



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0706003-3 B1**



**(22) Data do Depósito: 26/10/2007**

**(45) Data de Concessão: 08/10/2019**

---

**(54) Título:** SEQUÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO AMA-1 DE PLASMODIUM VIVAX, PROTEÍNA RECOMBINANTE AMA-1 E ADENOVÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADO QUE EXPRESSA O ANTÍGENO AMA-1 RECOMBINANTE

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/30; C07K 14/445; C12R 1/90; A61K 39/002.

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

**(72) Inventor(es):** RICARDO TOSTES GAZZINELLI; OSCAR BRUNA ROMERO; LEONEIDE ERICA MADURO BOUILLET; IRENE SOARES.

**(57) Resumo:** SEQUÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO AMA-1 DE PLASMODIUM VIVAX, PROTEÍNA RECOMBINANTE AMA-1 E ADENOVÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADO QUE EXPRESSA O ANTÍGENO AMA-1 RECOMBINANTE. A presente invenção diz respeito à construção de uma sequência genética modificada do antígeno AMA-1 de Plasmodium vivax, uma proteína recombinante codificada pela referida sequência e um adenovírus geneticamente modificado que expressa o antígeno AMA-1 recombinante. A invenção é útil para a imunização de mamíferos contra malária.

**"SEQÜÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO AMA-1 DE PLASMODIUM VIVAX, PROTEÍNA RECOMBINANTE AMA-1 E ADENOVÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADO QUE EXPRESSA O ANTÍGENO AMA-1 RECOMBINANTE"**

5 A presente invenção descreve a construção de uma seqüência genética modificada do antígeno AMA-1 de *Plasmodium vivax*, uma proteína recombinante codificada pela referida seqüência e um adenovírus geneticamente modificado que expressa o antígeno AMA-1 recombinante.

10 O antígeno 1 da membrana apical (AMA-1) está presente em todas as espécies de *Plasmodium* (HODDER, A.N.; CREWTER, P.E.; ANDERS, R.F. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect. Immun.* v 69, nº5; p.3286-3294, 2001). AMA-1 é armazenada no micronema após a síntese e subsequentemente translocada para a superfície do parasito via roptria ou durante a invasão da célula hospedeira.

15 Em todas as espécies de plasmódio, AMA-1 é sintetizada como uma proteína transmembrana de 66KDa, exceto para *P.falciparum*. É uma típica proteína integral com um ectodomínio N-terminal, uma região transmembrana e um pequeno domínio citoplasmático C-terminal (KOCKEN, C.H.M.; WITHERS-MARTINEZ, C.; DUBBELD, M.A.; WEL, A.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M.J; THOMAS, A.W. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect. Immun.* v.70, nº8; p.4471-4476, 2002).

25 Em todos os *Plasmodium* caracterizados, o gene AMA-1 apresenta 16 resíduos de Cys conservados no ectodomínio (PIZARRO, J.C.; NORMAND, B.V.; et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science.* v.308, p.408-411, 2005) e é dividido em três domínios definidos por 8 pontes dissulfeto (HODDER, A.N.; CREWTER, P.E.; MATTHEW, M.L.S.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; ANDERS, R.F. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *The Jour. Biolog. Chem.* v 271, nº 46; p.29446-29452, 30 1996).

A estrutura cristalográfica do ectodomínio de AMA-1 de *P.vivax* (PvAMA-1), correspondente aos resíduos Pro<sup>43</sup> a Leu<sup>487</sup> confirma a divisão em três domínios, e que os domínios I e II são estruturalmente similares a outras proteínas pertencentes a superfamília PAN, cujas proteínas têm função relacionadas a adesão e ligação a 35 receptores ou a outras proteínas. Além disso, o domínio II possui uma região de

desordem ou mobilidade, correspondente aos resíduos 295 a 334, denominada loop do domínio II (PIZARRO, J.C.; NORMAND, B.V.; et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science*. v.308, p.408-411, 2005

Em *P. falciparum*, AMA-1 é produzida como um polipeptídeo de 83Kda que sofre processamento após a síntese em que um pequeno fragmento N-terminal é proteoliticamente clivado, dando origem a proteína madura de 62-Kda (CREWETHER, P.E.; CULVENOR, J.G.; SILVA, A.; COOPER, J.A.; ANDERS, R.F. *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp Parasitol*. v 70, nº 2, p. 193-206, 1990).

A capacidade desta molécula na indução da resposta imune protetora depende da estabilidade de sua conformação por pontes dissulfetos (HODDER, A.N.; CREWETHER, P.E.; MATTHEW, M.L.S.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; ANDERS, R.F. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *The Jour. Biolog. Chem.* v 271, nº 46; p.29446-29452, 1996), já que anticorpos inibitórios reagem preferencialmente com epítomos com conformação estabilizada por pontes dissulfeto (HODDER, A.N.; CREWETHER, P.E.; ANDERS, R.F. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect. Immun.* v 69, nº 5; p.3286-3294, 2001).

A sequência de AMA-1 é relativamente conservada entre as espécies de *Plasmodium*, com o nível de identidade das seqüências de aminoácidos excedendo 50% em comparações entre todas as seqüências conhecidas (CHENG, Q.; SAUL, A. Sequence analysis of the apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v 65; p.183-187, 2004). Além disso, AMA-1 não apresenta seqüências repetitivas e o polimorfismo encontrado em outros antígenos como MSP-1 e MSP-2 (ANDERS, R.F.; SMYTHE, J.A. Polymorphic antigens in *Plasmodium falciparum*. *Blood*. v.74; p.1865-1875, 1989).

A função biológica de AMA-1 ainda não é conhecida, mas há evidências que esta proteína esteja envolvida no processo de invasão do eritrócito pelo merozoíto (KOCKEN, C.H.M.; WITHERS-MARTINEZ, C.; DUBBELD, M.A.; WEL, A.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M.J.; THOMAS, A.W. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect. Immun.* v.70, nº8; p.4471-4476, 2002, LI, F.; DLUZEWSKI, A.; COLEY, A.M.; THOMAS, A.; TILLEY, L.; ANDERS, R.F.; FOLEY, M. Phage-displayed peptides bind to the malarial protein apical membrane

antigen-1 and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. *The Jour. Biolog. Chem.* v 277, nº52; p.50303-50310, 2002).

Anticorpos monoclonais direcionados contra AMA-1 foram capazes de inibir a invasão de merozoítos, evidenciando que AMA-1 tem atuação no processo de invasão (CREWETHER *et al.*, 1990). Mitchell e colaboradores (2004) sugerem que esta proteína é diretamente responsável pela reorientação dos merozoítos durante o processo de invasão ou que AMA-1 pode iniciar a junção de contato e que depende de proteínas de ligação Duffy para que o processo ocorra efetivamente (MITCHELL, G.H.; THOMAS, A.W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A.R.; BANNISTER, L.H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect. Immun.* v 72, nº1; p.154-158, 2004).

AMA-1 está envolvida também na invasão de hepatócitos, a proteína deixa de ser expressa depois da invasão do hepatócito pelo esporozoíta e é re-expressa somente nos merozoítas. A inibição da invasão de esporozoítas por anticorpos anti-AMA-1 indica que AMA-1 pode ser considerada como potencial candidata a vacina multi-estágio da malária, sendo alvo tanto no estágio eritrócítico como no pré-eritrocítico (SILVIER, O.;FRANETICH,J.F.;CHARRIN,S.;MUELLER,M.S. *et al.* A role for apical antigen 1 during invasion of hepatocytes by *P.falciparum* sporozoites. *J Biol Chem.* V. 279(10), p.9490-6, 2004).

Entre os veículos de imunização, os mais promissores para a indução de respostas imunes mediadas simultaneamente por linfócitos T e B são as vacinas de vírus recombinantes, sendo os adenovírus bastante promissores, com algumas vacinas já em avançados testes clínicos para AIDS.

Sabe-se que anticorpos contra AMA-1 são capazes de inibir a multiplicação do parasito *in vitro* e *in vivo*, quando interagem com a superfície de merozoítas. Estudos de vacinas com AMA-1 em modelos animais (camundongos e macacos) demonstraram que a imunização com esta proteína purificada ou recombinante induziu resposta imune protetora quando os animais foram desafiados com espécies de *Plasmodium*.

Não existe vacina disponível contra a malária. Porém, muitas pesquisas apontam favoravelmente para a viabilidade de uma vacina. Os principais argumentos existentes que apóiam essa tese são: (i) já foi conseguida proteção completa em modelos animais, assim como no ser humano, utilizando esporozoítas irradiados; (ii) os adultos que moram em áreas endêmicas têm menos malária que as crianças,

sugerindo que é possível a indução de imunidade acumulativa por exposição repetitiva; (iii) os soros de pacientes adultos de áreas endêmicas protegem outros adultos. Os principais obstáculos a serem vencidos para conseguir uma vacina efetiva contra a malária são: um melhor entendimento da biologia na interação parasito-hospedeiro e sua correlação com a resposta imune protetora, a complexidade do ciclo do plasmódio, uma grande variedade de antígenos e a imunogenicidade, sobretudo celular, dos antígenos administrados deve ser melhorada.

Diante destes obstáculos, a presente invenção busca o desenvolvimento de um adenovírus humano tipo 5 não replicativo capaz de expressar, em células HEK293A, o antígeno vacinal AMA-1 de *Plasmodium vivax* (PvAMA-1). A utilização de um vetor viral justifica-se pelo fato do mesmo induzir principalmente uma resposta imune celular e por atuar como adjuvante potencializando a resposta imune. O antígeno vacinal expresso pelo adenovírus recombinante corresponde ao ectodomínio de AMA-1 de *P.vivax*, referente aos resíduos Pro<sup>43</sup> a Leu<sup>487</sup> da cepa Bel 12 de *P.vivax*, fusionado ao peptídeo sinal do vírus influenza(HASS) que permite direcionar a AMA-1 para o meio extracelular induzindo resposta imune humoral que leva a geração de anticorpos específicos.

A possibilidade de uma vacina recombinante contra *P. vivax* utilizando Adenovírus humano tipo 5 como vetor, capaz de expressar o antígeno 1 da membrana apical (AMA-1), deve-se ao fato desta proteína ser altamente imunogênica. Sabe-se que anticorpos contra AMA-1 são capazes de inibir a multiplicação do parasito *in vitro* e *in vivo*, quando interagem com a superfície de merozoítas (MITCHELL, G.H.; THOMAS, A.W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A.R.; BANNISTER, L.H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect. Immun.* v 72, nº1; p.154-158, 2004)). Estudos de vacinas com AMA-1 em modelos animais (camundongos e macacos) demonstraram que a imunização com esta proteína purificada ou recombinante induziu resposta imune protetora quando os animais foram desafiados com espécies de *Plasmodium* (LI, F.; DLUZEWSKI, A.; COLEY, A.M.; THOMAS, A.; TILLEY, L.; ANDERS, R.F.; FOLEY, M. Phage-displayed peptides bind to malarial protein apical membrane antigen-1 and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. *The Jour. Biolog. Chem.* v 277, nº52; p.50303-50310, 2002).

A construção de um adenovírus humano tipo 5 não replicativo que expressa o antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) de *P.vivax*. AMA-1 é extremamente imunogênica capaz de induzir resposta imune no hospedeiro. Vários estudos têm

confirmado, nos últimos anos, o grande potencial da utilização de adenovírus do tipo 5 recombinantes (Adr5) como vetores vacinais. Huarte et al. (2006) demonstraram que estes vírus são capazes de induzir a produção de interferon do tipo I pelas células dendríticas sem interferir na expressão do transgene, o que é de grande importância já que o interferon do tipo I atua na modulação da resposta imune adaptativa (HUARTE, E.; LARREA, E.; HERNÁNDEZ-ALCOCEBA, R.; ALFARO, C.; MURILLO, O.; ARINA, A.; TIRAPU, I.; AZPILICUETA, A.; HERCAS-STUBBS, S.; BORTOLANZA, S.; PEREZ-GARCIA, J.L.; CIVEIRA, M.P.; PRIETO, J.; RIEZU-BOJ, J.I.; MELERO, I. Recombinant adenoviral vectors turn on the type 1 interferon system without inhibition of transgene expression and viral replication. *Molecular Therapy*, v.14. p.129-38, 2006).

Santra et al. (2005) mostraram que os Adr5 são capazes de gerar tanto resposta imune humoral quanto celular duradouras. Além disto, Yang et al. (2006) revelaram que a vacinação com Adr5 desencadeou um fenótipo efetor duradouro nas células T CD8 específicas, além de uma imunidade protetora de longa duração (SANTRA, S.; SEAMAN, M.S.; XU, L.; BAROUCH, D.H.; LORD, C.I.; LIFTON, M.A.; GORGONE, D.A.; BEAUDRY, K.R.; SVEHLA, K.; WELCHER, B.; CHAKRABARTI, B.K.; HUANG, Y.; YANG, Z.Y.; MASCOLA, J.R.; NABEL, G.J.; LETVIN, N.L. Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *Journal of Virology*, v.79, n.10. p.6516-22, 2005).

Resumidamente, nesta invenção, o vírus recombinante foi gerado por recombinação homóloga, sendo que foi inserido no genoma do adenovírus a região codificadora para ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* contido no vetor de transferência pAdCMV-Link-1. A proteína recombinante expressa pelo adenovírus corresponde a sequência dos aminoácidos 43 – 487 de AMA-1 de *P. vivax* da cepa BEL 12, proveniente de um paciente de Belém-PA, que foi obtida a partir do plasmídeo pHIS-AMA-1 (RODRIGUES, M.H.C.; RODRIGUES, K.M.; OLIVEIRA, T. R.; CÔMODO, A.N.; RODRIGUES, M.M.; KOCKEN, C.H.M.; THOMAS, A.W.; SOARES, I.S. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int. J. Parasitol.* v35, p185-192, 2005). Além disso, esta proteína recombinante apresenta também um peptídeo sinal do vírus influenza (HASS) que permite a secreção da mesma no meio extracelular. Para a geração do Adenovírus recombinante (AdAMA-1) foi elaborada uma estratégia de clonagem do gene que codifica para AMA-1 de *Plasmodium vivax* no pAdCMV-Link-1.

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

3/

#### EXEMPLO 01: Iniciadores específicos para AMA-1

As seqüências de genes que codificam para as proteínas AMA-1 de *P.vivax* foram amplificadas por PCR a partir de plasmídeo pHIS-AMA-1, com os iniciadores senso 5' GCA GAT ATC GGC AGC AGC CAT CAT CAT e anti-senso 5' GGT ACC TTA TAG TAG CAT CTG CTT GTT. Os códons em vermelho são os sítios para as enzimas de restrição Eco RV e Kpn I, respectivamente, e o códon em azul corresponde ao códon de terminação. As reações de PCR foram feitas com a enzima de alta fidelidade Pfx (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante e nas seguintes condições de amplificação: um ciclo de 5min a 94°C, 38 ciclos de 40seg a 94°C, 45seg a 45°C e 1:30min 68°C e um ciclo final de extensão de 4min a 68°C.

#### EXEMPLO 02: Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos

Seqüência de nucleotídeos correspondentes ectodomínio de AMA-1 de *P.vivax*, com o peptídeo sinal HASS, os sítios das enzimas de restrição Eco RV e Kpn I, com o códon de terminação estão descritas na listagem de seqüência (Seq ID nº 01) (Tabela 1).

Tabela 1. A localização das seqüências de nucleotídeos da proteína recombinante (Seq ID. nº01).

| Localização dos Nucleotídeos | Seqüência   | Identificação         |
|------------------------------|-------------|-----------------------|
| 1-81                         | ATG.....ATG | Peptídeo sinal HASS   |
| 82-87                        | GAT ATC     | Sítio de Eco RV       |
| 88-135                       | CCA.....CCG | Resíduo do pHIS-AMA-1 |
| 136-1470                     | CCT.....CTA | AMA-1                 |
| 1471-1473                    | TAA         | Códon de terminação   |
| 1474-1479                    | GGT ACC     | Sítio de KpnI         |

Seqüência de aminoácidos correspondentes ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax*, com o peptídeo sinal HASS, os sítios das enzimas de restrição Eco RV e Kpn I, com o códon (Seq. ID nº 02) (Tabela 2).

Tabela 2. A localização dos aminoácidos da proteína recombinante (Seq ID nº02).

| Seqüência correspondente     | Aminoácidos |
|------------------------------|-------------|
| HASS                         | 1 - 29      |
| AMA-1                        | 30 - 490    |
| Códon de terminação          | 491 - 496   |
| Sítio de clivagem para Kpn I | 497 - 502   |

A seqüência de nucleotídeos da proteína recombinante foi confirmada por seqüenciamento, utilizando os iniciadores específicos para AMA-1, citados acima, e para o vetor pAdCMV-Link-1, sendo o senso correspondente a região do promotor do CMV (5'ACGGGGATTTCCTCAAGTCT 3'), e o anti-senso correspondente a cauda poli A do SV40 (5' CACTGCATTCTAGTTGTGG 3'). A figura 2 apresenta a localização dos iniciadores.

### EXEMPLO 03: Estratégia de clonagem

#### 15 - Clonagem no pAdCMV-link 1.

Para a clonagem no pAdCMV-Link1 o produto de PCR correspondente a AMA-1 e o plasmídeo foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRV e Kpn I (Figura 4). Após as digestões os fragmentos desejados foram purificados pelo kit Qiaquick gel extraction (QIAGEN). O produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias XL-1 blue. Desta forma foi criado o pAdCMV-AMA-1 e figura 4 mostra a seleção de clones positivos.

#### - Clonagem do peptídeo sinal HASS no pAdCMV-AMA-1

Foi utilizado o pAd32.1 que contém o peptídeo sinal HASS. O pAdCMV-AMA-1 foi digerido com Bgl II que lineariza o plasmídeo, e o pAd32.1 com BamHI, originando um fragmento de 717pb, sendo 92 bases correspondentes ao HASS e as 625 bases restantes serviram para facilitar a clonagem(Figura5).

Bgl II e BamHI possuem extremidades compatíveis, ou seja, extremidades geradas com Bgl II podem ser diretamente ligadas as extremidades de BamHI, mas seus sítios de restrição não são regenerados, conforme representado na figura 6.

3X

5 Após digestão os fragmentos foram então purificados e ligados conforme mencionado anteriormente. Nesta clonagem foi criado o pAdCMV-HASS-AMA-1 parcial. A triagem dos clones positivos foi feita com Not I, sendo que os clones positivos apresentam fragmentos de 2200pb e clones negativos 1500pb. Na figura 7 mostra a seleção de clones positivos.

- Digestão com EcoRV do pAdCMV-HASS-AMA-1 parcial

10 Os clones positivos pAdCMV-HASS-AMA-1 foram digeridos com EcoRV para retirada das 625 bases adicionais. O fragmento maior de 8176 bases foi recortado do gel de agarose para purificação com kit Qiaquick gel extraction (QIAGEN). O plasmídeo linearizado foi religado com a T4 DNA ligase, originando o pAdCMV-HASS-AMA-1. Assim, nesta clonagem foi criado o pAdCMVHASS-AMA-1. A figura 8  
15 demonstra esta etapa de clonagem.

#### **EXEMPLO 04: PCR E RT-PCR a partir de células HEK 293 infectadas com os adenovírus recombinantes para confirmar a presença do transgene**

20 Amplificações de 1,4kb com os iniciadores específicos para AMA-1 foram obtidas a partir de DNA e RNA extraídos de células HEK293A infectadas com o vírus recombinante AdAMA-1. Para o RNA total fez-se a reação de transcrição reversa e o cDNA originado foi tratado com DNase. Além dos iniciadores específicos para AMA-1 utilizamos também iniciadores específicos para gene E4 de adenovírus que amplificam um fragmento de 500pb. Estas amplificações a partir de DNA viral e RNA viral indicam  
25 que o adenovírus recombinante está expressando a AMA-1. A figura 9 demonstra as amplificações.

#### **EXEMPLO 05: Detecção das proteínas recombinantes por anticorpos**

30 A detecção das proteínas recombinantes por anticorpos foi feita por western blot. Foram utilizados como anticorpos primários soro de camundongos BALB/c imunizados com as proteínas recombinantes. Como anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a peroxidase (Zymed).

O extrato celular de células HEK293A infectadas com adenovírus recombinante AdAMA-1 apresentou intensa reatividade com soro de camundongos BALB/c imunizados com AMA-1. Este resultado confirma a expressão de AMA-1 pelo AdAMA-1. Os animais foram imunizados por via subcutânea com 200µl de emulsão Montanide ISA 720 (30:70 proteína/óleo) com 20µg de proteína AMA-1 purificada. Foram feitas duas imunizações com intervalo entre elas de 3 semanas, em cada imunização, foram aplicados 50µl em 4 pontos diferentes no dorso do animal, totalizando os 200µl. Os soros foram coletados com 14 após a última imunização. A figura 10 apresenta a reatividade de AMA-1, expressa em *E.coli* e em AdAMA-1, com soro murino.

10

### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

**FIGURA 01:** A: Vetor de transferência pAdCMV-Link-1: promotor do Citomegalovírus (CMV), Sítio de clonagem, sítio de poliadenilação (poly A), regiões de homologia com HAdV5. m.u: unidade de mapa. B. HASS-AMA-1 clonado no pAdCMV-Link-1. O peptídeo sinal foi clonado no sítio de Bgl II, que após a clonagem este sítio foi perdido e AMA-1 foi clonada nos sítios de Eco RV e kpn I. \* Sítios de enzimas utilizados para clonagem de HASS- AMA-1: Bgl II , Eco RV e Kpn I.

**FIGURA 02:** Representação esquemática do sítio de clonagem do pAdCMV-AMA-1, promotor CMV e cauda poli A do SV40. A sequência correspondente a HASS-AMA-1 localiza-se entre o sítio de Not I e kpn I. A localização dos iniciadores utilizados está representada por setas.

**FIGURA 03:** Representação esquemática da recombinação homóloga entre os plasmídeos pAdCMV-HASS-AMA-1 e o pJM17: as regiões de homologia no pAdCMV-HASS-AMA-1 (Ad 0-1 e Ad 9 -16) sofrem pareamento e recombinação com o pJM17 e o cassete de expressão com AMA-1 é transferido para o genoma do adenovírus 5, eliminando-se E1 com a inserção pBR.

30

**FIGURA 04:** Seleção de clones positivos por digestão com as enzimas de restrição EcoRV e Kpn I. Clones positivos apresentam um fragmento de 1431pb. PM:1kb promega, 1 a 4: clones positivos pAdCMV-AMA-1.

**FIGURA 05:** Representação esquemática do fragmento de 717pb do pAd32.1, que foi inserido no pAdCMV-AMA-1, sendo que as 92 bases iniciais correspondem a sequência HASS.

5 **FIGURA 06:** Sítios de restrições de BamHI e Bgl II com extremidades compatíveis.

**FIGURA 07:** Seleção de clones positivos por digestão com Not I. Clones positivos apresentam um fragmento de 2200pb. PM: 1kb promega, 2, 4: Clones positivos, 6: clone negativo, 1, 3 e 5: DNA plasmidial não digerido dos respectivos clones nas canaletas 2, 4 e 6.

**FIGURA 08:** Processo de clonagem do HASS no pAdCMV-AMA-1: 1: Digestão de clone positivo pAdCMV-HASS-AMA-1 parcial com Not I, originando um fragmento de 2200pb 2: Digestão do mesmo clone com Eco RV, originando um fragmento de 625pb que foi eliminado do vetor. 3: Novo clone pAdCMV-HASS-AMA-1, que ao ser digerido com Not I origina um fragmento com 1600pb, correspondente a sequência de HASS-AMA-1.

**FIGURA 09:** PCR e RT-PCR a partir de DNA e RNA viral extraídos de HEK293A infectadas com AdAMA-1. Amplicons de 500pb foram obtidos com iniciadores específicos para o gene E4 de adenovírus (canaletas 1 a 3 - DNA viral e canaletas 4 a 7 - RNA viral) e amplicons de 1,4Kb foram obtidos com iniciadores específicos para AMA-1 (canaletas 8 a 11 - DNA viral e canaletas 12 a 16 - RNA viral). 1: CP (controle positivo) : pAdCMVAMA-1, 2: DNA viral, 3: CN (controle negativo), 4: RT-PCR de RNA tratado com DNase, 5: PCR de RNA tratado com DNase, 6: CP: pAdCMVAMA-1, 7: CN, 8: Padrão de peso molecular 1Kb Promega, 9: CP: pAdCMVAMA-1, 10: DNA viral, 11: CN, 12: RT-PCR de RNA tratado com DNase, 13: PCR de RNA tratado com DNase, 14: CN, 15: CP.

30 **FIGURA 10:** AMA-1 recombinante expressa em *E.coli* e pelo Adenovírus detectadas por anticorpos específicos utilizando soro de animais imunizados com AMA-1. rAMA-1(Expressa em *E.coli*), AdAMA-1(Expressa pelo adenovirus), CN: Controle negativo.

## REIVINDICAÇÕES

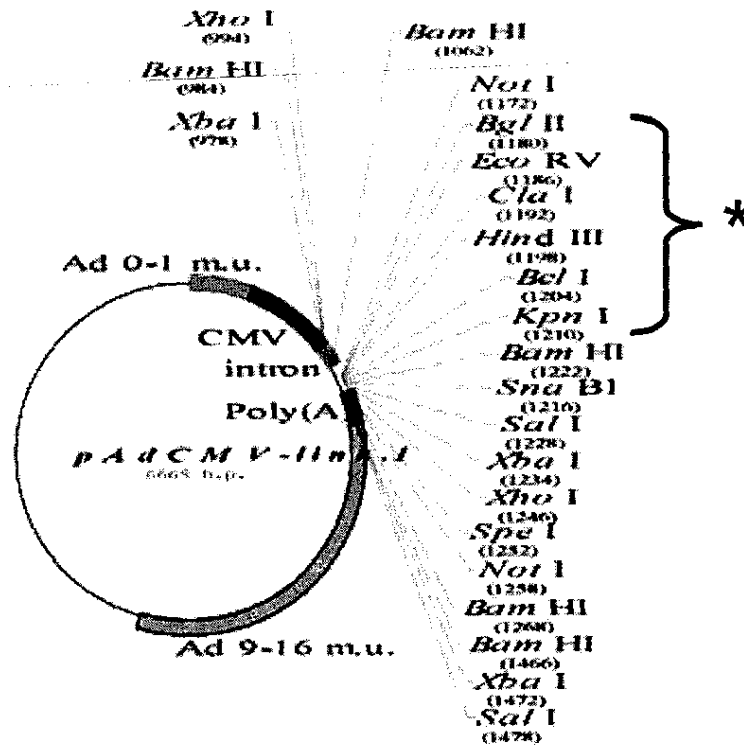
**1- SEQUÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO AMA-1 DE PLASMODIUM VIVAX** caracterizada pela sequência de DNA consistir na Seq. ID N°(1).

5        **2- PROTEÍNA RECOMBINANTE AMA-1** caracterizada pela sequência de aminoácidos consistir na Seq. ID N°(2).

**3- ADENOVÍRUS DO TIPO 5 GENETICAMENTE MODIFICADO QUE EXPRESSA O ANTÍGENO AMA-1 RECOMBINANTE** caracterizado por compreender a Seq. ID N°(1).

FIGURA 01

A



B

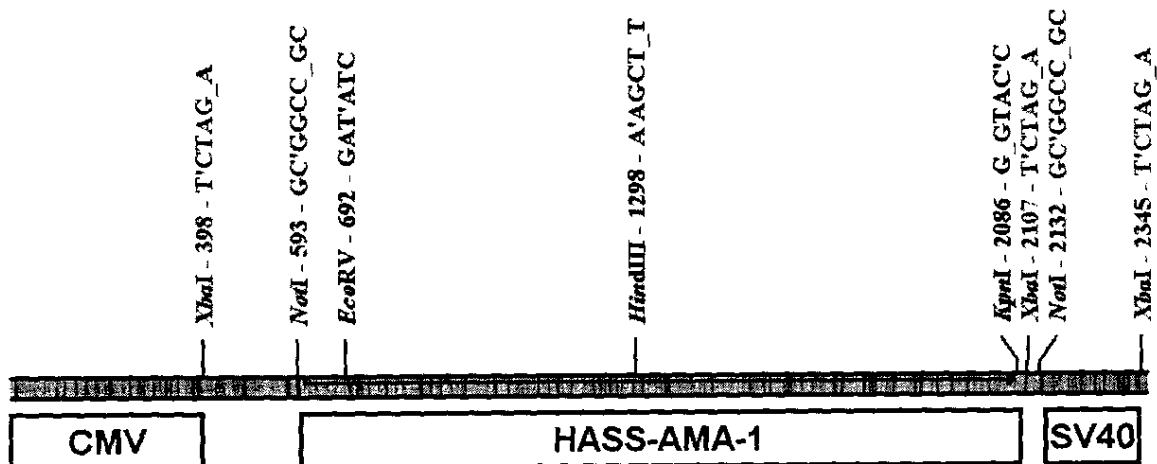


FIGURA 02

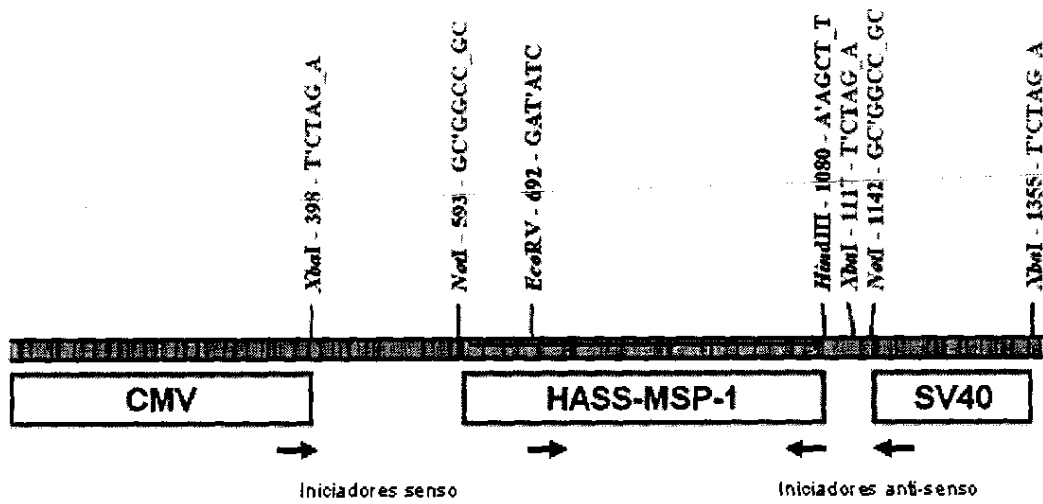
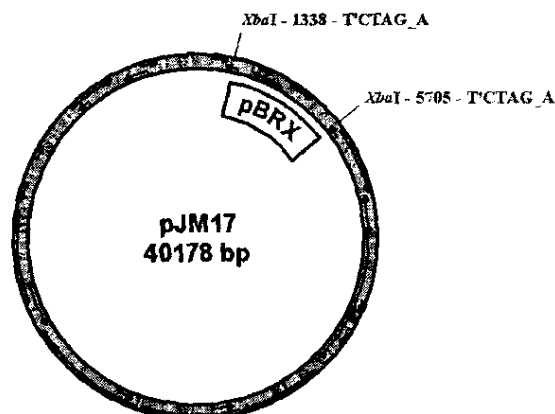


FIGURA 03

A



B

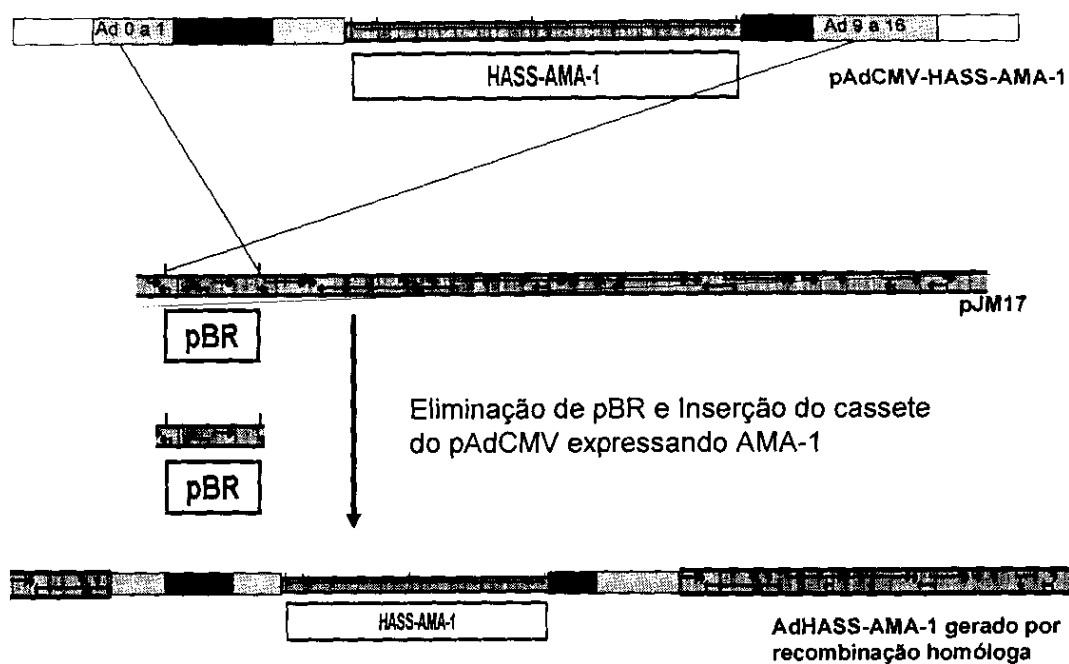
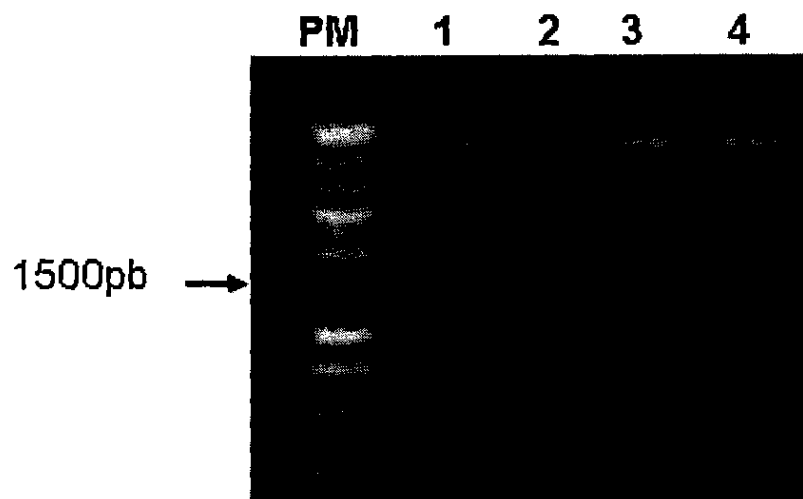


FIGURA 04



**HASS**  
722 bp

**BamHI - 1 - G'GATC C**

**EcoRV - 93 - GAT'ATC**

**BamHI - 713 - GAT'ATC**  
**BamHI - 717 - G'GATC C**

GC% in 1 bp blocks

BamHI    G' GATC C      ➡      A' GATC C  
Bgl II    A' GATC T           G' GATC T

| Lane | Marker                 | Band(s) | Condition |
|------|------------------------|---------|-----------|
| PM   | 2500pb, 2000pb, 1500pb | None    | -         |
| 1    | 2500pb, 2000pb, 1500pb | ~2500pb | +         |
| 2    | 2500pb, 2000pb, 1500pb | ~2000pb | +         |
| 3    | 2500pb, 2000pb, 1500pb | ~1500pb | +         |
| 4    | 2500pb, 2000pb, 1500pb | ~2500pb | +         |
| 5    | 2500pb, 2000pb, 1500pb | ~2000pb | +         |
| 6    | 2500pb, 2000pb, 1500pb | ~1500pb | -         |

FIGURA 08

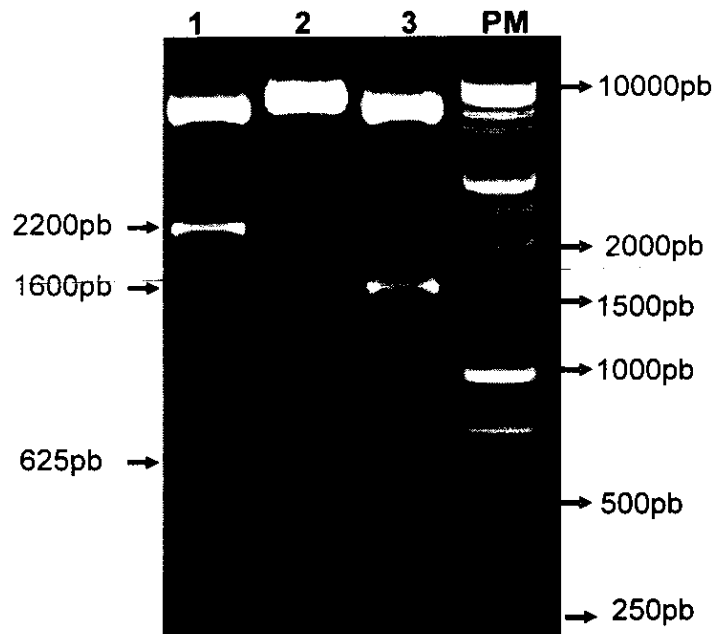


FIGURA 09

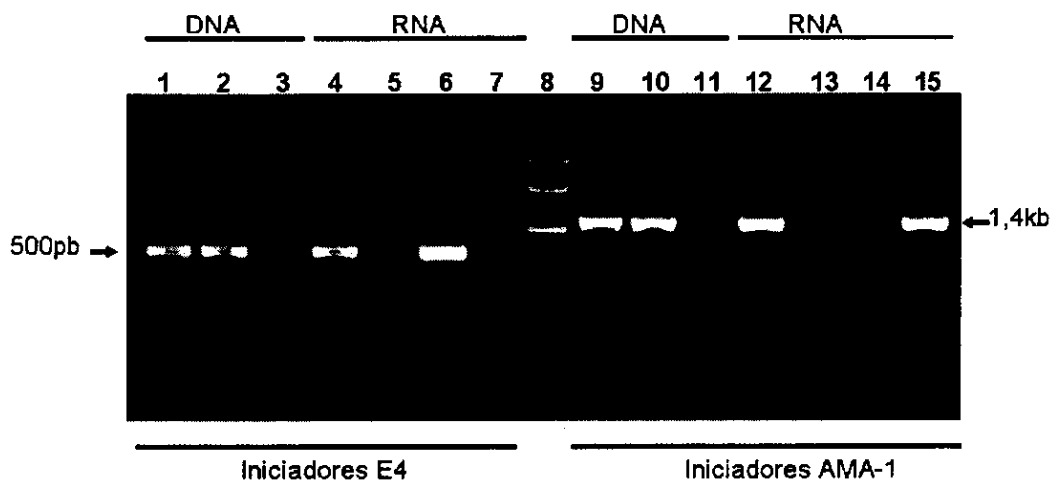


FIGURA 10

