP, Miller SI. 1996.
10 *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J Infect Dis*. 173: 1408-14.
- Hone D, Attridge S, van den Bosch L, Hackett J. 1988. A chromosomal integration system for stabilisation of
15 heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. *Microb Pathog*. 5: 407-18.
- Jones BD, Ghori N, Falkow S. 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying specialized epithelial M cells of the
20 Peyer's patches. *J. Exp. Med*. 180: 15-23.
- Kelly A, Goldberg MD, Carroll RK, Danino V, Hinton JC, Dorman CJ. 2004. A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III

secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology. 150: 2037-53.

- 5 ➤ Kwon YM, Cox MM, Calhoun LN. 2007. *Salmonella*-based vaccines for infectious diseases. Expert Rev Vaccines. 6: 147-52.
- Loessner H, Endmann A, Leschner S, Bauer H, Zelmer A, Zur Lage S, Westphal K, Weiss S. 2008. Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. Int J Med Microbiol. 298: 21-6.
- 10 ➤ Mahoney RT, Krattiger A, Clemens JD, Curtiss R. 2007. The introduction of new vaccines into developing countries. IV: Global Access Strategies. Vaccine. 25: 4003-11.
- Mangan MW, Lucchini S, O Croinin T, Fitzgerald S, Hinton JC, Dorman CJ. 2011. The nucleoid associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology. 157: 1075 - 1087.
- 15
- 20 ➤ Marshall DG, Haque A, Fowler R, Del Giudice G, Dorman CJ, Douglas G, Bowe F. 2000. Use of the stationary phase inducible promoters, *spv* and *dps*, to drive heterologous antigen expression in *Salmonella* vaccine

strains. *Vaccine*. 18: 1298-306.

- Mastroeni P, Maskell D. 2006. *Salmonella* infections: Clinical, immunological and molecular aspects. 1° ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 5 ➤ Pinson V, Takahashi M, Rouviere-Yaniv J. 1999. Differential binding of the *Escherichia coli* HU, homodimeric forms and heterodimeric form to linear, gapped and cruciform DNA. *J Mol Biol*. 287: 485-97.
- Salyers AA, Whitt DD. 2002. *Bacterial Pathogenesis. A*
10 *Molecular Approach*. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
- Sambrook J. Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schechter LM, Jain S, Akbar S, Lee CA. 2003. The Small
15 *Nucleoid-Binding Proteins HNS, HU and Fis Affect hila* Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *American Society for Microbiology*. 71:5432-5.
- Strugnell RA, Wijburg LC. 2006. Newer vaccines against typhoid fever and gastrointestinal salmonellosis. In:
20 *Salmonella* infections: Clinical, immunological and molecular aspects. Ed. Mastroeni P, Maskell D. 1° ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 323-36.
- Strugnell RA, Maskell D, Fairweather N, Pickard D,

- Cockayne A, Penn C, Dougan G. 1990. Stable expression of foreign antigens from the chromosome of *Salmonella typhimurium* vaccine strains. *Gene*. 88: 57-63.
- 5 ➤ Swinger KK, Rice-Phoebe AR. 2004. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol*. 14: 28-35.
- 10 ➤ Tacket CO, et al. 1997. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune response in humans. *Infect Immun*. 65: 452-6.
- 15 ➤ Thanbichler M, Wang SC, Shapiro L. 2005. The Bacterial Nucleoid: A Highly Organized and Dynamic Structure. *J Cell Biochem*. 96: 506-21.
- 20 ➤ Wagner R. 2000. Transcription regulation in prokaryotes. 1^o ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Welkos S, O'brien A. 1994. Determination of median lethal and infectious doses in animal model systems. *Methods Enzymol*. 235: 29-39.
- Woc-Colburn L, Bobak DA. 2009. The expanding spectrum of disease due to salmonella: an international perspective. *Curr Infect Dis Rep*. 11: 120-4.

REINVIDICAÇÕES

1. Processo de construção de linhagem atenuada mutante de uma bactéria patogênica **caracterizado pelo** fato de que compreendem as seguintes etapas:

- 5 a) expressão das proteínas Gam, Bet e Exo do bacteriófago λ presentes no plasmídeo pKD46, promovendo a recombinação de fragmentos lineares no DNA alvo;
- b) troca alélica do gene codificador de HU pelo cassete de recombinação compreendendo um gene acessório; e
- 10 c) eliminação do gene acessório presente no cassete de recombinação.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a bactéria patogênica é selecionado do grupo compreendido por *Enterobacteriaceae*,
15 *Vibrionaceae*, *Francisellaceae*, *Legionellales*, *Pseudomonadaceae* ou *Pasteurellaceae*, incluindo os gêneros *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia* spp., *Yersinia* spp., e *Vibrio* spp

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** fato de que a bactéria patogênica ainda
20 ser escolhida dentre *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia* spp., *Yersinia* spp., e *Vibrio* spp.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada pelo** fato de que a bactéria patogênica é

preferencialmente a bactéria *S. enterica* sorovar Typhimurium (ST662).

5 5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o gene codificador de HU é uma sequência de DNA que apresenta homologia de pelo menos 80% com pelo menos uma sequência escolhida dentre *hupA* ou *hupB*.

10 6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o cassete de recombinação compreende pelo menos uma sequência capaz de silenciar pelo menos um gene codificador de HU em uma bactéria patogênica.

 7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que o cassete de recombinação é composto por iniciadores.

15 8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que os referidos iniciadores possuem 2 (duas) partes contínuas, sendo a primeira uma sequência de aproximadamente 40 bases homólogas ao gene alvo e a segunda aproximadamente 20 bases homólogas a uma região presente nos plasmídeos a serem utilizados.

20 9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que as regiões de homologia com o gene codificador de HU foram selecionadas a partir da sequência do banco de dados do projeto Genoma *S. enterica*

(NC_003197) e escolhidas de modo que fossem próximas aos códons de iniciação e terminação do gene.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que para a geração do cassete de recombinação, sequências de aproximadamente 40 pb homólogas ao gene alvo são geradas nas extremidades desse módulo por PCR.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o cassete de recombinação é o módulo flanqueado por sequências homólogas ao gene alvo.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que os referidos genes acessórios podem ser genes de resistência a antibióticos.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que os antibióticos são selecionados dos grupos compreendidos por ampicilina, canamicina, cloramphenicol, estreptomicina e tetraciclina.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que para a geração de mutantes, o plasmídeo pKD46 é transformado por eletroporação na linhagem hospedeira e os transformantes são submetidos à eletroporação com o cassete de recombinação.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a expressão dos genes γ , β e

exo inibe a degradação da fita linear de DNA, permitindo a recombinação do cassete por recombinação homóloga.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que os recombinantes são
5 selecionados utilizando-se as marcas de resistências carreadas pelo módulo de recombinação.

17. Processo, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado pelo** fato de que a remoção do cassete de resistência é feito por uma enzima.

10 18. Processo, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo** fato de que a referida enzima é preferencialmente a FLP recombinase.

19. Processo, de acordo com a reivindicação 17 ou 18, **caracterizado pelo** fato de que a referida recombinase é
15 expressa por um gene plasmidial.

20. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a transformação das linhagens selecionadas com o plasmídeo foi realizada por eletroporação.

20 21. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que gera uma linhagem duplo mutante.

22. Processo, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** fato de que a referida linhagem duplo

mutante e constituída por 662ST Δ hupA Δ hupB.

23. Processo, de acordo com a reivindicação 1 a 21, **caracterizado pelo** fato de que ainda apresenta uma menor probabilidade de reversão total da atenuação.

5 24. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o iniciador é composto por uma sequência homóloga a um gene codificador de HU.

10 25. Vetor vacinal **caracterizado pelo** fato de que o possui pelo menos um gene codificador de HU nocauteado e é capaz de estimular uma resposta imune contra uma infecção por uma bactéria patogênica.

26. Vetor vacinal, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato da resposta imune ser humoral e/ou celular.

15 27. Vetor vacinal, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado pelo** fato de que carrega antígenos, constituindo de linhagens vacinais multifatoriais.

20 28. Vacina conforme definida pelas reivindicações 1 a 27 **caracterizada pelo** fato de que compreender uma linhagem atenuada mutante de uma bactéria patogênica, onde a atenuação corresponde à deleção de um ou ambos os genes codificadores de HU.

29. Vacina, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizada pelo** fato de que a bactéria patogênica é

selecionada do grupo que compreende *Enterobacteriaceae*,
Vibrionaceae, *Francisellaceae*, *Legionellales*,
Pseudomonadaceae, *Pasteurellaceae* e combinações dos mesmos.

30. Vacina, de acordo com as reivindicações 28 e 29,
5 **caracterizada pelo** fato de que a bactéria patogênica é
selecionada dentre *Salmonella* spp., *Shigella* spp.,
Escherichia spp., *Yersinia* spp., *Vibrio* spp e combinações
das mesmas.

31. Vacina, de acordo com a reivindicação 30,
10 **caracterizada pelo** fato de que a bactéria patogênica é
preferencialmente *S. enterica*, sorovar Typhimurium (662ST).

32. Vacina, de acordo com a reivindicação 28,
caracterizada pelo fato de que o gene codificador de HU é
uma sequência genômica que apresente homologia de pelo
15 menos 80% com pelo menos uma sequência escolhida dentre
hupA ou *hupB*.

33. Uso da vacina conforme definido pelas
reivindicações 28 a 32 **caracterizado pelo** fato de que é
para induzir proteção contra doenças bacterianas.

20 34. Uso, de acordo com a reivindicação 33,
caracterizado pelo fato de que a referida doença bacteriana
é preferencialmente salmonelose.

35. Uso da vacina conforme definido pelas
reivindicações 28 a 32 **caracterizado pelo** fato de ser como

um potencial uso como vetor vacinal multifatorial expressando antígenos de outras doenças.

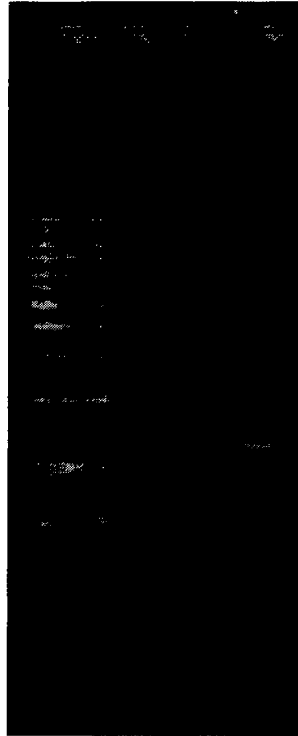
36. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o duplo mutante $\Delta hupA\Delta hupB$ com os *primers* hupBDT compreende a SEQ ID No. 1

37. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o duplo mutante $\Delta hupA\Delta hupB$ sequenciado com *primer* hupADT2f compreende a SEQ ID No. 2.

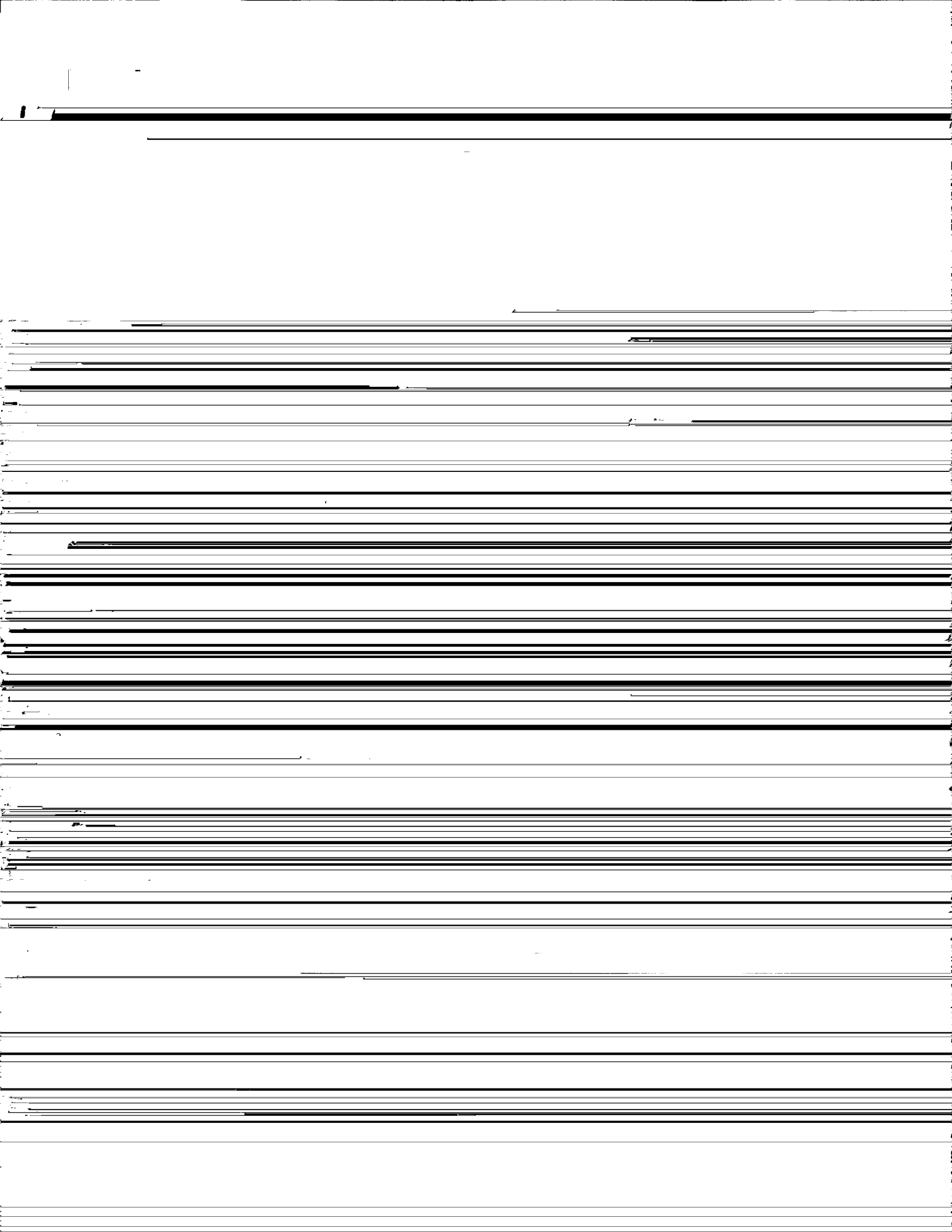
38. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o duplo mutante $\Delta hupA\Delta hupB$ sequenciado com o *primer* hupADT2r compreende a SEQ ID No. 3.

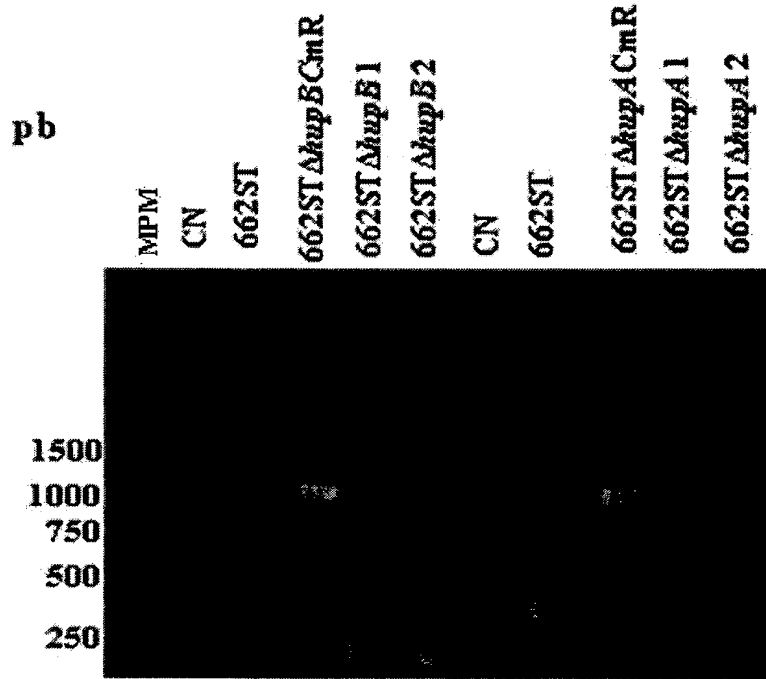
39. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que a sequência dos iniciadores externos aos genes *hupA* e *hupB* compreende as SEQ ID Nos 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

MPM CN hupA

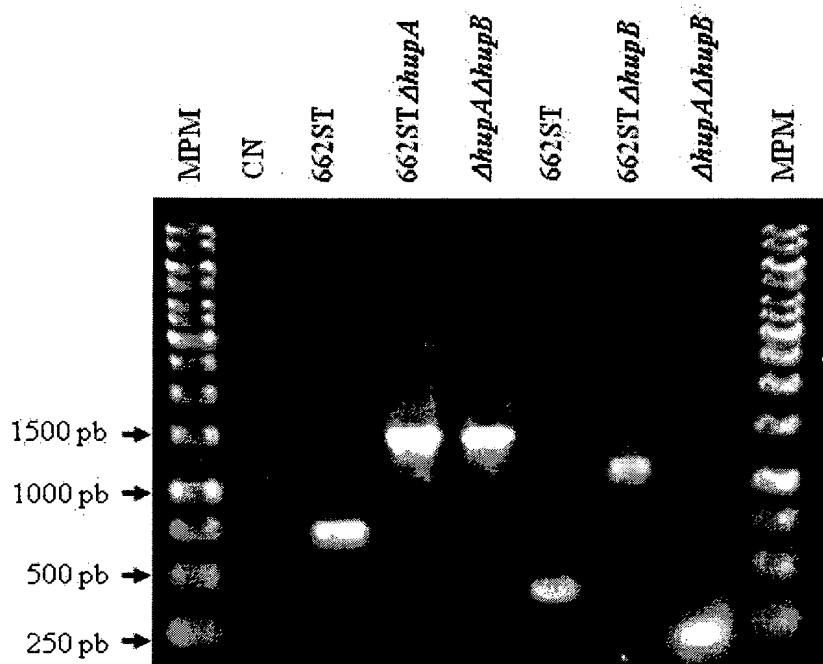


Anexo 1

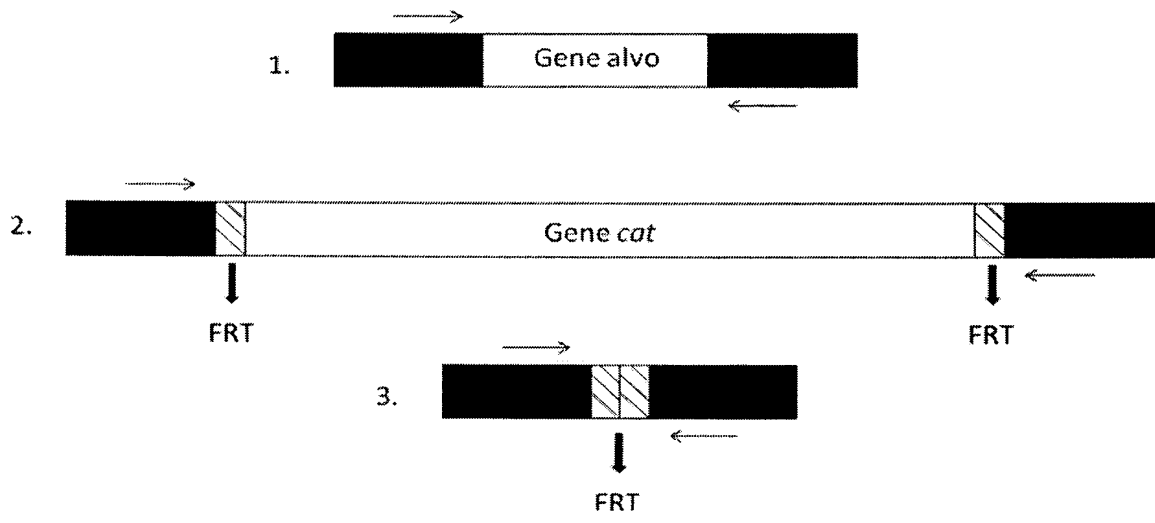




Anexo 3



Anexo 4



Anexo 5

Resumo da Patente de Invenção para: **"PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DE LINHAGEM ATENUADA MUTANTE DE UMA BACTÉRIA PATOGÊNICA, VACINA, VETOR VACINAL E USO DA REFERIDA VACINA"**.

A presente invenção revela uma nova alternativa para a
5 prevenção de salmonelose, a partir de mutantes capazes de
promover imunização do hospedeiro. Em especial tais
mutantes são nulos para os genes *hupA* e/ou *hupB* de HU e
foram testados quanto a atenuação da virulência e
capacidade de desencadear resposta imune efetiva e
10 protetora contra a salmonelose, em especial a salmonelose
murina, gerando resultados promissores. Adicionalmente, a
presente invenção é destinada a um processo de produção
desta linhagem atenuada, capaz de promover imunização, a
vetores vacinais e vacinas para o tratamento de salmonelose
15 e a seu uso no combate a tal infecção e possivelmente
outras doenças, quando se tratando de vetores
multifatoriais.