



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

(21) BR 102018075339-8 A2



(22) Data do Depósito: 06/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 16/11/2021

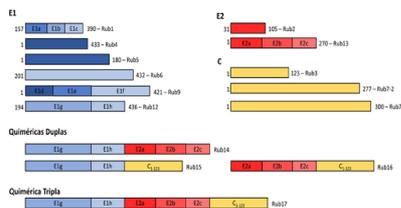
(54) **Título:** PROTEÍNA RECOMBINANTE, SEQUÊNCIA DE DNA SINTÉTICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO, KIT PARA DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA, USO DE PELO MENOS UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE, E, MÉTODOS PARA PRODUIR UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE E PARA DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/19; C12N 15/40; A61K 39/20; A61P 31/14.

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ; INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ - IBMP; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR.

(72) **Inventor(es):** MARCO AURÉLIO KRIEGER; NILSON IVO TONIN ZANCHIN; DANILO SANTOS EUGÊNIO.

(57) **Resumo:** PROTEÍNA RECOMBINANTE, SEQUÊNCIA DE DNA SINTÉTICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO, KIT PARA DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA, USO DE PELO MENOS UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE, E, MÉTODOS PARA PRODUIR UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE E PARA DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA . A presente invenção refere-se a um método para diagnóstico de rubéola a partir de proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes desenvolvidas podem ser utilizadas isoladamente ou em conjunto, apresentam alta pureza e capacidade de discriminação do vírus da rubéola. A invenção também permite o desenvolvimento de uma vacina de segunda geração, da classe de subunidade. A invenção se refere, de forma geral, a proteína recombinante, sequência de DNA sintético, vetor de expressão, célula hospedeira, composição, kit para diagnóstico de rubéola, uso de pelo menos uma proteína recombinante, e, métodos para produzir uma proteína recombinante e para diagnóstico de rubéola.



PROTEÍNA RECOMBINANTE, SEQUÊNCIA DE DNA SINTÉTICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO, KIT PARA DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA, USO DE PELO MENOS UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE E PARA DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se ao campo da medicina diagnóstica e da biotecnologia. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um método para diagnóstico de rubéola a partir de proteínas recombinantes e composição para imunização contra rubéola.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A rubéola é uma doença de origem viral. Seu nome deriva do latim e está relacionado à cor das manchas na pele, que acompanham o quadro clínico (Seppanen et al., 1991). É tipicamente uma doença infantil branda, de natureza autolimitada, caracterizada por manchas vermelhas na pele, inflamação dos linfonodos e febre tênue (aproximadamente 38°C). Algumas complicações passageiras são comuns em adultos infectados, podendo desenvolver artralgia, artrite (Ford et al., 1992), trombocitopenia e encefalopatia (Ilkow et al., 2011).

[003] Por outro lado, a infecção primária da rubéola em mulheres grávidas é considerada uma importante causa de danos severos ao feto, aborto espontâneo ou natimorto. A transmissão vertical do vírus pode provocar a Síndrome da Rubéola Congênita (SRC), cujas manifestações podem se manifestar tardiamente na infância, adolescência ou idade adulta, em períodos recorrentes de replicação viral (Duszak, 2009).

[004] Entre 1962 e 1965, a pandemia mundial de rubéola destacou a importância da SRC, onde apenas nos Estados Unidos foram registrados

11.000 óbitos fetais e 20.000 bebês nascidos com SRC. Este surto mundial levou à primeira produção licenciada da vacina para rubéola em 1969 (Orenstein et al., 1984).

[005] O vírus da rubéola é encontrado apenas no homem e a sua transmissão ocorre, portanto, sem a necessidade de vetores intermediários. A infecção ocorre através do contato direto, devido à inalação de aerossóis e gotículas respiratórios de indivíduos infectados. O vírus passa a ser eliminado a partir do sétimo dia do contágio e persiste por 21 dias após a manifestação da doença (Lee e Bowden, 2000; Banatvala e Peckham, 2007).

[006] No período de 14 a 18 dias após o contágio, os anticorpos passam a ser detectados, coincidindo com o período do surgimento das manchas vermelhas na pele. IgM e IgG de baixa afinidade são inicialmente encontradas, porém, a IgG persiste no transcurso da infecção, aumentando em titulação e afinidade, ao passo que anticorpos IgM desaparecem rapidamente e após 8 semanas geralmente são indetectáveis (Wilson et al., 2006; OMS, 2011). A infecção congênita com o vírus, por outro lado, é comumente diagnosticada através da detecção de IgM para rubéola no soro ou fluidos orais amostrados nos primeiros meses de vida (Skendzel, 1996).

[007] Para o diagnóstico as amostras sorológicas precisam ser coletadas tão cedo quanto possível (7 a 10 dias) após o surgimento dos sintomas da doença e novamente após 14 a 21 dias após, realizando um intervalo mínimo de 7 dias (Baron et al., 2013).

[008] Devido a sua importância, a rubéola é monitorada por sistemas de vigilância integrados em todo o mundo e o controle da transmissão é realizado através da imunização da população em diversos países. A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza a vacinação entre 12 e 18 meses após o nascimento com a necessidade da segunda dose após 36 meses (CDC, 1998). No entanto, uma imunidade duradoura da população contra o vírus da rubéola só foi obtida em países que realizaram campanhas

complementares de vacinação, imunizando a população indiscriminadamente quanto à idade, sexo ou histórico prévio da vacina. A imunização contra a rubéola tem o objetivo principal de evitar a ocorrência da SRC, protegendo especialmente mulheres em idade reprodutiva.

[009] A vacina é preparada em células humanas diploides através da obtenção do vírus vivo e atenuado. As doses administradas podem ser monovalentes com a presença apenas do vírus da rubéola ou combinada com os vírus do sarampo e da caxumba, podendo ser bivalentes ou trivalentes (Brasil, 2009).

[0010] O vírus da rubéola é o único representante do subgrupo Rubivirus e juntamente com o gênero Alphavirus compõem a família Togaviridae. Possui envelope viral com genoma linear e fita simples de ácido ribonucleico (ssRNA), cuja leitura é realizada em senso positivo (Porterfield et al., 1978; Wolinsky et al., 1991). Devido a essas características, o vírus pertence ao grupo IV, segundo o sistema de classificação de Baltimore (1971).

[0011] Em seu genoma o vírus possui aproximadamente 9.700 nucleotídeos que codificam para dois polipeptídios não estruturais, p150 e p90, além de três polipeptídios estruturais a proteína C, que forma o capsídeo e as proteínas glicosiladas E1 e E2 (Dominguez et al., 1990).

[0012] O vírus maduro tem um diâmetro de 60 a 70 nm e é constituído de uma única cópia de RNA genômico, o qual é protegido pelo capsídeo, constituído por 240 cópias da proteína C. O capsídeo é envolvido por uma bicamada lipídica, derivada da membrana da célula hospedeira. Nesta membrana estão mergulhadas as glicoproteínas estruturais n-glicosiladas E1 e E2, as quais se conjugam e formam heterotrímeros na membrana do vírus (Frey et al., 1986; Knipe e Howley, 2007; Dubois et al., 2013).

[0013] A proteína C não é glicosilada, possui massa molecular de 33

kilodaltons (kDa) e é responsável pela proteção do material genético e por formar o capsídeo (Bardeletti et al., 1975). A proteína estrutural E1, de 58 kDa, forma heterodímeros e é responsável por promover a invasão do vírus na célula hospedeira. Em ambiente ácido a E1 sofre alteração conformacional e se funde a membrana do endossomo, liberando partículas virais no citoplasma da célula hospedeira (Claus et al., 2006; Dubois et al., 2013). A glicoproteína E2, com massa molecular de 42 a 47 kDa, também é importante na invasão viral e possui conformação em trímeros ou heterotrímeros com a E1 (Oker-Blom et al., 1983; Ho-Terry e Cohen, 1984).

[0014] A nomenclatura do vírus da rubéola foi padronizada em Genebra no ano de 2004 em uma reunião da OMS para este fim. A caracterização genética de tipos selvagens do vírus da rubéola está baseada na sequência codificadora da proteína E1 entre os nucleotídeos 8731 a 9469, uma janela de 739 nucleotídeos. São dois grupos filogenéticos distintos com uma variabilidade de 8 a 10%. No clade 1 ficam compreendidos 7 genótipos: 1a, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F e 1g e no clade 2, são 3 genótipos: 2A, 2B e 2c. Totalizando 10 genótipos do vírus, onde 7 já foram aceitos na reunião e 3 (classificados com letras minúsculas) necessitam de informações complementares (WHO, 2004).

[0015] Epítomos são encontrados nas três proteínas estruturais do vírus (Mitchell et al 1999), mas a glicoproteína E1 é imunodominante na resposta humoral, especialmente o fragmento que compreende os resíduos de aminoácidos 208-239, que é reconhecido por Imunoglobulinas G (IgG), A (IgA) e M (IgM) (Wilson et al., 2006), levando a redução da hemaglutinação e da infectividade do vírus (Wolinsky et al., 1991).

[0016] Outras regiões imunogênicas na E1 estão entre os aminoácidos 273-285 e 402-422 (Mitchell et al., 1993). Quatro epítomos lineares reconhecidos por anticorpos neutralizantes são encontrados entre os aminoácidos 209-239 (Mitchell et al., 1992) e 245-285 da E1 (Mitchell et al.,

1999). Além disso, os fragmentos entre os resíduos 234-252, 254-285 e 272-285 também são reconhecidos por anticorpos de neutralização viral (Mitchell et al., 1999). Alguns epítomos na E1 são capazes de desencadear respostas de células T e B, como a região entre os resíduos 202-283 (Mccarthy et al., 1993) e entre os aminoácidos 297-332 (Lovett et al., 1993). A região 202-283 da E1 é definida como um epítomo linear (Wolinsky et al., 1991), porém, existe uma ponte dissulfeto formada entre os aminoácidos 225 e 235 (Dubois et al., 2013). (Resíduos de aminoácidos numerados de acordo com (Dominguez et al., 1990).

[0017] A E2 não é bem caracterizada quanto a imunogenicidade e a dificuldade em produzir anticorpos monoclonais anti-E2 sugerem reduzida importância imunológica, podendo indicar também que a proteína apresente epítomos escondidos na conformação com a proteína E1 (Oker-Blom et al., 1983; Ho-Terry e Cohen, 1984). Contudo, já foi demonstrado que a proteína E2 também possui um epítomo de neutralização viral (Green e Dorsett, 1986a), resultado obtido utilizando a proteína E2 inteira purificada de lisado viral para produção de anticorpos monoclonais de camundongos.

[0018] A E2 possui apenas duas regiões capazes de serem reconhecidas por anticorpos neutralizantes. As principais regiões imunogênicas desta proteína compreendem os resíduos 54-72 (Mitchell et al., 1993) e 1-26 (Green e Dorsett, 1986b), a última ampliada por Mitchell e colaboradores (1999) para os resíduos 10-36. Os aminoácidos 31 e 105 são capazes de desencadear respostas linfoproliferativas de células T e adicionalmente são reconhecidos por anticorpos monoclonais murinos (Mccarthy et al., 1993).

[0019] Existe uma correlação usual entre o compartilhamento de epítomos reconhecidos por células T e B, realizando uma ponte entre as respostas imunes inatas e adaptativas (Lovett et al., 1993). Desta maneira, como a E2 não possui outras regiões imunogênicas elucidadas para

reconhecimento de anticorpos neutralizantes, pode-se considerar importantes as regiões entre os resíduos de aminoácidos 35-58, 134-150, 140-156, 168-179 e 248-260 para se analisar o reconhecimento de anticorpos humanos, pois são capazes de evocar respostas de células T em indivíduos imunes ao vírus (Mitchell et al., 1999).

[0020] A principal região imunogênica na proteína do capsídeo é o epítipo linear compreendido entre os resíduos 1-30 (Wolinsky et al., 1991; Mitchell et al., 1993). Adicionalmente, o fragmento de 34 resíduos de aminoácidos entre a região 64-97 é reconhecido por anticorpos monoclonais murinos (Wolinsky et al., 1991). Além disso, anticorpos humanos neutralizantes reconhecem os resíduos de aminoácidos 88-111 (Mitchell et al., 1999). Em um estudo mais abrangente sobre epítopos presentes na proteína do capsídeo de rubéola OU e colaboradores (1992) identificaram três epítopos que conferem com os descritos anteriormente, C1-30, C74-100 e C96-123, mas adicionam outros quatro epítopos entre os aminoácidos C119-152, C205-233, C231-257 e C255-280.

[0021] OU e colaboradores (1992) analisaram 11 epítopos que cobriam os resíduos de aminoácidos de 1 a 280 da proteína C, destacando a importância de sete deles. No entanto, os epítopos de maior relevância seriam entre os resíduos de aminoácidos C96-123, C119-152, C205-233, e C255-280, pois, são reconhecidos por células B e T, sendo assim candidatos a vacina de origem sintética para esta proteína.

[0022] Importante avanço na obtenção de antígenos do vírus da rubéola foi realizado com células de *Spodoptera frugiperda* Sf9, da ordem Lepidoptera. A lagarta deste inseto é comumente infectada pelo baculovírus, o qual é utilizado em culturas de células de *S. frugiperda* para a transfecção de genes estranhos para a expressão de proteínas recombinantes. Estas proteínas são clonadas com emprego do promotor da poliedrina do vírus da poliedrose nuclear *Autographa californica* (AcNPV) (Luckow e Summers, 1988) e a

facilidade oferecida por este cultivo celular é a compartimentalização que permite, modificações pós-traducionais como a glicosilação, necessária para as glicoproteínas do vírus da rubéola.

[0023] As células de *S. frugiperda* Sf9 já foram empregadas com sucesso para a expressão das proteínas E1 e E2 e do polipeptídeo de 90 kDa, precursor das proteínas estruturais. Estas proteínas demonstraram elevado potencial para a detecção de rotina de IgG humanos contra o vírus da rubéola, com antigenicidade correlacionada com a observada em Ensaio Imunoenzimático (EIA) utilizando o vírus inteiro ($r = 0,89$) (Seppanen et al., 1991).

[0024] Células de inseto Schneider S2 também foram utilizadas com sucesso para expressar um ectodomínio da proteína E1 entre os aminoácidos 1 a 436 (Dubois et al., 2013). A proteína foi purificada e utilizada em ensaios de difração de raio-X. Os autores foram capazes de descrever a estrutura da maior parte da proteína E1 e elucidar sua complexa estrutura tridimensional, demonstrando que seria inviável expressar a E1 inteira em células bacterianas.

[0025] Não há referência da expressão recombinante das proteínas E1 e E2 inteiras em células procarióticas. Por outro lado, a proteína C já foi expressa com sua extensão de 1 a 277 aminoácidos na fração solúvel de células de *E. coli* (Ilkow et al., 2008; Ilkow et al., 2011). Esta construção não possui o peptídeo sinal para clivagem do polipeptídeo precursor presente entre as proteínas C e E2 (Tzeng e Frey, 2009).

[0026] Starkey e colaboradores (1995) expressaram e purificaram dois fragmentos da proteína E1 e os utilizaram para diagnóstico de rubéola. Esta estratégia buscou simplificar a complexidade da proteína E1, utilizando dois fragmentos da proteína viral (resíduos 243 a 286 e 212 a 286) e possibilitando a purificação dos fragmentos a partir da fração solúvel de células de *E. coli*. Assim, o fragmento entre os resíduos 127 a 277 da proteína C também foi obtido na fração solúvel de células de *E. coli*, o qual foi purificado e

submetido a experimentos de cristalografia de raio-X para posterior determinação tridimensional desta região da proteína (Prasad et al., 2013).

[0027] O diagnóstico molecular na microbiologia clínica tem se tornado cada vez mais complexo e não menos, diferentemente de outras áreas no diagnóstico laboratorial. Mesmo com o advento da automação dos ensaios e da integração da genômica e proteômica à microbiologia, a interpretação dos resultados ainda depende da qualidade da amostra recebida para a análise (Baron et al., 2013). A principal importância no diagnóstico de rubéola encontra-se na determinação do estado imune de mulheres que pretendem engravidar participantes do programa pré-natal. Quando a paciente não possui titulação de IgG suficientes para garantir imunidade para o vírus é recomendada a administração de uma dose da vacina e aguardar um mês para a concepção.

[0028] Para o diagnóstico de rubéola os mais comuns são ensaios sorológicos e a presença de anticorpos contra o vírus em apenas uma amostra é evidência de imunidade. É utilizado como amostra o soro, separado das células vermelhas tão cedo quanto possível. Para diagnosticar a infecção aguda existem duas abordagens no método sorológico: 1. Diagnosticar um aumento de quatro vezes na titulação de IgG contra o vírus nos soros coletados entre a fase aguda (3 a 10 dias após o surgimento dos sintomas) e a fase de convalescência (duas a três semanas após a fase aguda); 2. Através da confirmação da presença de anticorpos IgM (Baron et al., 2013).

[0029] A interpretação de resultados de IgM devem ser realizados com cautela, pois falsos positivos podem ocorrer. A rubéola não é endêmica no Brasil, portanto, a detecção de IgM deve ser realizada apenas em pacientes que apresentem sintomas sugestivos de infecção aguda de rubéola. A triagem pré-natal da imunidade para rubéola deve ser realizada apenas na modalidade detecção de IgG (Baron et al., 2013).

[0030] Inicialmente os métodos de diagnóstico para rubéola

utilizavam testes de menor complexidade tecnológica e baseavam-se na hemaglutinação, aglutinação ou teste de fixação do complemento. De maneira geral estes métodos apresentavam baixo poder de processamento de amostras e envolviam procedimentos demorados e laboriosos. Limitações quanto à eficiência eram observadas na reduzida sensibilidade e especificidade, além de apresentarem falso-positivos (Meurman, 1978; Truant et al., 1983). A partir da década de 1970, os métodos enzimáticos desempenharam importante avanço na área diagnóstica com o advento do ensaio imunoenzimático (EIA) e ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA). Hoje estas técnicas estão consolidadas, com a utilização de instrumentos totalmente automatizados em diversos laboratórios, com a disponibilidade de vários produtos comerciais (Lequin, 2005).

[0031] O princípio geral destas técnicas é a interação antígeno anticorpo utilizando uma molécula de captura, como antígeno, para capturar uma molécula-alvo em amostras biológicas. A reação ocorre no interior do poço de uma microplaca de 96 poços, o qual está revestido pela molécula de captura. Para revelar a interação proteína-proteína é adicionada uma molécula secundária ligada a uma enzima. Como exemplo, temos a enzima peroxidase, que desencadeia a conversão colorimétrica de seu substrato quando este é adicionado (exemplos do substrato TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), o DAB (3,3'-Diaminobenzidine) e o ABST (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), formando um composto colorido que pode ser quantificado espectrofotometricamente (Wandinger et al., 2011).

[0032] Outras técnicas estão disponíveis para diagnósticos sorológicos da rubéola como o ensaio imunoenzimático fluorescente (ELFA) e ensaio imunoenzimático por micropartículas (MEIA), ambas derivadas dos métodos ELISA e EIA. A quantificação da proteína alvo, no entanto, não é quantificada colorimetricamente, mas através da determinação da quantidade de fluorescência, que é proporcional à concentração de anticorpos da amostra

analisada (Medici et al., 2008).

[0033] Dentre os métodos diagnóstico disponíveis no mercado, os mais utilizados e que compõem a rotina de laboratório, são imunoenaios para detecção de IgG ou IgM. Eles utilizam uma grande variabilidade de metodologias e tecnologias, porém, existe um ponto em comum: todos utilizam o vírus inteiro como matriz antigênica, obtido de célula eucariótica. Esta é a decisão lógica para qualquer técnico da área, uma vez que a descrição de epítomos do vírus é vasta e até o presente momento nenhum trabalho conseguiu demonstrar um conjunto mínimo capaz de realizar o correto diagnóstico sorológico, descrevendo regiões nas proteínas estruturais como não importantes e outras regiões indispensáveis para o diagnóstico.

[0034] Algumas desvantagens podem ser apontadas nos métodos contendo vírus inteiro (lisado viral, vírus inativado ou partícula tipo-vírus) utilizado como matriz antigênica em relação às proteínas recombinantes, e são elas:

[0035] 1) Os custos elevados para obtenção dos antígenos nos testes comerciais são consequência da soma dos seguintes fatores isoladamente: existência de risco biológico na manipulação do vírus infectivo, resultando em aumento do investimento nas etapas de fabricação. O lisado viral ou o vírus vivo (e inativado) são obtidos de cultura de células eucarióticas. Quando comparado com o cultivo de células procarióticas este cultivo exige elevado grau técnico da mão de obra, maior tempo de cultivo, meio de cultivo oneroso e maior número de equipamentos necessários, com mais tecnologia embarcada. Por fim, os valores necessários para obtenção de antígenos recombinantes em células bacterianas são infinitamente mais baixos que antígenos obtidos utilizando o cultivo de células eucarióticas.

[0036] 2) Reprodutibilidade: a obtenção do lisado viral possui etapas não controladas para a produção dos antígenos na fabricação do método diagnóstico, uma vez que a infectividade do vírus e o ciclo celular da célula

hospedeira possuem vias biológicas não controladas por processos de fabricação e são impossíveis de serem quantificadas ou sincronizadas devido ao volume do cultivo e as exigências das boas práticas de fabricação. Esta variabilidade afeta a reprodutibilidade dos resultados dos imunoenaios uma vez que não mantêm constante a qualidade e quantidade dos antígenos do vírus para o diagnóstico como é observado em peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes. A produção de proteínas recombinantes garante a reprodutibilidade de lote para lote como é necessário para um método diagnóstico, uma vez que permite controlar a modificação genética da célula hospedeira e a indução da proteína de interesse. Além disso, o processo de obtenção de proteínas superexpressas em bactérias garante elevado grau de pureza e, em última análise, resulta na elevada precisão diagnóstica por diminuir drasticamente as reações inespecíficas com proteínas contaminantes da célula hospedeira.

[0037] Somados, estes dois fatores demonstram a superioridade da qualidade de proteínas recombinantes quando comparadas com antígenos obtidos de lisado viral, na utilização para diagnóstico *in vitro* para detecção de anticorpos. Além disso, em diagnóstico dependente de lisado viral não se pode descrever a contribuição de cada proteína viral na resposta imune, bem como não se pode determinar a titulação de anticorpos para cada proteína estrutural do vírus da rubéola. Esta dificuldade é superada com as proteínas recombinantes propostas neste trabalho, uma vez que, de acordo com a arquitetura do imunoensaio, é possível descrever a contribuição de cada uma das proteínas na resposta imune.

[0038] O teste diagnóstico *Roche Elecsys Rubella IgG assay* apresenta variações na matriz antigênica não utilizando lisado viral ou vírus inativado, no entanto, este método diagnóstico contém partícula tipo-vírus recombinante obtida de cultura de células eucarióticas como matriz antigênica, portanto, também contém o vírus bruto em sua composição. Isto

inviabiliza realizar a distinção entre a contribuição da E1, E2 e da proteína do capsídeo na resposta imune do indivíduo. Um avanço real que se tem no método da Roche é a utilização de diferentes fragmentos recombinantes da proteína E1, porém, dois pontos negativos estão presentes: por um lado a proteína está fusionada a uma chaperona de *E. coli*, o que pode resultar em diagnósticos falso-positivos uma vez que o paciente possua anticorpos específicos para a chaperona, por outro lado, o sinal obtido com a E1 recombinante é somado ao sinal das partículas tipo-vírus, não permitido separar a contribuição apenas da E1 recombinante.

[0039] Apesar do vasto conhecimento disponível sobre a composição e localização de epítomos do vírus da rubéola gerado, pouco sucesso foi obtido na utilização de proteínas recombinantes do vírus da rubéola para aplicação diagnóstica. Há, portanto, uma necessidade técnica por um imunoensaio que permita o diagnóstico da rubéola sem as limitações apresentadas pelos métodos e antígenos disponíveis atualmente, deixando, desta forma, de utilizar lisado viral, partícula tipo-vírus e fragmentos da E1 fusionados a chaperonas, bem como tornar desnecessária a utilização de padrão OMS para comparabilidade dos resultados. O diagnóstico de rubéola utilizando os epítomos adequados na matriz antigênica permitiria utilizar apenas dados qualitativos dos imunoenaios, o que descreve o estado imune do paciente como suscetível ou imune ao vírus.

[0040] Além disso, não existe hoje a disponibilidade de uma vacina recombinante ou que não contenha partículas virais infectivas. A presente invenção também aponta para o fornecimento de uma composição vacinal da classe de vacina de subunidade (Subunit Vaccines) composta por proteínas recombinantes.

[0041] As vantagens da invenção serão evidentes na descrição da invenção fornecida neste documento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0042] A presente invenção tem por objetivo prover um método para diagnóstico de rubéola a partir de proteínas recombinantes que solucione os principais problemas do estado da técnica listados anteriormente. A invenção também permite o desenvolvimento de uma vacina de segunda geração, da classe de subunidade.

[0043] Particularmente, foram desenvolvidas proteínas que podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto em ensaios imunodiagnósticos de rubéola.

[0044] Em um primeiro aspecto, a invenção provê uma proteína recombinantes compreendendo pelo menos uma região antigênica do vírus da rubéola selecionada a partir do grupo selecionado das regiões estruturais E1, E2 e C.

[0045] Em um segundo aspecto, a invenção provê sequência de DNA sintético que codifica a proteína recombinante da invenção.

[0046] Em um terceiro aspecto, a invenção provê vetor de expressão, que compreende a sequência de DNA sintético descrita acima.

[0047] Em um quarto aspecto, a invenção provê uma célula hospedeira que compreende a sequência de DNA sintético ou o vetor de expressão como definidos acima.

[0048] Em um quinto aspecto, a invenção provê um método para produzir uma proteína recombinante que compreende:

(a) transformar uma célula hospedeira com a sequência de DNA sintético como definida acima,

(b) cultivar dita célula para a produção da proteína recombinante; e

(c) isolar dita proteína recombinante de dita célula ou do meio de cultura circundando dita célula.

[0049] Em um sexto aspecto, a presente invenção provê uma

composição que compreende uma proteína recombinante como definida acima ou uma combinação de duas ou mais proteínas recombinantes como definidas acima.

[0050] Em um sétimo aspecto, a presente invenção provê um kit para diagnóstico de rubéola que compreende pelo menos uma proteína recombinante da presente invenção.

[0051] Em um oitavo aspecto, a invenção provê o uso de pelo menos uma proteína recombinante ou do kit descritos acima no diagnóstico de rubéola.

[0052] Em um nono aspecto, a invenção provê um método para diagnóstico de rubéola que compreende as etapas de:

(a) prover uma ou mais proteínas recombinantes ou uma composição como definidas acima;

(b) contatar uma ou mais proteínas recombinantes ou composição descritas acima com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/ antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0053] A Figura 1 mostra o esquema representativo das proteínas recombinantes multiepítomos do vírus da rubéola. Um total de 15 proteínas foram bioengenhariadas para expressão recombinante em *E. coli* a fim de conter uma etiqueta de hexahistidina (34 aminoácidos) e aminoácidos das proteínas estruturais do vírus da rubéola. Seis contém aminoácidos da proteína E1 (escala de azul), duas contém aminoácidos da E2 (escala de vermelho) e três contém aminoácidos do capsídeo (dourado). Além disso,

quatro proteínas quiméricas contém regiões imunogênicas da E1, E2 e/ou C. Legendas: Números correspondem à posição dos aminoácidos nas proteínas estruturais do vírus. E1a: 157-176. E1b: 213-239. E1c: 374-390, E1d: 1-41. E1e: 149-249. E1f: 294-421. E1g: 195-332. E1h: 364-436. E2a: 1-85. E2b: 125-189. E2c: 237-270.

[0054] A Figura 2 mostra a caracterização do painel sorológico.

[0055] A Figura 3 mostra as condições com melhor desempenho imunológico em relação ao Painel SeraCare utilizando proteínas truncadas ou quiméricas com epítomos para E1, E2 e C do vírus da rubéola. 9+2+3: Utilização em conjunto das proteínas Rub2, Rub3 e Rub9 para sensibilizar os poços da microplaca. Neg: negativos (n=2). Pos: positivos (n=23). IR: índice de reatividade, razão entre a absorbância da amostra e o *cut-off* da microplaca. Barras horizontais representam as médias geométricas. Barras verticais: intervalo de confiança de 95%. Linha pontilhada: *cut-off*.

[0056] A Figura 4 mostra o nível de IgG Anti-Rubéola no soro/plasma de pacientes negativos (Neg) e positivos (Pos) analisados por ELISA. O valor do *cut-off* é 1,0 e a zona cinza está contida entre 0,9 e 1,1. Barras horizontais e números em cada grupo representam as médias geométricas ($\pm 95\%$). AUC: área abaixo da curva ROC. Sen: sensibilidade. Spe: especificidade. Acc: Exatidão. Índice J: índice Youden.

[0057] A Figura 5 mostra a distinção de pacientes com infecção natural recente de pacientes com imunização recente. A proteína Rub12 quando utilizada sozinha, em conjunto com as proteínas Rub2 e Rub3 ou compondo as quiméricas Rub14 e Rub17 demonstrou potencial para distinguir entre pacientes com elevada titulação devido a infecção natural recente e imunização recente. Valor de *cut-off*: 1,0. Área sombreadas: zona cinza. Pos: positivos. Índice de reatividade: razão entre a absorbância da amostra e o *cut-off* da microplaca. SC-03: plasma PTR201-03 do painel SeraCare obtido após 15 dias de infecção natural, com elevada titulação de

IgM e positivo para IgG. SC-13: amostra pareada do paciente PTR201-13 do painel SeraCare coletada após 14 dias, negativo para IgM e positivo para IgG. SC-07, SC-19, SC-24: plasma PTR201-07, PTR201-19 e PTR201-24, respectivamente, do painel SeraCare provenientes de pacientes com imunização recente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0058] A não ser que sejam definidos de maneira diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado entendido por um técnico no assunto ao qual a invenção pertence. A terminologia utilizada na descrição da invenção tem finalidade de descrever concretizações particulares somente, e não tem a intenção de limitar o escopo dos ensinamentos. A não ser que seja indicado de forma diferente, todos os números expressando quantidades, porcentagens e proporções, e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e nas reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados, em todos os casos, pelo termo “cerca de”. Assim, a não ser que seja indicado o contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório descritivo e nas reivindicações são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades a serem obtidas.

[0059] A prática da presente invenção irá empregar, a menos que indicado de forma diferente, métodos convencionais de química, bioquímica, técnicas de DNA recombinante e imunologia, dentro do conhecimento da técnica. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura. Veja, por exemplo, *Fundamental Virology*, 2ª Edição, vols. I & II (B.N. Fields e D. M. Knipe, eds.); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir e C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, *Proteins: Structures e Molecular Properties* (W.H. Freeman e Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edição atual); Sambrook, e cols., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*

(2ª Edição, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick e N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

[0060] Os presentes inventores solucionaram o problema do estado da técnica provendo um método para diagnóstico de rubéola a partir de proteínas recombinantes construídas de diferentes regiões do vírus, com alto grau de pureza e alta capacidade de discriminação sorológica. As análises revelaram a elevada capacidade de distinção entre soros positivos e negativos utilizando apenas as proteínas recombinantes da invenção sem a utilização de lisado viral ou padrão OMS de imunoglobulinas humanas. Também foi verificada a possibilidade de distinção por titulação de pacientes recentemente infectados daqueles com imunidade tardia, desta forma demonstrando elevado potencial para geração de vacina recombinante para superar as vacinas com vírus vivo e atenuado de primeira geração.

[0061] Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma proteína recombinante, que compreende pelo menos uma região antigênica do vírus da rubéola selecionada a partir do grupo selecionado das regiões estruturais E1, E2 e C.

[0062] As referidas regiões antigênicas do vírus da rubéola são conhecidas e apresentam variabilidade no desempenho, o que é amplamente discutido na arte relacionada ao diagnóstico da rubéola. Com base no estado da técnica, principalmente no que se refere à variabilidade do vírus da rubéola, foram definidas sequências de regiões antigênica do vírus para compor desenhos das proteínas recombinantes da presente invenção.

[0063] Atentando-se para a baixa identidade entre epítomos e considerando a variabilidade entre os genótipos existentes, os inventores desenvolveram proteínas recombinantes específicas com a possibilidade de utilizá-las individualmente ou em conjunto, a fim de obter maior representatividade, tendo em vista que a variabilidade apresentada pode levar ao não reconhecimento de anticorpos genótipo-específico.

[0064] Dessa forma, os inventores desenvolveram proteínas recombinantes multiepítotos obtidas pela junção de regiões estruturais do vírus da rubéola. As proteínas recombinantes utilizadas nesta tecnologia foram desenvolvidas em construções truncadas ou quiméricas.

[0065] No presente estudo, o objetivo foi construir novos clones e produzir novas variantes de antígenos recombinantes e validar o conjunto mínimo de antígenos recombinantes para realizar um teste de diagnóstico imunológico mais sensível, específico e preciso para o vírus da rubéola apenas com antígenos recombinantes.

[0066] Inicialmente, foram desenvolvidos quinze clones, os quais continham diferentes combinações das regiões estruturais E1, E2 e C do vírus da rubéola. A Tabela 1 apresentada nos Exemplos identifica as construções correspondentes para cada um dos quinze clones.

[0067] Após testes de expressão e purificação, as proteínas Rub1, Rub5, Rub6 e Rub7 foram descartadas, tendo em vista os resultados negativos obtidos com os mesmos.

[0068] As onze proteínas expressas e purificadas com sucesso (Rub2, Rub3, Rub4, Rub7-2, Rub9, Rub12, Rub13, Rub14, Rub15, Rub16 Rub17) foram testadas em imunoenaios, evidenciando que todas as proteínas purificadas possuem eficiência compatível com as características desejadas para aplicação diagnóstica e imunização passiva.

[0069] Dentre as proteínas recombinantes desenvolvidas pelos inventores, o uso combinado de três delas apresentou melhor resultado em ensaios de combinação, quais sejam, as proteínas Rub2 + Rub 3 + Rub 12. Para ensaios de proteína isolada, as proteínas quiméricas Rub14 e Rub17 apresentaram os melhores resultados.

[0070] No contexto da presente invenção, as proteínas Rub2 + Rub 3 + Rub12, Rub14 e Rub17 serão também referidas conforme abaixo:

Rub 2: SEQ ID NO: 1

Região E2: aminoácidos 31-105

Rub 3: SEQ ID NO: 3

Região C: aminoácidos 1-123

Rub 12: SEQ ID NO: 5

Região E1g: aminoácidos 195-332

Região: E1h: aminoácidos 364-436

Rub 14: SEQ ID NO: 7

Região E1g: aminoácidos 195-332 da E1

Região E1h: aminoácidos 1361-436 da E1

Região E2a: aminoácidos 1-85 da E2

Região E2b: aminoácidos 125-189 da E2

Região E2c: aminoácidos 237-270 da E2

Rub 17: SEQ ID NO: 9

Região E1g: aminoácidos 195-332 da E1

Região E1h: aminoácidos 1361-436 da E1

Região E2a: aminoácidos 1-85 da E2

Região E2b: aminoácidos 125-189 da E2

Região E2c: aminoácidos 237-270 da E2

Região C: aminoácidos 1-123 da C

[0071] Em um aspecto preferencial, as proteínas são pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idênticos às sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9, em que um ou mais aminoácidos são opcionalmente substituídos, adicionados ou deletados em relação à sequência das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

[0072] Em um aspecto ainda mais preferencial, as proteínas consistem nas sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

[0073] As proteínas da presente invenção apresentaram reprodutibilidade quanto à sensibilidade e especificidade. Isto sugere que as

proteínas desenvolvidas podem se manter estáveis por longos períodos, mantendo sua capacidade reativa. Proteínas estáveis são consideradas quando existe interesse de aplicação diagnóstica.

[0074] Conforme empregado ao longo do presente pedido, o termo “aminoácido” denota o grupo α -aminoácidos que diretamente ou na forma de um precursor pode ser codificado por um ácido nucleico. Os aminoácidos individuais são codificados por ácidos nucleicos consistindo de três nucleotídeos, conhecidos como códons ou terno de bases. Cada aminoácido é codificado por pelo menos um códon. O fato do mesmo aminoácido ser codificado por diferentes códons é conhecido como “degeneração do código genético”. O termo “aminoácido”, como usado no presente pedido, denota os α -aminoácidos que ocorrem naturalmente, compreendendo alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

[0075] Os termos “peptídeo”, “polipeptídeo” ou “proteína” podem ser utilizados intercambiavelmente, e fazem referência a um polímero de aminoácidos conectado por ligações peptídicas, independentemente do número de resíduos de aminoácido que constituem esta cadeia. Os polipeptídeos, como aqui usados, incluem “variantes” ou “derivados” dos mesmos, que se referem a um polipeptídeo que inclui variações ou modificações, por exemplo, substituição, deleção, adição ou modificações químicas em sua sequência de aminoácido em relação ao polipeptídeo de referência. Exemplos de modificações químicas são glicosilação, PEGilação, PEG alquilação, alquilação, fosforilação, acetilação, amidação, etc. O polipeptídeo pode ser produzido artificialmente a partir de sequências nucleotídicas clonadas através da técnica de DNA recombinante ou pode ser preparado através de uma reação de síntese química conhecida.

[0076] Mais especificamente, o termo proteína da presente invenção

pode também ser entendido como antígeno, poliantígeno, antígeno multiepítopo ou proteína quimérica, que consistem em uma junção de epítomos diferentes que podem ou não estar interligados por ligantes (*linkers*) flexíveis ou rígidos, específicos para um único patógeno ou para patógenos diferentes.

[0077] O termo “códon” denota um oligonucleotídeo consistindo de três nucleotídeos que codifica um aminoácido definido. Devido à degeneração do código genético, a maioria dos aminoácidos é codificada por mais de um códon. Estes diferentes códons que codificam o mesmo aminoácido têm diferentes frequências relativas de uso nos diferentes organismos. Portanto, um aminoácido específico é codificado tanto por um códon exato ou por um grupo de diferentes códons. Da mesma forma, a sequência de aminoácidos de uma proteína pode ser codificada por diferentes ácidos nucleicos. Portanto, um aminoácido específico (resíduo) em uma proteína pode ser codificado por um grupo de diferentes códons, cada um destes códons tendo uma frequência de uso dentro de uma determinada célula ou organismo.

[0078] O termo “identidade” é definido como o grau de igualdade entre sequências de DNA ou de aminoácidos quando comparados nucleotídeo por nucleotídeo ou aminoácido por aminoácido com uma sequência de referência.

[0079] O termo “porcentagem de identidade de sequências” refere-se a comparações entre polinucleotídeos ou polipeptídeos e é determinado por duas sequências idealmente alinhadas, sob determinados parâmetros de comparação. Este alinhamento pode compreender espaços (*gaps*), gerando intervalos quando comparadas à sequência de referência, que facilitam uma comparação adequada das mesmas. De maneira geral, o cálculo da porcentagem de identidade considera o número de posições onde o mesmo nucleotídeo ou aminoácido ocorre nas sequências comparadas à sequência referência, sendo realizado através de diversos algoritmos de comparação de

sequências e programas conhecidos no estado da arte. Tais algoritmos e programas incluem, mas não são limitados a, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, CLUSTALW, FASTDB.

[0080] A proteína compreendendo os fragmentos antigênicos da presente invenção são obtidas de forma recombinante ou sintética. Em uma modalidade particular, as proteínas da presente invenção são obtidas por meio de um sistema de expressão.

[0081] Por sistema de expressão, entende-se um sistema compreendendo as sequências nucleotídicas, as quais são capazes de codificar proteínas.

[0082] Em um segundo aspecto, a presente invenção provê sequências de DNA sintético que codificam as proteínas recombinantes aqui descritas.

[0083] As sequências de DNA sintético de acordo com a invenção são representadas, de forma não limitativa, pelas SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 e 10, e suas degenerações, ou sequências com 90% de identidade com as SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 e 10. As sequências de DNA sintético das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 e 10 codificam as proteínas recombinantes representadas pelas SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9, respectivamente.

[0084] Os termos “sequência de DNA sintético” e “polinucleotídeo” são usados de forma intercambiável, e referem-se a DNA. Os polinucleotídeos podem ser simples ou dupla fita. Exemplos não limitantes de polinucleotídeos incluem genes, fragmentos de genes, éxons, íntrons, DNA complementar, DNA genômico, DNA sintético, DNA recombinante, cassetes, vetores, sondas e iniciadores. O termo “DNA recombinante” refere-se a qualquer sequência nucleotídica artificial que resulta da combinação de sequências de DNA de diferentes origens.

[0085] O termo “sequência de nucleotídeos degenerada” denota uma sequência de nucleotídeos que inclui um ou mais códons degenerados quando comparada com uma molécula de ácido nucleico de referência que codifica

um dado polipeptídeo. Códon degenerados contêm diferentes tripletes de nucleotídeos, mas codificam o mesmo resíduo de aminoácido (p.ex., GAU e GAC ambos codificam Asp).

[0086] Um técnico no assunto reconheceria que as degenerações são integralmente suportadas com base nas informações fornecidas no pedido e no conhecimento comum do estado da técnica. Por exemplo, a degeneração do código genético (isto é, diferentes códon podendo codificar os mesmos aminoácidos) é um conhecimento comum na técnica e a identidade do aminoácido codificado por cada códon é bem estabelecida.

[0087] Com base nas informações bem conhecidas e estabelecidas no estado da técnica, o técnico no assunto é capaz de identificar as substituições de nucleotídeos que não alteram a sequência de aminoácidos resultante. Assim, quando em posse tanto da sequência de nucleotídeos de um gene quanto da sequência de aminoácidos da proteína codificada, o técnico no assunto identificará facilmente as degenerações que codificam a mesma proteína, com a mesma sequência de aminoácidos.

[0088] Em um aspecto preferencial, as sequências de DNA sintético da presente invenção tiveram os códon otimizados para expressão em sistema procarioto.

[0089] Em um aspecto mais preferencial, as sequências de DNA sintético da invenção são otimizadas para uso de códon para *Escherichia coli*.

[0090] Em um terceiro aspecto, a presente invenção provê um vetor de expressão compreendendo uma sequência de DNA sintético de acordo com a invenção. Este vetor de expressão pode ser utilizado para transformar uma célula hospedeira e permitir a expressão da sequência de DNA sintético de acordo com a invenção na referida célula.

[0091] Com vantagem, o vetor de expressão compreende elementos reguladores que permitem a expressão do ácido nucleico e elementos que permitem a sua seleção na célula hospedeira de acordo com a invenção. Os

métodos para selecionar estes elementos em função da célula hospedeira na qual a expressão é desejada, são bem conhecidos do versado na técnica e amplamente descritos na literatura.

[0092] Os vetores podem ser construídos por técnicas clássicas de biologia molecular, bem conhecidas do versado na técnica. Exemplos não limitantes de vetores de expressão adequados para expressão em células hospedeiras são plasmídeos e vetores virais ou bacterianos.

[0093] Em um quarto aspecto, a presente invenção provê uma célula hospedeira transformada/transfectada de maneira transitória ou estável com a sequência de DNA sintético ou vetor da invenção. A sequência de DNA sintético ou o vetor podem estar contidos na célula sob a forma de epissoma ou sob forma cromossômica.

[0094] A célula hospedeira pode ser uma célula de bactéria, levedura, fungos filamentosos, protozoários, insetos, células animais e vegetais.

[0095] Em um aspecto específico, a célula hospedeira é uma célula bacteriana, preferivelmente uma célula de *Escherichia coli*.

[0096] Em um quinto aspecto, a presente invenção provê método para produzir a proteína recombinante de acordo com a invenção, compreendendo a inserção de uma sequência de DNA sintético ou um vetor de expressão de acordo com a invenção em um sistema de expressão *in vivo* e a coleta da proteína produzida pelo referido sistema. Numerosos sistemas de expressão *in vivo*, compreendendo o uso de células hospedeiras adequadas, estão disponíveis no comércio e a utilização destes sistemas é bem conhecida do versado na técnica.

[0097] Sistemas de expressão particularmente adequados incluem microrganismos, como bactérias transformadas com vetores de expressão de DNA recombinante de bacteriófago, plasmídeo ou cosmídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura; sistemas de células de insetos infectadas com vetores de expressão de vírus (por exemplo,

baculovírus); sistemas de células de plantas transformados com vetores de expressão de vírus (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV [*cauliflower mosaic virus*]; vírus do mosaico do tabaco, TMV [*tobacco mosaic virus*]) ou com vetores de expressão bacterianos (por exemplo, plasmídeos Ti ou pBR322); ou sistemas de células animais. Também é possível empregar sistemas de tradução isentos de células para produzir os polipeptídeos da invenção.

[0098] A introdução da sequência de DNA sintético ou do vetor que codifica uma proteína recombinante da presente invenção em células hospedeiras pode ser realizada por meio de métodos descritos em muitos manuais de laboratório padrão, como Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology (1986) e Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989).

[0099] A célula hospedeira transformada ou transfectada descrita acima é depois cultivada em um meio nutriente adequado sob condições conducentes que permitam a expressão das proteínas recombinantes da invenção. O meio usado para cultivar as células pode ser qualquer meio convencional adequado para desenvolver as células hospedeiras, tal como meio mínimo ou complexo contendo suplementos apropriados. Os meios adequados estão disponíveis a partir de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com receitas publicadas (por exemplo, nos catálogos da American Type Culture Collection). As proteínas da invenção produzidos pelas células podem ser depois recuperados da célula ou do meio de cultura por procedimentos convencionais incluindo separar as células hospedeiras do meio pela centrifugação ou filtração, precipitando os componentes aquosos de proteína do sobrenadante ou filtrado por meio de um sal, por exemplo, sulfato de amônio, purificação por uma variedade de procedimentos cromatográficos, por exemplo cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia por filtração em gel,

cromatografia por afinidade ou similares, dependente do tipo de proteína em questão.

[00100] A proteína recombinante obtida é, então, purificada e caracterizada bioquimicamente, utilizando-se, por exemplo, métodos comuns ao campo da bioquímica, como HPLC, SDS-PAGE, *Western Blotting*, focalização isoeétrica com gradiente de pH, dicroísmo circular. Por meio desses métodos, é possível determinar características como, por exemplo, o rendimento da expressão da proteína recombinante; a determinação das características das estruturas secundárias, além de outras características cuja determinação é importante para o desenvolvimento de uma composição para imunização contra rubéola.

[00101] Os polipeptídeos podem ser expressos “fusionados” à uma etiqueta. O termo “etiqueta” ou o termo em inglês “*tag*” refere-se a sequências codificadoras incorporadas próximas ao sítio múltiplo de clonagem de um vetor de expressão, possibilitando a sua tradução concomitante e adjacente à sequência da proteína recombinante clonada. Assim, a etiqueta é expressa fusionada à proteína recombinante. Tais etiquetas são bem conhecidas no estado da técnica e incluem compostos e peptídeos como poli-histidina, poli-arginina, FLAG, glutationa-S-transferase, proteína ligante a maltose (MBP), domínio ligante a celulose (CBD), Beta-Gal, OMNI, tioredoxina, NusA, mistina, domínio ligante a quitina, cutinase, compostos fluorescentes (como GFP, YFP, FITC, rodamina, lantanídeos), enzimas (como peroxidase, luciferase, fosfatase alcalina), compostos quimioluminescentes, grupos biotinila, epítomos reconhecidos por anticorpos como zíper de leucina, c-myc, domínios ligantes a metais e sítios de ligação para anticorpos secundários.

[00102] As proteínas podem ser separadas e purificadas por um método de purificação conhecido. Um exemplo de tais métodos de

purificação pode incluir uma combinação de extração por solvente, destilação, cromatografia por coluna, cromatografia líquida, recristalização e similares.

[00103] Os tampões utilizados na presente invenção são conhecidos na arte. Em modalidades específicas podem ser utilizados os tampões Tris-HCl, Tris, CAPS (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico), PBS (tampão de salina fosfatada), CABS (ácido 4-(Ciclohexilamino)-1-butanosulfônico), ACES (ácido N-(2-Acetamido)-2-aminoetanosulfônico), ADA (ácido N-(2-Acetamido)iminodiacético), BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxietyl)-2-aminoetanosulfônico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), AMPD (2-Amino-2-Metil-1,3-Propanodiol; amediol), HEPES (4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfônico), EPPS (ácido 3-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil]propanosulfônico), TAPS (N-[tris(hidroxietyl)metil]-3-aminopropanosulfônico), MOPS (3-morfolinopropano-1-sulfônico), PIPES (ácido 1,4-Piperazinedietanesulfônico), TES (N-[tris(hidroxietyl)metil]-2-aminoetanosulfônico), rol, e bicarbonato. Os detergentes glicosídicos; detergentes de poli(oxietileno), como família Tween20 a 80, Nonidet-P-40; polímeros de etilenoglicóeter, como Triton X-100 e X-114, e IGEPAL; detergentes de sulfatos de alquil e sais de dodecilsulfatos, como SDS (dodecil sulfato de sódio); detergentes de alquil sulfonatos, sal de docusato de sódio, brometo de alquiltrimetilamônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, hidróxido de benzetônio, brometo de dimetildioctadecilamônio, brometo de dodeciltrimetilamônio, monohidrato de cloreto de hexadecilpiridínio, brometo de hexadeciltrimetilamônio, cloreto de metilbenzetônio, brometo de miristiltrimetilamônio, ASB-14, C7zBO, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, DDAO, SB3-14, SB3-18, SB3-8, sulfobetaínas, derivados de ciclodextrinas. Esses reagentes serão efetivos sozinhos ou em combinação com sais como NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl . As formulações poderão conter inibidores de proteases podendo ser empregado mas não restrito a combinações de inibidores de proteases específicos para *Escherichia*

coli, comercialmente disponíveis como coquetéis de diversos fabricantes ou combinações de inibidores de serina proteases, cisteína proteases, tripsina, quimiotripsina, e plasmina, como AEBSF, Bestatin, Pepstatin A, E-64, entre outros

[00104] Em uma concretização preferida, o método para produzir a proteína da presente invenção compreende as etapas de:

(a) transformar uma célula hospedeira com uma sequência de DNA sintético da presente invenção para obter uma célula hospedeira transformada;

(b) cultivar a célula hospedeira transformada para a produção da proteína;

(c) isolar a proteína da presente invenção da célula ou do meio de cultura circundando dita célula.

[00105] Em uma modalidade, a proteína da etapa (a) codifica o proteína compreendendo pelo menos 90% de identidade com qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

[00106] Em outra modalidade, a proteína da etapa (a) compreende a sequência de DNA sintético de qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 e 10e suas degenerações.

[00107] Em uma modalidade, a transformação da célula hospedeira com a proteína da presente invenção é realizada por meio de um vetor de expressão. Em uma modalidade específica, o vetor é pET28a e a célula hospedeira transformada é *E. coli*.

[00108] As condições de cultivo da célula hospedeira referido na etapa (b) são de conhecimento de um técnico no assunto. O meio de cultivo preferencialmente recomendado é o caldo de lisogenia (*Lisogeny Broth – LB*) em temperatura de 37°C durante 16 horas para se obter a fase de crescimento exponencial e 37°C durante 4 horas ou 15°C durante 16 horas para se alcançar a quantidade desejada de proteínas recombinante.

[00109] A produção da proteína referida na etapa (b) pode ser realizada com qualquer técnica conhecida no estado da técnica. Em uma concretização, a indução da expressão das proteínas da invenção é feita por meio de adição de IPTG ao meio de cultura, após obtenção de densidade óptica adequada.

[00110] Em uma etapa opcional, é realizada a solubilização de corpos de inclusão antes do isolamento da proteína da etapa (c). A solubilização pode ser realizada com qualquer agente caotrópico conhecido no estado da técnica, sendo exemplos não limitativos a ureia e a guanidina. Em uma concretização, a solubilização é realizada com tampão contendo guanidina.

[00111] O isolamento da proteína referida na etapa (c) pode ser realizado com qualquer técnica conhecida no estado da técnica. Em uma concretização, a purificação é feita por técnicas de cromatografia. Em uma modalidade específica, a purificação é realizada por cromatografia de afinidade. Exemplos não limitativos incluem o método de afinidade à resina de níquel, troca iônica, outros métodos por afinidade ou adsorção, par iônico, fase reversa e exclusão molecular.

[00112] Ao comparar os rendimentos obtidos na presente invenção com os rendimentos de referências do estado da técnica para a obtenção de proteínas para o vírus da rubéola, pode-se afirmar que os rendimentos obtidos para purificação das proteínas desenvolvidas podem ser considerados altos. O estado da técnica aponta para rendimentos inferiores para a maior parte das proteínas desenvolvidas para o diagnóstico de rubéola. Deste modo, pode-se afirmar que as proteínas desenvolvidas nesta invenção, expressas em *Escherichia coli*, apresentaram rendimentos variando entre 1,5 a 75 mg por litro de cultura que se apresentaram com alto grau de pureza.

[00113] Em um sexto aspecto, a invenção provê uma composição, compreendendo uma proteína recombinante como definida acima ou uma combinação de duas ou mais proteínas recombinantes como definidas acima.

[00114] As proteínas que compõem a dita composição apresentam

proporções adequadas para exercer um efeito potencial no desenvolvimento da resposta imune contra rubéola. Em uma modalidade específica da invenção, as concentrações das proteínas recombinantes da presente invenção na composição variam, de um modo geral, de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml, preferencialmente, de 0,5 mg/ml a 2 mg/ml.

[00115] Em um aspecto, a composição compreende ainda um veículo farmacologicamente aceitável.

[00116] Como aqui usado, um veículo farmacologicamente aceitável é entendido para ser um composto que não afeta de forma adversa a saúde do organismo a ser vacinado. Várias soluções farmacologicamente aceitáveis para uso na preparação da composição vacinal da presente invenção são bem conhecidas e podem ser prontamente adaptadas por aqueles especialistas nessa técnica (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edição), ed. A. Genaro, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA).

[00117] A composição vacinal da presente invenção pode ser administrada como um produto sólido, líquido ou aerossol, por qualquer método conveniente para a administração de vacinas incluindo oral e a injeção parenteral (ex. intravenoso, subcutâneo ou intramuscular), além disso, esta composição pode ser preparada pela mistura dos antígenos proteicos e depois adjuvados, ou adjuvando os antígenos por separado e depois misturando-os.

[00118] As composições que compreendem esta invenção podem ser administradas em diferentes esquemas de imunização.

[00119] Adicionalmente, são providas composições estabilizadas dos antígenos da presente invenção. As composições estabilizadas resultam na ausência de agregados proteicos, o que garante a não interferência na interação antígeno-anticorpo, relacionada à agregação, nos imunoenaios da presente invenção.

[00120] Em um aspecto particular, a composição é para imunização

contra rubéola.

[00121] Em uma modalidade, a composição é uma composição vacinal da classe de subunidade.

[00122] Dentre as vantagens de uma vacina com proteínas recombinantes pode-se citar a elevada reprodutibilidade de lote para lote, obtenção de soroconversão e titulação próximas daquelas obtida após a infecção natural (diante da escolha adequada dos antígenos) e possibilidade de transporte em cadeia refrigerada (8°C). Adicionalmente, existe um avanço significativo permitido com vacinas de subunidade, pois ela torna possível sua utilização em pacientes imunossuprimidos, imunodeficientes e gestantes. Sendo o principal avanço da vacina pretendida a sua utilização em gestantes suscetíveis, levando a soroconversão segura em aproximadamente sete dias, eliminando assim o risco de rubéola congênita não apenas para as gestações futuras, mas principalmente, para a o feto em desenvolvimento.

[00123] Em um sétimo aspecto, a invenção provê um kit para diagnóstico de rubéola, que compreende uma ou mais proteínas recombinantes da presente invenção.

[00124] Opcionalmente, o kit compreende ainda um controle de reação.

[00125] Em uma modalidade, o controle de reação é um controle de reação positivo.

[00126] Adicionalmente, o kit pode ainda compreender um meio de detecção do complexo antígeno/anticorpo, o qual pode compreender um gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável.

[00127] Os meios de detecção podem ser aqueles conhecidos na técnica. Um exemplo não limitativo do meio de detecção pode ser um conjugado compreendido por um anticorpo acoplado a um composto gerador de sinal, capaz de gerar um sinal detectável.

[00128] Em uma modalidade, os kits são desenvolvidos para uso em

imunoensaios. Em uma modalidade mais específica, os imunoensaios são do tipo ELISA indireto.

[00129] Em um oitavo aspecto, a invenção provê o uso de uma ou mais proteínas recombinantes ou do kit como aqui descritos para diagnóstico de rubéola.

[00130] A invenção ainda provê um método para diagnóstico de rubéola que envolvem as etapas de:

(a) prover uma ou mais proteínas recombinantes ou uma composição de acordo com a invenção;

(b) contatar as ditas uma ou mais proteínas ou a dita composição com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/anticorpo.

[00131] Em uma concretização preferencial, é realizado o modelo de imunoensaio indireto. Ainda mais preferencialmente, o imunoensaio é ensaio ELISA.

[00132] Em uma modalidade, para os ensaios ELISA, são aplicados de 12,5 a 400 ng de antígeno por poço. Em uma modalidade específica, são aplicados de 50 a 200 ng de antígenos por poço.

[00133] Os antígenos foram avaliados quanto aos melhores desempenhos a partir da AUC (Área Abaixo da Curva) da curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*), da maior sensibilidade e especificidade, maior capacidade de separação, bem como o menor desvio padrão para as amostras negativas.

[00134] As proteínas desenvolvidas foram avaliadas individualmente e em conjunto. Nos ensaios realizados no formato ELISA para a análise individual de desempenho para os antígenos, os melhores desempenhos foram

alcançados para a Rub14 e a Rub17 (96% e 91%, respectivamente). Dos desempenhos apresentados, o índice de reatividade para os soros positivos foi, em geral, acima de 2,39 e para os soros negativos, abaixo de 0,615.

[00135] As combinações Rub9 + Rub2 + Rub 3 e Rub12 + Rub2 + Rub3 em ensaio ELISA combinado apresentou sensibilidade e especificidade de 100% no painel SeraCare, com desempenhos superiores aos obtidos quando os antígenos foram avaliados individualmente no mesmo ensaio. Dentre essas combinações, o conjunto Rub12 + Rub2 + Rub3 foi selecionado para teste com painel sorológico completo.

[00136] A presente invenção revelou antígenos que promoveram altos níveis de discriminação sorológica, obtendo-se ensaios com 100% de especificidade e sem a presença de reação cruzada, o que conta positivamente para a aplicação diagnóstica dos mesmos.

[00137] A concordância obtida com as proteínas recombinantes em relação aos testes comerciais foi superior a 92%, levando em consideração as diferentes tecnologias utilizadas.

[00138] A presente invenção será doravante ilustrada por meio de exemplos, os quais não pretendem, de forma alguma, serem limitativos quando ao escopo e a abrangência da presente invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1- Seleção de regiões antigênicas e construção de plasmídeos de expressão

[00139] Genes sintéticos codificando regiões antigênicas do vírus da rubéola, otimizados para expressão em *E. coli*, foram adquiridos da GenScript (Piscataway, Nova Jersey/EUA) e clonados no plasmídeo pUC57. As regiões antigênicas e epitopos das proteínas estruturais E1, E2 e C do vírus da rubéola foram selecionadas com base em informações da literatura, utilizando a seqüência depositada no GenBank sob o número de acesso P07566.1. A

descrição das sequências de aminoácidos compreendidas por cada construção é dada na Figura 1. Onze construtos genéticos (pET28a-Rub1-Rub7, pET28a-Rub7-2, pET28a-Rub9, pET28a-Rub12 e pET28a-Rub13) codificam proteínas truncadas que abrigam regiões antigênicas de cada uma das três proteínas estruturais. As sequências de codificação para estas proteínas foram subclonadas nos sítios de restrição *BamHI* e *HindIII* do vetor de expressão pET28a. Quatro construtos codificam proteínas quiméricas geradas por combinação de regiões antigênicas de duas ou três proteínas estruturais.

Exemplo 2- Construções quiméricas

[00140] O clone pET28a.Rub14 foi construído pelo isolamento da sequência de codificação da Rub13 utilizando as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII* e pela ligação ao pET28a-Rub12 previamente digerido por *BglII* e *HindIII*. O pET28a-Rub15 foi construído ligando a sequência de codificação da Rub3, isolada de pUC57-Rub3 utilizando *BamHI* e *HindIII*, no plasmídeo pET28a-Rub12 previamente digerido com *BglII* e *HindIII*. O pET28a-Rub16 foi construído inserindo a sequência de codificação da Rub3 digerida com *BamHI* e *HindIII* em pET28a-Rub13 previamente digerido com *BglII* e *HindIII*. O pET28a-Rub16 foi construído inserindo a sequência de codificação da Rub3, isolada de pUC57-Rub3 utilizando *BamHI* e *HindIII*, no plasmídeo pET28a-Rub14 previamente digerido com *BglII* e *HindIII*. Os sítios de restrição *BamHI* e *BglII* são compatíveis para ligação, permitindo estas construções sem a necessidade de alteração de sítos. Todos os clones foram confirmados por análise de sequenciamento e DNA. Todas as proteínas codificadas por estes vetores de expressão contêm um marcador de hexa-histidina na região N-terminal permitindo a purificação subsequente por cromatografia de afinidade com metal imobilizado.

Exemplo 3 - Expressão e purificação de proteínas recombinantes

[00141] As proteínas foram expressas em *Escherichia coli* cepa BL21-Star (DE3) adquirida da Invitrogen (Carlsbad, California, USA). A expressão foi tipicamente realizada utilizando 2-3 L de culturas LB induzidas em OD_{600nm} de aproximadamente 0,7-0,8 com 0,5 mM de IPTG (isopropil-b-D-1-tiogalcto-pyranoside). As células foram coletadas por centrifugação de 8.000 g por 10 minutos a 4°C e armazenadas a -20°C até o uso. Para a purificação proteica as células foram descongeladas e suspendidas em tampão de lise (50 mM Tris.HCl pH 8,0, 500mM NaCl) e lisadas em um aparelho microfluidificador modelo M-110L (Microfluidics, Newton, MA, EUA). Os extratos foram clarificados por centrifugação de 20.000 g, durante 30 minutos a 4°C. Para as proteínas solúveis, os extratos foram injetados em colunas de 5ml His-Trap HP (GE Healthcare) carregadas com Ni²⁺ previamente equilibradas com tampão de lise. Após a injeção da amostra, as colunas foram lavadas com 10 volumes de coluna (CV) de tampão de lise e eluídas com gradientes lineares de imidazol 0-500 mM e as amostras foram coletadas em frações de 1,5 ml. Todas as etapas de purificação foram realizadas em Äkta UPC 100 ou em cromatógrafos Äkta purifier M25 (GE Helthcare).

[00142] Para a purificação de proteínas insolúveis, após centrifugação do extrato, sedimentos foram lavados em tampão de lise contendo 2% (v/v) de Triton X-100 seguido de uma segunda lavagem no mesmo tampão contendo 1M de ureia. Corpos de inclusão foram dissolvidos em tampão contendo 50 mM Tris.HCl pH 8,0, 6M de cloridrato de guanidina e 20 mM β-mercaptoetanol durante 16-18h em temperatura ambiente. A purificação foi realizada como descrito acima, exceto que no tampão de eluição, 6M de hidrocloreto de guanidina foi substituído por 8 M de ureia. Para a cromatografia de troca iônica de Rub3, frações de pico da cromatografia de afinidade foram reunidas e diluídas em 1:5 de tampão A e injetadas em uma coluna SP-Sepharose HP 5 mL (GE Healthcare) e eluídas com um gradiente linear de 100 mM-1M NaCl em tampão A (tampão de embandeiramento: 50

mM Tris.HCl pH 8,0, 100 mM NaCl. Tampão de eluição: 50 mM Tris.HCl pH 8,0, 1 M NaCl). O Rub14 foi adicionalmente purificado em 1 mL de HiTrap Q-Sepharose HP (GE Healthcare) (tampão: 50 mM Tris.HCl pH 8,0, 100 mM NaCl. Tampão de eluição: 50 mM Tris.HCl pH 8,0, 1 M NaCl).

Exemplo 4 – Quantificação de proteínas

[00143] 20 µl de amostras de proteínas foram diluídos em 100 µl de 20 mM tampão fosfato de sódio pH 6,5, contendo 7,2 M hidrocloreto de guanidina utilizando placas de 96 poços UV-transparente (Corning, Corning, NY, EUA) e absorvância em 280 nm determinada em leitor de placa BioTek Synergy H1 (Winooski, Vermont/EUA). A concentração de proteína foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar (ϵ_{280}) de acordo com a equação “concentração molar = $A_{280} / (\epsilon_{280} \times l)$, onde A_{280} é a absorvância determinada em 280 e l é o caminho ótico da cubeta (1 cm). O ϵ_{280} é determinado de acordo com a equação $\epsilon_{280} (M^{-1} cm^{-1}) = 5500W + 1490Y + 200F + 125C$). W corresponde ao número de resíduos de triptofanos, Y ao número de tirosina, F ao número de fenilalanina e C ao número de resíduos de cisteína presentes na sequência da proteína.

Exemplo 5- Amostras sorológicas

[00144] Um painel comercial contendo 23 soros positivos rubéola e 2 soros negativos para o vírus da rubéola e controles negativos adicionais para ambos IgM e IgM de rubéola foram adquiridos da SeraCare LifeSciences Inc. (Milford, MA, EUA, números de catálogo PTR201-00-0.5 e A800-0004, respectivamente). Um controle positivo de rubéola IgG adicional foi obtido do NIBSC ((National Institute for Biological Standards and Controls, Potters Bar, Hertfordshire UK, número de catálogo 14/B654). 41 amostras de soro foram fornecidas pelo Instituto de Imunobiológicos de Biomanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, 135 pelo Instituto Gonçalo Moniz,

FIOCRUZ, Salvador, Brasil, e 44 pelo Laboratório Central do Estado do Paraná, Curitiba, Brasil. O número de soros foi codificado para evitar correlação com os pacientes para preservar sua identidade. O painel inicial completo compreendeu um total de 247 amostras com 32 previamente determinadas como negativas, 81 como positivas e 134 amostras anteriormente não caracterizadas. O painel completo (n = 247) foi testado quanto à presença de anticorpos IgG contra o vírus da rubéola usando os ensaios comercialmente disponíveis Enzygnost (Siemens Healthcare, Fernwald, Alemanha) e Interkit (Katal Biotecnológica, Belo Horizonte, Brasil). Os testes foram realizados essencialmente como descrito pelas instruções do fornecedor. As amostras mostrando o mesmo resultado em ambos os testes comerciais foram mantidas no painel e classificadas como positivas ou negativas. Sete soros que não apresentaram o mesmo resultado em ambos os testes comerciais foram excluídos do painel.

Exemplo 6 – Imunoensaios

[00145] As condições do ensaio ELISA foram determinadas testando uma gama de concentrações de antígeno, diluições de soros e anticorpo secundário. Os antígenos foram testados a 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 ng por poço em 100µL de 50 mM em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,6. Os soros foram testados em diluições 1:100 e 1:200 em 100 µL de PBS contendo Tween-20 a 1% (v/v) e Triton X-100 a 1% (v/v) (PBS-TT). O IgG anti-humano de cabra conjugado com HRP (Biomanguinhos/LATED, FIOCRUZ-RJ) foi utilizado nas diluições 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000 em PBS-TT. As melhores condições dos ensaios foram determinadas usando três soros positivos e quatro negativos. O fundo foi determinado medindo a absorbância de dois poços contendo sem antígenos e subtraído da absorbância das reações contendo os soros de teste. As condições para os ensaios foram escolhidas com base na maior diferença entre a média da absorbância das

amostras positivas e negativas mais três valores do desvio padrão. Utilizando estes critérios, a concentração de antígeno selecionada para os ensaios foi de Rub2, 200 ng/poço; Rub3, 200 ng/poço; Rub4, 200 ng/poço; Rub 7-2, 200 ng/poço; Rub9 400 ng/poço; Rub12, 100 ng/poço; Rub13, 200 ng/poço; Rub14, 100 ng/poço; Rub15, 200 ng/poço; Rub16, 200 ng/poço; e Rub17 100 ng/poço. As amostras de soro diluídas a 1:200 e o anticorpo secundário a 1:40.000 deram os melhores resultados.

[00146] Ensaios de ELISA indireto foram realizados em 96 cavidades de fundo chato de alta capacidade de ligação (Nunc-MaxiSorp, EUA). As microplacas foram adsorvidas utilizando 100 µl de suspensão de antígeno em 50 mM de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante 16 horas a 4°C. Os poços foram lavados cinco vezes com 250 µl de PBS-TT. Os poços foram bloqueados com PBS-TT suplementado com BSA 2% (220 µL) em temperatura ambiente. Após 45 minutos, microplacas foram lavadas cinco vezes com PBS-TT (250 µL). 100 µl de soros de teste diluídos em PBS-TT foram adicionados às placas e incubados a 37 °C durante 60 min. Os poços foram lavados cinco vezes e incubados com 100 µL de IgG anti-humano de cabra conjugado a HRP (Biomanguinhos LATED, FIOCRUZ-RJ) diluídos a 1:20.000 em PBS-TT e incubados a 37 °C por 30 min. Os poços foram lavados cinco vezes e o ensaio foi desenvolvido com 100µL de tetrametilbenzidina (TMB) (KPL, Gaithersburg, EUA, cat. Num. 53-00-03). As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 20 min e as reações foram interrompidas com 100 µl de H2SO4 0,5 M e a absorbância determinada a 450 nm em um leitor de placas BioTek Synergy H1 (Winooski, VT, EUA).

Exemplo 7 – Análise estatística

[00147] Os dados de ELISA foram analisados utilizando GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, EUA). O *cutoff* ou linha de corte (CO) foi

determinado para cada placa separada de acordo com a curva ROC (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000). Ensaio iniciais foram realizados com o painel SeraCare de soro e, nestes casos, o CO foi arbitrariamente definido como o ponto onde a especificidade foi 100%, uma vez que o painel possui apenas duas amostras negativas e 23 positivas. Estatísticas descritivas foram apresentadas como média geométrica \pm DP. Para testar a normalidade dos conjuntos de dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste t de Student, e quando a hipótese de homogeneidade de variância não foi confirmada, foi utilizado o teste de postos sinalizados de Wilcoxon. Todas as análises foram bicaudais e um valor de p inferior a 5% foi considerado significativo ($p < 0,05$). A análise da linha de corte foi utilizada para identificar o valor ótimo de densidade óptica (DO) para diferenciar entre amostras negativas e positivas. O valor limite foi estabelecido medindo-se a distância mais longa da linha diagonal formada pelos pontos extremos da curva característica de operação do receptor (ROC) [sensibilidade x (1-especificidade)]. Todos os resultados foram expressos através da representação gráfica dos valores em formato de índice representando a razão entre a DO de uma dada amostra e a DO de corte pertencente a cada microplaca. Este índice é referido como índice de reatividade (IR) e todos os resultados $< 1,00$ foram considerados negativos. Se o valor de IR de uma amostra fosse de $1,0 \pm 10\%$, era considerado indeterminado (ou na zona cinzenta); estas amostras foram consideradas inconclusivas. Os desempenhos do teste ELISA foram calculados usando uma abordagem dicotômica e comparados em termos de sensibilidade (Se), especificidade (Sp), exatidão e índice de Youden (J) (Ouchchane, Rabilloud et al. 2009). Um intervalo de confiança (IC) foi construído para abordar a precisão das proporções estimadas com um nível de confiança de 95%. A magnitude de confiança com o ELISA foi avaliada pelo coeficiente de Kappa de Cohen (κ) (Landis e Koch, 1977), que considera que a confiança ocorre apenas por acaso, além dos

cálculos simples de confiança percentual. Seus valores são interpretados como pobres ($\kappa \leq 0$), leves ($0 < \kappa \leq 0.20$), regulares ($0.21 < \kappa \leq 0.40$), moderados ($0.41 < \kappa \leq 0.60$), substanciais ($0.61 < \kappa \leq 0.80$) e quase concordância perfeita ($0,81 < \kappa \leq 1,0$).

Exemplo 8 – Construtos genéticos contendo regiões de epítipo de rubéola

[00148] Quinze clones foram construídos utilizando regiões de epítipo das proteínas estruturais individuais de rubéola E1, E2 e da proteína C do capsídeo. Uma lista de todos os clones com a respectiva composição de aminoácidos é apresentada na Tabela 1. Oito clones contém epítipos da proteína estrutural E1. O clone Rub1 contém 64 aminoácidos de três regiões diferentes de E1. Os clones Rub4 e Rub5 contém, respectivamente, os aminoácidos 1 a 133 e 1 a 180 enquanto que o Rub6 contém os aminoácidos 201 a 432 de E1 fundidos a duas cópias da proteína SlyD de *Escherichia coli*. Essas três construções são baseadas no trabalho anterior publicado por Scholz e colaboradores (2008). Rub8 (aminoácidos 1 a 432) e Rub 11 (aminoácidos 1 a 436), correspondem a E1 quase total. Rub9 foi construída através da remoção de regiões de associação de membrana interna com base na estrutura cristalina de E1 (DuBois et al., 2013). Rub 12 compreende epítipos E1 das posições de aminoácidos 194 a 332 e de 364 a 436. Três clones contém epítipos da proteína estrutural E2. O clone Rub2 contém os resíduos 35 a 105 da E2, a Rub10 contém os resíduos 1 a 282 e a Rub13, resíduos 1-85, 125-189 e 237-270. Quatro clones contém epítipos da proteína C do capsídeo. Rub3 contém os aminoácidos 1-123, Rub3-2 os aminoácidos 1-123 e 205-277, Rub7-2 os aminoácidos 1-277 e Rub7 os aminoácidos 1-300. Além disso, quatro proteínas quiméricas foram construídas. A proteína quimérica Rub14 foi construída fundindo Rub13 ao terminal C de Rub12, a proteína quimérica Rub15 foi construída fundindo Rub3 ao terminal C de Rub12 e a proteína quimérica Rub16 foi construída fundindo Rub3 ao terminal C de Rub13. A

proteína quimérica Rub17, contendo epítomos de E1, E2 e C, foi construída pela fusão de Rub3 ao C-terminal de Rub14.

Tabela 1 – Lista de proteínas recombinantes utilizadas

Clone	Proteína	Descrição (aa)	MW
pET28a-Rub1	Rub1	E1 (157-176, 213-239, 374-390)	10,7
pET28a-Rub2	Rub2	E2 (31-105)	12,31
pET28a-Rub3	Rub3	C (1-123)	17,15
pET28a-Rub4	Rub4	E1 (1-133)	19
pET28a-Rub5	Rub5	E1 (1-180)	23,18
pET28a-Rub6	Rub6	E1 (201-432)	28,4
pET28a-Rub7	Rub7	C (1-300)	37
pET28a-Rub7-2	Rub7-2	C (1-277)	34,41
pET28a-Rub9	Rub9	E1 (1-41, 149-249, 294-421)	33,1
pET28a-Rub12	Rub12	E1 (194-332, 364-436)	26,47
pET28a-Rub13	Rub13	E2 (1-80, 125-189, 237-270)	23,52
pET28a-Rub14	Rub14	Quimerica: Rub12+Rub13	49,99
pET28a-Rub15	Rub15	Quimerica: Rub12+Rub3	40,67
pET28a-Rub16	Rub16	Quimerica: Rub13+Rub3	43,62
pET28a-Rub17	Rub17	Quimerica: Rub12+Rub13+Rub3	67,14

Exemplo 9 – Expressão e purificação de proteínas recombinantes

[00149] Os níveis de expressão das 15 construções foram avaliados utilizando a cepa BL21-Star (DE3) de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). A expressão foi testada em diferentes temperaturas (37°C, 25°C e 15°C), diferentes tempos de indução e concentração de IPTG, a fim de tentar melhorar o rendimento e a solubilidade das proteínas recombinantes. Com exceção de Rub6, todas as proteínas recombinantes contendo epítomos E1 foram expressas como corpos de inclusão e purificadas a partir da fração insolúvel. Rub 1 expressou em baixos níveis e sua purificação resultou em

baixos rendimentos. Ela foi excluída deste estudo, uma vez que Rub9 e Rub12 contêm os epítomos encontrados em Rub1 e expressam em maiores quantidades. Rub4 (~ 8 g / litro de cultura) foi purificada a partir de corpos de inclusão. A purificação da Rub5, no entanto, não teve sucesso. Rub6 foi purificada a partir do extrato solúvel, mas não foi considerada para imunoenaios, uma vez que era altamente instável, sempre mostrando um padrão complexo de bandas após análise de integridade de SDS-PAGE. Rub9 contém três segmentos da proteína E1 (Tabela 1) que abrigam a maioria dos epítomos descritos para esta proteína. Ela foi purificada em grandes quantidades (~ 75 mg / litro de cultura) a partir de corpos de inclusão por cromatografia de afinidade sob condições desnaturantes e subsequentemente em tampão sem ureia. Rub12 contém dois segmentos de E1 (Tabela 1) projetados para serem usados na construção subsequente de proteínas quiméricas. Rub 12 foi solubilizada em tampão contendo 8 M de ureia, diluída em tampão contendo 1 M de ureia e purificada por cromatografia de afinidade seguida por uma cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose. Os contaminantes foram retidos na coluna Q-Sepharose e o fluxo foi concentrado e fracionado em uma coluna Superdex 75, resultando em uma quantidade aproximada de 14 mg / litro de cultura.

[00150] Para a proteína E2 do envelope da rubéola, que contém um número menor de epítomos, apenas duas construções foram testadas. Rub2 foi expressa nas frações solúvel e insolúvel dos extratos de *E. coli*. No entanto, quantidades maiores (~ 7,5 mg / litro de cultura) foram obtidas após a purificação da fração insolúvel. Rub13, contendo três regiões do epítomo E2 (Tabela 1), foi concebido para ser utilizado na construção das proteínas quiméricas. Foi purificado a partir da fração insolúvel, produzindo aproximadamente ~ 9 mg/litro de cultura.

[00151] Três proteínas, Rub3, Rub7 e Rub7-2, contêm epítomos da proteína do capsídeo do vírus da rubéola. A Rub 3 foi expressa na fração

solúvel e purificada por etapa de cromatografia de afinidade seguida por uma cromatografia em SP-Sepharose, produzindo aproximadamente 8mg por litro de cultura. Rub7 foi expressa em baixos níveis na fração insolúvel e sua purificação não teve sucesso. Rub7 corresponde à proteína da capsídeo de rubéola de 300 aminoácidos de tamanho completo, incluindo 23 resíduos do C-terminal do peptídeo sinal. Portanto, uma nova construção foi feita, Rub7-2 contendo os resíduos 1-277. Rub7-2 foi encontrado tanto como proteína solúvel e insolúvel e maiores rendimentos foram obtidos após a purificação da fração insolúvel (~ 29 mg / litro de cultura).

[00152] Todas as proteínas quiméricas (Rub14, Rub15, Rub16 e Rub17, Tabela 1) foram expressas como proteínas insolúveis e purificadas por cromatografia de afinidade sob condições desnaturantes. O rendimento foi menor em comparação com as construções de proteína única (quantidade aproximada em mg por litro de cultura: Rub14, 3; Rub15, 1,5; Rub16, 4; Rub17, 6,4), mas em níveis compatíveis para produção para aplicações de imunodiagnóstico.

Exemplo 10 – Validação das amostras sorológicas

[00153] Um painel inicial de 247 amostras de soro foi avaliado utilizando os testes disponíveis comercialmente Enzygnost (Siemens Healthcare, Fernwald, Alemanha) e Interkit (Katal Biotecnológica, Belo Horizonte, Brasil). Os resultados da avaliação com o teste Enzygnost revelaram apenas dois soros caindo na zona indeterminada, enquanto os resultados da avaliação com o teste Interkit revelaram cinco soros indeterminados (Figura 2A, 247 soros; 2B 240 soros). Os sete soros indeterminados baseados nesses dois testes foram excluídos deste estudo e o painel final foi composto por 240 soros com 35 classificados como negativos e 205 como positivos para anticorpos contra rubéola (Figura 2B 240 soros).

Exemplo 11 – Avaliação do desempenho de antígeno recombinante com um painel restrito

[00154] O painel de soro obtido da SeraCare Life Sciences Inc. (Milford, MA, EUA) utilizado para testar o screening do potencial das proteínas recombinantes que foram purificadas com sucesso. Este painel contém 23 amostras positivas e 2 negativas. O índice de reatividade e os escores de AUC e selectividade para onze proteínas isoladas, proteínas quiméricas e combinações de duas e três proteínas são mostrados na Tabela 2. Os resultados para as proteínas com melhor desempenho também são mostrados na Figura 3. Para ensaios de proteína única, as proteínas quiméricas Rub14 e Rub17 apresentaram os melhores resultados, ambas com AUC de 0,989 ($p = 0,0243$), atingindo sensibilidade de 96% e 91%, respectivamente. A combinação das proteínas isoladas Rub + Rub2 + Rub3 e Rub12 + Rub2 + Rub3 resultou em 100% de sensibilidade para este painel, ambas apresentando AUC de 1.000 ($p = 0,0213$) e índices de reatividade de 2,36 e 4,38, respectivamente. Essas combinações de proteínas recombinantes apresentaram resultados semelhantes aos testes Enzygnost e Interkit, que apresentaram índices de reatividade de 4,49 e 2,38 (Figura 3, Tabela 2). As proteínas quiméricas Rub14 e Rub17 e a combinação das proteínas Rub2, Rub3 e Rub12 foram selecionadas para teste com o painel completo de soros.

Tabela 2 – Parâmetros de desempenho de proteínas recombinantes

Se: sensibilidade. IC: intervalo de confiança. AUC: área abaixo da curva ROC

Proteína	Índice de Reatividade	AUC (95% IC)	Se % (95% IC)
Rub2	0,35	0,750 (\pm 0,130)	60,9 (38,5-80,3)
Rub3	1,05	0,609 (\pm 0,102)	60,9 (38,5-80,3)
Rub4	0,66	0,696 (\pm 0,126)	30,4 (13,2-52,9)
Rub7-2	1,61	0,848 (\pm 0,123)	69,6 (47,1-86,8)
Rub9	1,76	0,935 (\pm 0,051)	91,3 (72,0-98,9)
Rub2+Rub3	1,47	0,804 (\pm 0,090)	73,9 (51,6-89,8)
Rub9+Rub2	1,55	0,783 (\pm 0,086)	78,3 (56,3-92,5)
Rub9+Rub3	1,76	0,783 (\pm 0,086)	78,3 (56,3-92,5)
Rub9+Rub2+Rub3	2,38	1,000 (\pm 0,000)	100 (85,2-100)
Rub12	3,51	0,957 (\pm 0,047)	87,0 (66,4-97,2)
Rub12Rub2+Rub3	4,38	1,000 (\pm 0,000)	100 (85,2-100)
Rub13	1,05	0,609 (\pm 0,104)	52,2 (30,6-73,2)
Rub14	7,76	0,989 (\pm 0,020)	95,7 (78,1-99,9)
Rub15	1,39	0,891 (\pm 0,065)	87,0 (66,4-97,2)
Rub16	1,19	0,717 (\pm 0,094)	69,6 (47,1-86,8)
Rub17	2,26	0,989 (\pm 0,020)	91,3 (72,0-98,9)

Exemplo 12 – Avaliação do desempenho de antígeno recombinante com o painel sorológico completo

[00155] Um total de 240 soros, 36 dos quais classificados como negativos e 204 como positivos para anticorpos contra a rubéola, foi testado usando os antígenos quiméricos Rub14 e Rub17 e a combinação de antígenos de proteínas únicas Rub2, Rub3 e Rub12, que foram previamente selecionados com base na resultados com os soros obtidos da SeraCare LifeSciences Inc. (Milford, MA, EUA). Os valores de AUC (área abaixo da curva) para o painel completo foram 0,932 ($p < 0,0001$) para Rub14, 0,926 ($p < 0,0001$) para Rub17 e 0,985 ($p < 0,0001$) para Rub2 + Rub3 + Rub12 (Figura 4), demonstrando altos valores diagnósticos para estas proteínas recombinantes. Estas proteínas recombinantes mostraram melhores resultados para os soros positivos com Rub2 + Rub3 + Rub12 mostrando AUC de 0,99 ($p < 0,0001$), AUC de Rub14 de 0,98 ($p < 0,0001$) e AUC de Rub17 de 0,931 ($p < 0,0001$). Para o painel completo, a especificidade correspondeu a 0,889 para Rub17, 0,861 para Rub2 + Rub3 + Rub12 e 0,806 para Rub14. A precisão foi de 0,971 para a combinação Rub2 + Rub3 + Rub12, 0,954 para

Rub14 e 0,925 para Rub17.

[00156] A maioria das amostras de soro não tem descrição sobre o modo de imunização e período de infecção em relação ao momento da coleta de soro. A exceção são as amostras SC-07, SC-19 e SC-24 do painel do SeraCare, que são conhecidas por serem coletadas após a imunização por vacinação e as amostras SC-03 e SC-13, que são do mesmo doador, coletadas 14 dias separados, com a amostra do primeiro ponto de tempo (SC-03) positiva para IgM de rubéola e a segunda (SC-13) negativa para IgM de rubéola. O índice de reatividade para estas cinco amostras é mostrado na Figura 5. As amostras de infecção natural (SC-03 e SC-13) apresentam índice de reatividade muito maior que as amostras positivas devido à vacinação (SC-07, SC-19 e SC-24). A amostra SC-07 mostra um alto índice de reatividade para a proteína do capsídeo. Apesar do baixo número de soros, essa diferença de reatividade indica que a infecção natural pode gerar uma resposta mais forte, pelo menos, na produção de IgG.

Exemplo 13 – Composições que compreendem as proteínas recombinantes da invenção

[00157] Composições imunogênicas foram preparadas com as proteínas recombinantes como definidas na presente invenção, particularmente com a Rub 14 (Quimérica E1/E2), além de um veículo farmacologicamente aceitável.

[00158] Composições também foram preparadas com outras construções, tais como a Rub17 e o conjunto Rub12+Rub2+Rub3 (Quimérica E1/E2/C).

[00159] Na resposta imune humana ao vírus, a imunidade é obtida com anticorpos preferencialmente anti-E1. Resposta tardia que corresponde a uma imunidade duradoura: anti-E1/E2. Pacientes suscetíveis tem anticorpos anti-C e anti-E2, mas não tem anti-E1.

[00160] Com as proteínas Rub7-2, Rub12, Rub14 e Rub17 foi possível verificar títulos elevados em soros de pacientes recentemente imunizados e recentemente infectados diretamente com o vírus. Este resultado foi obtido com duas técnicas distintas com os mesmos soros e proteínas: ELISAI e DotBlot.

[00161] É evidente que os exemplos acima foram apresentados apenas em caráter ilustrativo, e que modificações e variações dos mesmos, óbvias para os técnicos no assunto, são consideradas como inclusas no escopo da presente invenção.

[00162] As reivindicações a seguir não pretendem, de modo algum, serem limitadoras do escopo da presente invenção. Várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e do escopo da presente invenção.

REFERÊNCIAS

Os documentos citados são incorporados aqui por referência em sua totalidade. SEPPANEN, H.; HUHTALA, M. L.; VAHERI, A.; SUMMERS, M. D.; OKERBLOM, C. Diagnostic potential of bucalovirus-expressed Rubella-virus envelope proteins. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 9, p. 1877-1882. 1991.

FORD, D. K.; REID, G. D.; TINGLE, A. J.; MITCHELL, L. A.; SCHULZER, M. Sequential follow-up observations of a patient with rubella associated persistent arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 51, n. 3, p. 407-410. 1992.

ILKOW, C. S.; GOPING, I. S.; HOBMAN, T. C. The Rubella Virus Capsid Is an Anti-Apoptotic Protein that Attenuates the Pore-Forming Ability of Bax. *Plos Pathogens*, v. 7, n. 2, p. 23. 2011.

DUSZAK, R. S. Congenital rubella syndrome major-review. *Optometry-Journal of the American Optometric Association*, v. 80, n. 1, p. 36-43. 2009.

ORENSTEIN, W. A.; BART, K. J.; HINMAN, A. R.; PREBLUD, S. R.; GREAVES, W. L.; DOSTER, S. W.; STETLER, H. C.; SIROTKIN, B. The opportunity and obligation to eliminate rubella from the United-States. *Jama-Journal of the American Medical Association*, v. 251, n. 15, p. 1988-1994. 1984.

LEE, J. Y.; BOWDEN, D. S. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 4, p. 571-+. 2000.

BANATVALA, J. E.; PECKHAM, C. Rubella viruses. Netherlands: Elsevier, 2007.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Rubella vaccines: WHO position Paper. *Weekly Epidemiological Record*, v. 86, n. 29, p. 301–316. 2011.

BARON, E. J.; MILLER, J. M.; WEINSTEIN, M. P.; RICHTER, S. S.; GILLIGAN, P. H.; THOMSON, R. B., JR.; BOURBEAU, P.; CARROLL, K. C. *et al.* A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis*, v. 57, n. 4, p. e22-e121. 2013.

CDC, C. F. D. C. A. P. Measles, Mumps, and Rubella - Vaccine Use and Strategies for Elimination of Measles, Rubella, and Congenital Rubella Syndrome and Control of Mumps: Recommendations of the Advisory

Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR, v. 47, n. RR-8. 1998.

Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Brasil livre da rubéola: campanha nacional de vacinação para eliminação da rubéola, Brasil, 2008: relatório (série B. Textos Básicos de saúde). Brasília: Ministério da saúde, 2009. 196 p.

PORTERFIELD, J. S.; CASALS, J.; CHUMAKOV, M. P.; GAIDAMOVICH, S. Y.; HANNOUN, C.; HOLMES, I. H.; HORZINEK, M. C.; MUSSGAY, M. *et al.* Togaviridae. Intervirology, v. 9, n. 3, p. 129-148. 1978.

WOLINSKY, J. S.; MCCARTHY, M.; ALLEN-CANNADY, O.; MOORE, W. T.; JIN, R.; CAO, S. N.; LOVETT, A.; SIMMONS, D. Monoclonal antibody-defined epitope map of expressed rubella virus protein domains. J Virol, v. 65, n. 8, p. 3986-94. 1991.

DOMINGUEZ, G.; WANG, C. Y.; FREY, T. K. Sequence of the genome RNA of Rubella-virus - evidence for genetic rearrangement during togavirus evolution. Virology, v. 177, n. 1, p. 225-238. 1990.

FREY, T. K.; MARR, L. D.; HEMPHILL, M. L.; DOMINGUEZ, G. Molecular cloning and sequencing of the region of the Rubella virus genome coding for glycoprotein E1. Virology, v. 154, n. 1, p. 228-232. 1986.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Fields Virology. 5. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2007.

BARDELETTI, G.; KESSLER, N.; AYMARDHENRY, M. Morphology, Biochemical analysis and neuraminidase activity of Rubella-virus. Archives of Virology, v. 49, n. 2-3, p. 175-186. 1975.

CLAUS, C.; HOFMANN, J.; UBERLA, K.; LIEBERT, U. G. Rubella virus pseudotypes and a cell-cell fusion assay as tools for functional analysis of the rubella virus E2 and E1 envelope glycoproteins. Journal of General Virology, v. 87, p. 3029-3037. 2006.

OKER-BLOM, C.; KALKKINEN, N.; KAARIAINEN, L.; PETTERSSON, R. F. Rubella virus contains one capsid protein and three envelope glycoproteins, E1, E2a, and E2b. J Virol, v. 46, n. 3, p. 964-73. 1983.

HO-TERRY, L.; COHEN, A. The role of glycosylation on haemagglutination and immunological reactivity of rubella virus. Arch Virol, v. 79, n. 3-4, p. 139-46. 1984.

WHO. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wilde-type rubella viruses. WHO, 2004.

MITCHELL L. A.; DECARIE, D.; TINGLE, A. J.; ZREIN, M.; LACROIX, M. Identification of immunoreactive regions of rubella virus-E1 and virus-E2 envelop proteins by using synthetic peptides. Virus Research, v. 29, n. 1, p. 33-57. 1993.

MITCHELL, L. A.; ZHANG, T.; HO, M.; DECARIE, D.; TINGLE, A. J.; ZREIN, M.; LACROIX, M. Characterization of Rubella viurs-specific antibody-responses by using a new synthetic peptide-based enzyme-linked-immunosorbent. Journal of Clinical Microbiology, v. 30, n. 7, p. 1841-1847.

1992.

LOVETT, A. E.; MCCARTHY, M.; WOLINSKY, J. S. Mapping cell-mediated immunodominant domains of the Rubella-virus structural proteins using recombinant proteins and synthetic peptides. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 445-452. 1993.

GREEN, K. Y.; DORSETT, P. H. Rubella-virus antigens - localization of epitopes involved in hemagglutination and neutralization by using monoclonal-antibodies. *Journal of Virology*, v. 57, n. 3, p. 893-898. 1986a.

OU, D.; CHONG, P.; TRIPET, B.; GILLAM, S. Analysis of T- and B-cell epitopes of capsid protein of rubella virus by using synthetic peptides. *J Virol*, v. 66, n. 3, p. 1674-81. 1992.

LUCKOW, V. A.; SUMMERS, M. D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio-Technology*, v. 6, n. 1, p. 47-55. 1988.

ILKOW, C. S.; MANCINELLI, V.; BEATCH, M. D.; HOBMAN, T. C. Rubella virus capsid protein interacts with poly(A)-binding protein and inhibits translation. *Journal of Virology*, v. 82, n. 9, p. 4284-4294. 2008.

STARKEY, W. G.; NEWCOMBE, J.; CORBETT, K. M.; LIU, K. M.; SANDERS, P. G.; BEST, J. M. Use of Rubella virus E1 fusion proteins for detection of Rubella virus antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 270-274. 1995

PRASAD, V. M.; WILLOWS, S. D.; FOKINE, A.; BATTISTI, A. J.; SUN, S. Y.; PLEVKA, P.; HOBMAN, T. C.; ROSSMANN, M. G. Rubella virus

capsid protein structure and its role in virus assembly and infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 110, n. 50, p. 20105-20110. 2013.

MEURMAN, O. H. Antibody-responses in patients with rubella infection determined by passive hemagglutination, hemagglutination inhibition, complement-fixation, and solid-phase radioimmunoassay tests. Infection and Immunity, v. 19, n. 2, p. 369-372. 1978.

TRUANT, A. L.; BARKSDALE, B. L.; HUBER, T. W.; ELLIOTT, L. B. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent-assay with indirect hemagglutination and hemagglutination inhibition for determination of Rubella-virus antibody - evaluation of immune status with commercial reagents in a clinical laboratory. Journal of Clinical Microbiology, v. 17, n. 1, p. 106-108. 1983.

LEQUIN, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry, v. 51, n. 12, p. 2415-2418. 2005.

WANDINGER, K. P.; SASCHENBRECKER, S.; STEINHAGEN, K.; SCHEPER, T.; MEYER, W.; BARTELT, U.; ENDERS, G. Diagnosis of recent primary rubella virus infections: Significance of glycoprotein-based IgM serology, IgG avidity and immunoblot analysis. Journal of Virological Methods, v. 174, n. 1-2, p. 85-93. 2011.

MEDICI, M. C.; MARTINELLI, M.; ALBONETTI, V.; CHEZZI, C.; DETTORI, G. Evaluation of rubella virus immunoglobulin G (IgG) and IgM assays with the new video instrument. Journal of Clinical Microbiology, v.

46, n. 5, p. 1847-1849. 2008.

Skendzel et al 1996 - Rubella immunity. Defining the level of protective antibody.

Mortimer et al 1981 - P.P. Mortimer, J.M.B. Edwards, A.D. Porter, R.S. Tedder, J.E. Mace, A. Hutchinson, Are many women immunized against rubella unnecessarily?

Pustowoit et al 1994 - B.T.H. Pustowoit, J. Hofmann, Aspects of Antibody Quantification in Rubella and CMV-serology, European Group for Rapid Viral Diagnosis, 1994.

Dimech et al 2013 - Investigation into Low-Level Anti-Rubella Virus IgG Results Reported by Commercial Immunoassays.

Dimech et al 1992 - Dimech W, Bettoli A, Eckert D, Francis B, Hamblin J, Kerr T, Ryan C, Skurrie I. 1992. Multicenter evaluation of five commercial rubella virus immunoglobulin G kits which report in international units per milliliter.

Dimech et al 2008 - W. Dimech, L. Panagiotopoulos, B. Francis, N. Laven, J. Marler, D. Dickeson, T. Panayotou, K. Wilson, R. Wootten, E.M. Dax, Evaluation of eight anti-rubella virus immunoglobulin g immunoassays that report results in international units per milliliter.

Greenwood et al 2010 - N.P. Greenwood, I.G. Ovsyannikova, R.A. Vierkant, M.M. O'Byrne, G.A. Poland, A qualitative and quantitative comparison of two rubella virus-specific IgG antibody immunoassays.

Enders et al 2013 - M. Enders, U. Bartelt, F. Knotek, K. Bunn, S. Strobel, K. Dietz, G. Enders, Performance of the elecsys rubella IgG assay in the diagnostic laboratory setting for assessment of immune status, Clin. Vaccine Immunol. 20 (2013) 420–426.

Dimech et al 2016 - Wayne Dimech,^a Liliane Grangeot-Keros,^b Christelle Vauloup-Fellous. Standardization of Assays That Detect Anti-Rubella Virus IgG Antibodies.

Enders e Knotek, 1989 - Rubella IgG total antibody avidity and IgG subclass-specific antibody avidity assay and their role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection.

Cusi et al. 1993 - Cusi MG1, Valensin PE, Cellesi C. Possibility of reinfection after immunization with RA27/3 live attenuated rubella virus.

Bullens et al. 2000 - Congenital rubella syndrome after maternal reinfection.

Best et al. 1989 - Fetal infection after maternal reinfection with rubella: criteria for defining reinfection.

Morgan-Capner et al. 1991 - Outcome of pregnancy after maternal reinfection with rubella.

OMS, 2008 - The Immunological Basis for Immunization Series. Module 11: Rubella.

Barlinn et al 2014 - Susceptibility to cytomegalovirus, parvovirus B19 and age-dependent differences in levels of rubella antibodies among pregnant women.

Smits et al 2014 - Seroprevalence of rubella antibodies in The Netherlands after 32 years of high vaccination coverage.

Alsibiani 2014 - Rubella immunity among pregnant women in Jeddah, Western Region of Saudi Arabia.

Mortlock e Farthing, 2014 - Rubella antibody status of patients attending a south-west London antenatal clinic, 2007–2012.

Watson et al 1998 - Measles, mumps, and rubella-vaccine use and strategies for elimination of measles, rubella, and congenital rubella syndrome and control of mumps: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).

Lin et al 2012 - Persistence and titer changes of rubella virus antibodies in primiparous women who had been vaccinated with strain RA 27/3 in Junior High School.

Kinoshita e Nishiura 2016 - Assessing herd immunity against rubella in Japan: a retrospective seroepidemiological analysis of age-dependent transmission dynamics.

OMS, 2014 - WHO Expert Committee on Biological Standardization http://who.int/biologicals/technical_report_series/en/.

Enders et al 2013 - Performance of the Elecsys Rubella IgG Assay in the Diagnostic Laboratory Setting for Assessment of Immune Status.

Sato et al 2016 - Use of recombinant antigens for sensitive serodiagnosis of American tegumentary leishmaniasis caused by different *Leishmania* species.

Kats et al 2012 - An Automated ELISA Using Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of B Virus Infections in Macaques.

DuBois et al 2013 - Functional and evolutionary insight from the crystal structure of rubella virus protein E1.

Zhang et al 1992 - Detection of rubella virus-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies by immunoblot assays.

Best & Enders, 2007 - Laboratory diagnosis of rubella and congenital rubella.

Landis, J. R. and G. G. Koch (1977). "The measurement of observer agreement for categorical data." *Biometrics* 33(1): 159-74.

Ouchchane, L., M. Rabilloud, et al. (2009). Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives. Évaluation des méthodes d'analyse appliquées aux sciences de la vie et de la santé - Biostatistique. R. BEUSCART. Paris, Omniscience: 49-78.

McCarthy et al 1993. Immunodominant T-Cell Epitopes of Rubella Virus Structural Proteins Defined by Synthetic Peptides. *Journal of Virology*, p. 673-681.

Mitchell et al 1999. Identification of rubella virus T-cell epitopes recognized in anamnestic response to RA27/3 vaccine: associations with boost in neutralizing antibody titer. *Vaccine* 17: 2356-2365.

Wilson et al 2006. Humoral Immune Response to Primary Rubella Virus Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, p. 380–386.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos uma região antigênica do vírus da rubéola selecionada a partir de regiões estruturais E1, E2 e C.

2. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

3. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que consiste na sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 e 9.

4. Proteína recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que é para uso no diagnóstico de rubéola.

5. Sequência de DNA sintético, caracterizada pelo fato de que codifica a proteína recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Sequência de DNA sintético de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 e 10 e suas degenerações.

7. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de DNA sintético como definida na reivindicação 5 ou 6.

8. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor de expressão como definido na reivindicação 7.

9. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que compreende uma bactéria do gênero *Escherichia*.

10. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que é da espécie *Escherichia coli*.

11. Método para produzir uma proteína recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) transformar uma célula hospedeira com a sequência de DNA sintético como definida na reivindicação 5 ou 6;

(b) cultivar dita célula para a produção da proteína recombinante;

(c) isolar dita proteína recombinante de dita célula ou do meio de cultura circundando dita célula.

12. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou uma combinação de duas ou mais proteínas recombinantes como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante farmacologicamente aceitável.

14. Composição de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizada pelo fato de que é para imunização contra rubéola.

15. Kit para diagnóstico de rubéola, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma proteína recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 12 a 14.

16. Kit de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um meio de detecção para detectar o complexo antígeno-anticorpo.

17. Kit de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um controle de reação.

18. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a

17, caracterizado pelo fato de que é desenvolvido para ensaios do tipo indireto.

19. Uso de pelo menos uma proteína recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou do kit como definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 18, caracterizado pelo fato de que é para diagnóstico de rubéola.

20. Método para diagnóstico de rubéola, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) prover uma ou mais proteínas recombinantes como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 12 a 14;

(b) contatar as ditas uma ou mais proteínas recombinantes ou a dita composição com a amostra biológica a ser testada por um tempo suficiente e sob condições suficientes para formação de complexos anticorpo/ antígeno; e

(c) detectar o complexo antígeno/ anticorpo formado na etapa (b), pela adição de um meio de detecção, capaz de gerar um sinal detectável na presença do referido complexo antígeno/ anticorpo.

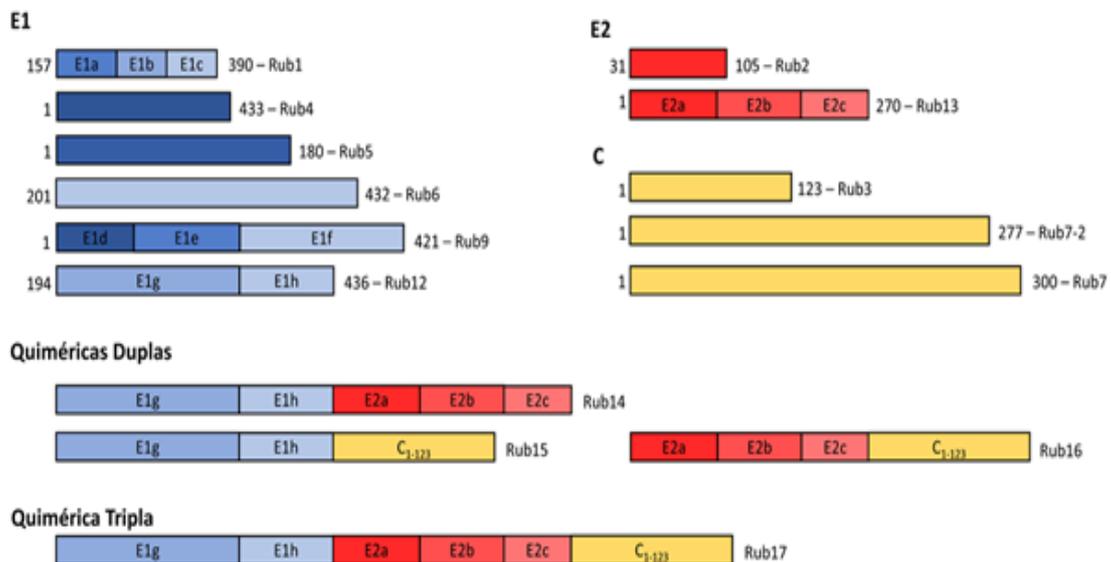


FIGURA 1

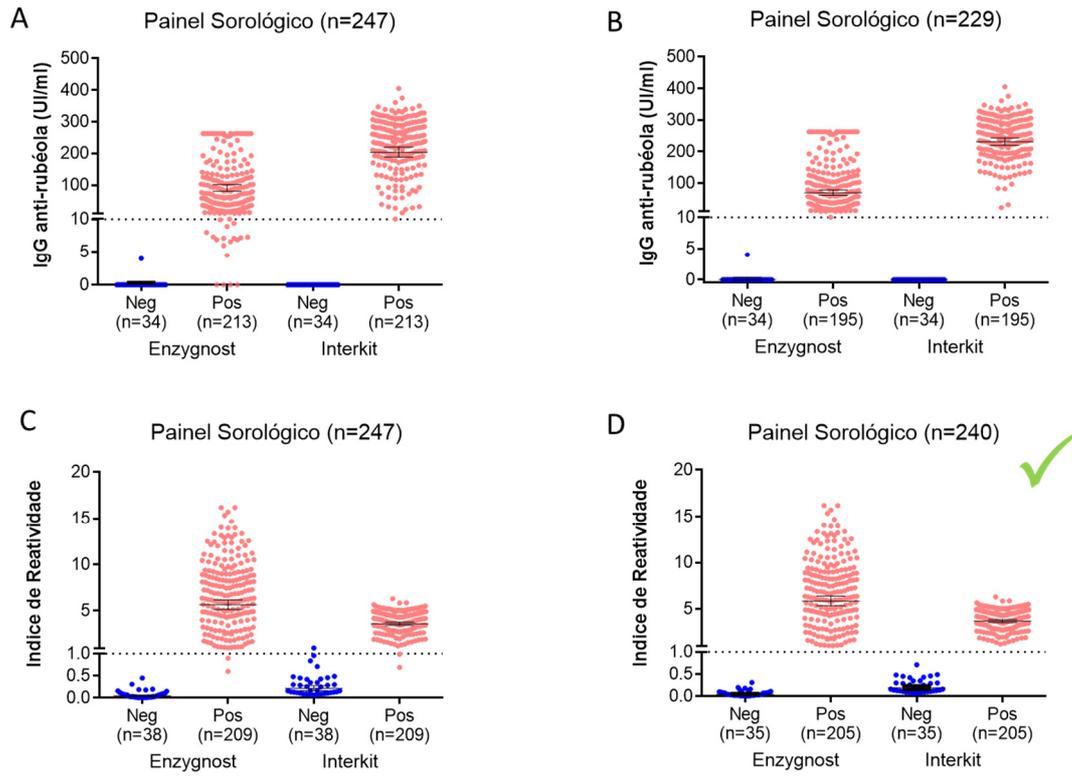


FIGURA 2

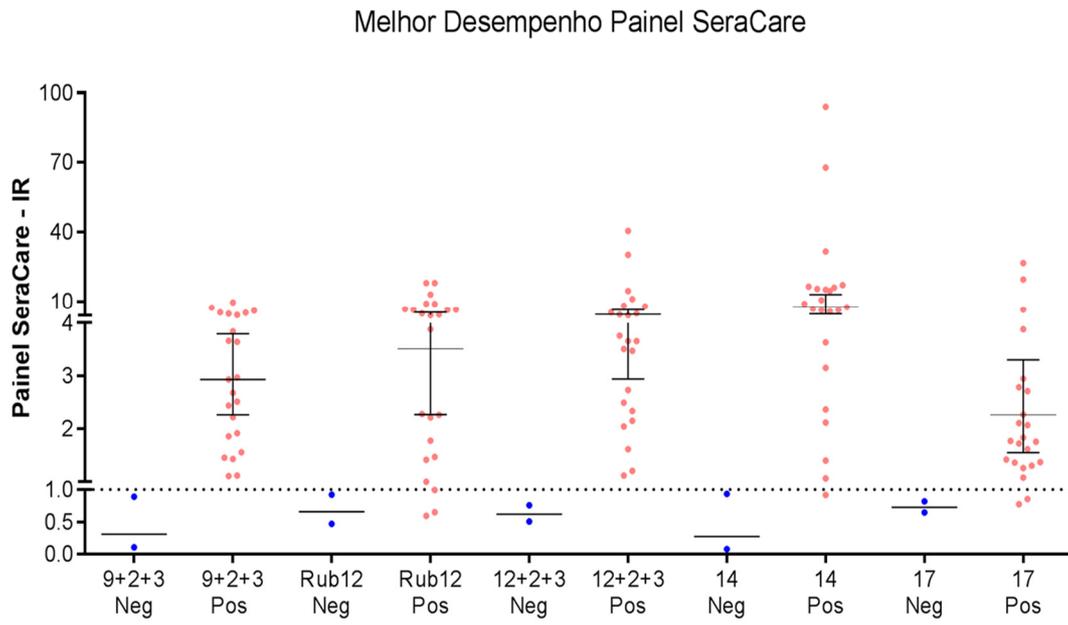


FIGURA 3

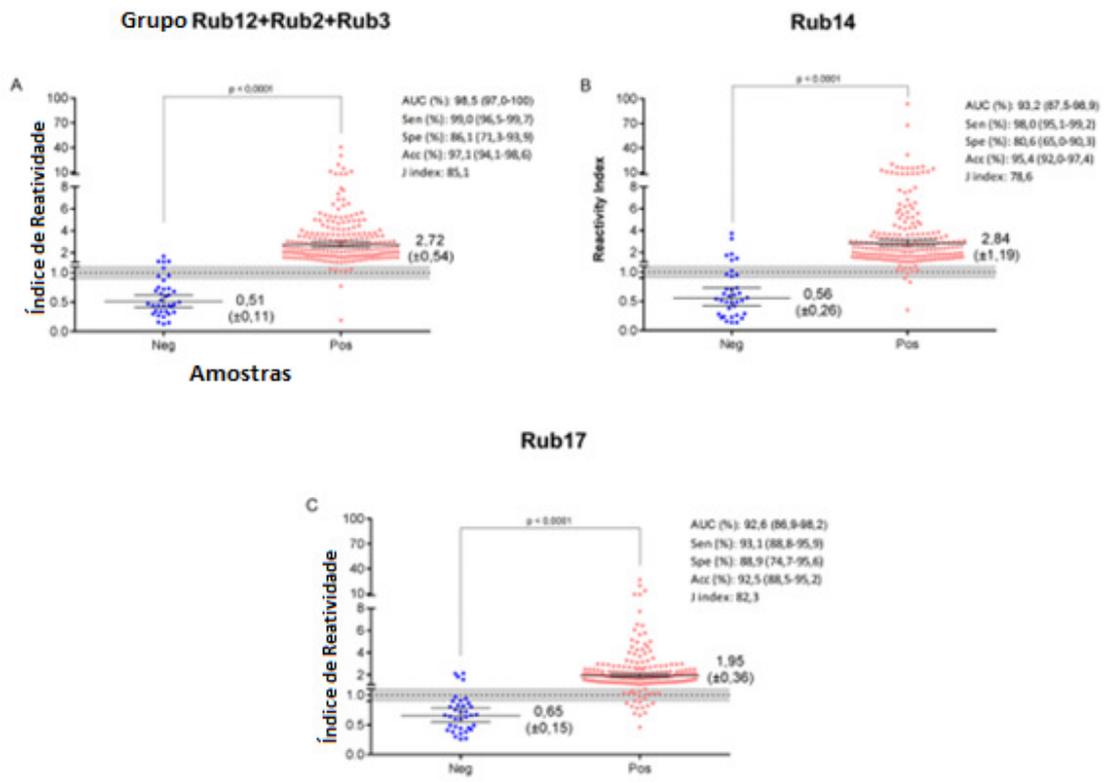


FIGURA 4

Imunização e infecção natural

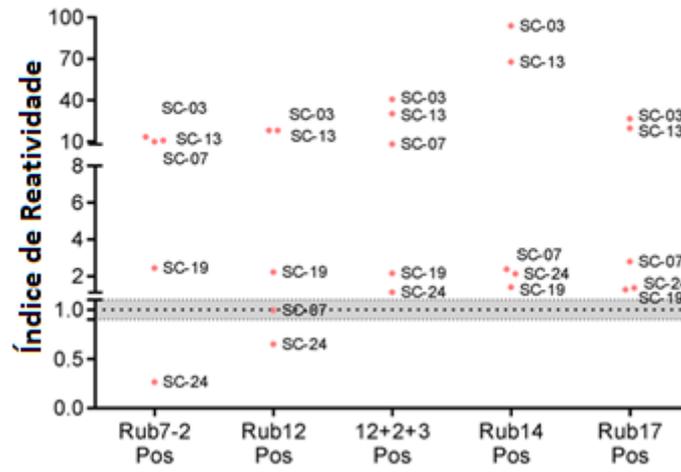


FIGURA 5

RESUMO

PROTEÍNA RECOMBINANTE, SEQUÊNCIA DE DNA SINTÉTICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO, KIT PARA DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA, USO DE PELO MENOS UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE E PARA DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA

A presente invenção refere-se a um método para diagnóstico de rubéola a partir de proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes desenvolvidas podem ser utilizadas isoladamente ou em conjunto, apresentam alta pureza e capacidade de discriminação do vírus da rubéola. A invenção também permite o desenvolvimento de uma vacina de segunda geração, da classe de subunidade. A invenção se refere, de forma geral, a proteína recombinante, sequência de DNA sintético, vetor de expressão, célula hospedeira, composição, kit para diagnóstico de rubéola, uso de pelo menos uma proteína recombinante, e, métodos para produzir uma proteína recombinante e para diagnóstico de rubéola.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 137217e011.txt
- Data de Geração do Código: 06/12/2018
- Hora de Geração do Código: 18:33:25
- Código de Controle:
 - Campo 1: 3581FF5B93E887F0
 - Campo 2: 9C501E9173A13380