

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

(11) (21) **PI 0504441-3 A**



(22) Data de Depósito: 20/10/2005
(43) Data de Publicação: **26/06/2007**
(RPI 1903)

(51) *Int. Cl.:*
G01N 33/53 (2007.01)
C12N 15/63 (2007.01)
C12N 15/70 (2007.01)
C07H 21/04 (2007.01)
C07K 14/01 (2007.01)
A61K 39/00 (2007.01)

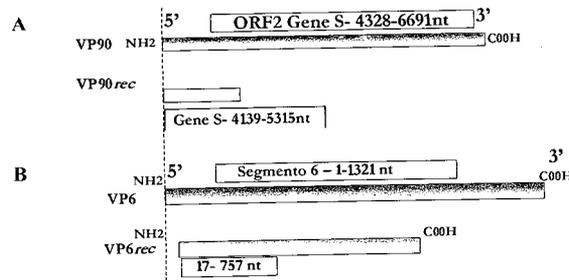
(54) Título: **VETORES DE EXPRESSÃO PLASMIDIAL CONTENDO REGIÕES ESPECÍFICAS PARA A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS OU EPÍTOPOS RECOMBINANTES DE ROTAVÍRUS E ASTROVÍRUS, PROCESSO DE PRODUÇÃO DOS INSUMOS PARA GERAÇÃO DE IMUNOBIOLOGICOS PARA DIAGNÓSTICO**

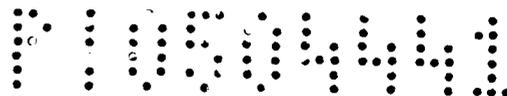
(57) Resumo: vetores de expressão plasmidial contendo regiões específicas para expressão de proteínas ou epítopos recombinantes de rotavírus e astrovírus. Processo de produção dos insumos para geração de imunobiológicos para diagnósticos. A presente invenção se refere à produção de proteínas virais específicas recombinantes, para aplicação na construção de um Kit de diagnóstico para detecção simultânea das duas principais virose gastroentéricas. Mais particularmente, as viroses detectadas pelo dito Kit são as causadas por rotavírus e astrovírus.

(71) Depositante(s): Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Ana Carolina Magalhães Andrade Góes, José Paulo Gagliardi Leite, Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza, Irene Trigueiros Araujo, Jean Claude D'Halluin, José Godinho da Silva Junior

(74) Procurador: Bhering, Almeida & Associados





“Vetores de expressão plasmidial contendo regiões específicas para a expressão de proteínas ou epítomos recombinantes de rotavírus e astrovírus, processo de produção dos insumos para geração de imunobiológicos para diagnóstico”.

CAMPO DA INVENÇÃO:

A presente invenção se refere à produção de proteínas virais específicas recombinantes para construção de kits para o diagnóstico das duas principais viroses gastroentéricas. Mais particularmente, as viroses são as causadas por rotavírus e astrovírus.

TÉCNICAS RELACIONADAS:

A gastroenterite viral é hoje um dos maiores problemas de saúde pública no mundo inteiro, devido aos altos índices de morbidade e mortalidade, especificamente, entre crianças menores de 5 anos. Apesar do índice de mortalidade ter diminuído, o índice de morbidade permaneceu estável durante as últimas 4 décadas. O número de patógenos causadores da gastroenterite viral vem aumentando nos últimos anos, devido às espécies virais distintas causadoras da gastroenterite e devido aos diversos outros agentes causadores da gastroenterite que estão sendo descobertos.

Apenas nas últimas décadas os vírus foram descritos como agentes envolvidos na etiologia das gastroenterites infantis, passando estes, junto com as bactérias e parasitas, a serem patógenos reconhecidamente envolvidos com doenças diarréicas de importância médica. Os principais agentes virais causadores da gastroenterite são os rotavírus, os calicivirus, os astrovírus e os adenovírus.

Estudos têm demonstrado, por exemplo, que a infecção causada por rotavírus é a mais comum causa de diarreia em crianças. O índice de pacientes hospitalizado por essa patologia é de cerca de 35%. O rotavírus vem sendo considerado, em todo o mundo, o principal responsável por diarreia em crianças menores de 5 anos.

A infecção causada pelo rotavírus varia de um quadro leve, com diarreia líquida e duração limitada a quadros graves com desidratação, febre e vômitos. Entretanto, uma parte das infecções causadas por este vírus pode ser assintomática.

Sabe-se que a doença por rotavírus é de distribuição universal, embora apresente características epidemiológicas distintas em áreas de clima temperado e nas áreas tropicais.

Os rotavírus eliminados em alta quantidade nas fezes de crianças infectadas, são transmitidos pela via fecal-oral, por água, alimentos ou objetos contaminados, por contato pessoa-a-pessoa, provavelmente, também por secreções respiratórias, mecanismos que permitem uma alta capacidade de disseminação dessa doença.

Estudos demonstram que a partir da descoberta dos astrovírus em 1975, estes têm sido considerados a terceira maior causa das gastroenterites virais, depois dos calicivírus. O percentual de detecção deste vírus pode variar. Os astrovírus podem ocorrer principalmente como resultado de infecções nasocomiais, e diferente dos rotavírus também ocorrem em jovens e adultos. Estudos têm demonstrado que um percentual de 2,4% a 17% é encontrado

entre indivíduos assintomáticos. Muitos casos de detecção de astrovírus em amostras clínicas aparecem associados a amostras rotavírus positivas.

5 A diarreia causada pelos astrovírus e de curta duração e de menor severidade. Outros sintomas como febre e vômito ocorrem menos frequentemente. Sintomas mais graves ocorrem em crianças ou adultos imunodeficientes.

10 As práticas higiênicas tradicionais e universais como lavagem de mãos, controle da qualidade da água e dos alimentos, destino adequado dos dejetos e do esgoto, imprescindíveis para a prevenção de quaisquer surtos de diarreia, não têm sido suficientes para redução da incidência da infecção causada principalmente pelos rotavírus. Evidências nesse sentido são as extensas
15 epidemias cíclicas da doença em países desenvolvidos, o que mostra que a perspectiva de prevenção dessa doença está no desenvolvimento de uma vacina que seja capaz de prevenir as infecções graves e, conseqüentemente as hospitalizações. Contudo, não existe ainda, no mundo, nenhuma vacina
20 disponível para isso.

No Brasil são comercializados kits para pesquisa de alguns agentes etiológicos da gastroenterite, particularmente o rotavírus. Entretanto, para a produção de insumos dos kits, é necessário o cultivo de partículas
25 virais em culturas celulares específicas, necessitando de mão de obra especializada e otimização de processos.

A título ilustrativo, no documento de patente US5.298.244, encontra-se descrito um processo para construção de um kit de detecção dos agentes etiológicos de

infecções causadas por alguns tipos de vírus. Mais particularmente, o rotavírus. O kit descrito no documento de patente US5.298.244 consiste na construção de partículas virais derivadas de proteínas do rotavírus. As partículas

5 construídas incluem uma proteína interna ao capsídeo, a VP6 em combinação com uma outra proteína ou ambas proteínas em combinação com outras proteínas do capsídeo, como por exemplo, as proteínas VP4 e VP7. Essa construção pode ainda ser utilizada como uma composição vacinal para o tratamento

10 e prevenção de infecções causadas pelo rotavírus. A técnica utilizada na patente US5.298.244 compreende na expressão eucariótica recombinante utilizando culturas celulares do tipo Autographa califórnia e sistema de expressão gênica em baculovírus o qual necessita de infra-estrutura específica

15 razoavelmente mais cara que aquela utilizada para expressão de proteínas recombinantes em sistema bacteriano do tipo E.coli, para produção e manutenção em média escala, o qual já é bem estabelecido e utilizado para a maioria das proteínas recombinantes de uso comercial. A patente

20 US5.298.244 não apresenta qualquer método purificativo a ser utilizado empregando as partículas completas formadas no sistema acima mencionado, e que seja capaz de gerar partículas purificadas para utilização na indução e formação de anticorpos específicos em modelos animais e

25 posterior utilização em diagnóstico.

As recentes descobertas dos diversos agentes etiológicos causadores das gastroenterites, apontam o astrovírus como um significativo patógeno. Com isso, existe uma necessidade no estado da arte para o desenvolvimento de

novos produtos para o diagnóstico dos principais agentes etiológicos causadores da gastroenterite.

SUMARIO DA INVENÇÃO:

A presente invenção se refere à produção de proteínas virais específicas recombinantes, para aplicação na construção de um kit de diagnóstico para detecção simultânea das duas principais viroses gastroentéricas. Mais particularmente, as viroses detectadas pelo dito kit são as causadas por rotavírus e astrovírus.

Assim, um primeiro objetivo da presente invenção é caracterizar por meio de metodologias de biologia molecular, tais como o seqüenciamento nucleotídico e análise pelo perfil de restrição, vetores plasmidiais de expressão de proteínas em sistema E.coli, a qual contém regiões específicas codificadoras de epítomos das proteínas VP6 de rotavírus e VP90 de astrovírus.

Um outro objetivo da presente invenção refere-se a avaliação do perfil protéico e a avaliação do rendimento obtido em um cultivo bacteriano em baixa escala de clones transformados com os vetores plasmidiais de expressão, por meio de metodologias bioquímicas tais como eletroforese em gel de SDS-PAGE.

Um outro objetivo da presente invenção refere-se a avaliação da antigenicidade dos epítomos expressos, por meio das metodologias imunológicas tais como Western-blot com anticorpos policlonais comerciais específicos e ensaio imunoenzimático.

Um outro objetivo da presente invenção refere-se a padronização de um método purificativo, no qual os epítomos

recombinantes das proteínas VP6 de rotavírus e VP90 de astrovírus purificados apresentem um alto grau de pureza, de modo a serem utilizadas como imunógenos em modelos animais para a produção de anticorpos policlonais.

5 Um outro objetivo da presente invenção refere-se a caracterização dos anticorpos policlonais anti-VP6 rotavírus e anti-VP90 astrovírus produzidos a partir de proteínas recombinantes específicas utilizando metodologias como Western-blot, ensaios imunoenzimáticos.

10 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS:

A FIGURA 1 mostra a representação esquemática da região codificante da ORF2 (A) e do segmento 6 (B) utilizados na clonagem.

15 A FIGURA 2 mostra o gel de eletroforese dos fragmentos amplificados a partir das seqüências nucleotídicas do segmento 6 de rotavírus e ORF 2 de astrovírus.

A FIGURA 3 mostra a estratégia de clonagem utilizada na construção dos plasmídios.

20 A Figura 4A mostra o perfil eletroforético dos plasmídios pOM187 (rotavírus) e pOM186 (astrovírus) antes da digestão com as enzimas de restrição.

25 A Figura 4B mostra o perfil eletroforético após a digestão com as enzimas de restrição PstI/NcoI para o plasmídio pOM187 (rotavírus) e HindIII/NheI para o plasmídio pOM186 (astrovírus).

A Figura 5 mostra o resultado da extração rápida dos prováveis plasmídios recombinantes.

A Figura 6A mostra o perfil de restrição com a enzima PstI/NcoI para o plasmídio pOM187 (rotavírus).

A Figura 6B mostra o perfil de restrição com a enzima HindIII/NheI para o plasmídio pOM186 (astrovírus).

A Figura 7A mostra a curva de indução da expressão das proteínas, com 0,5mM de IPTG, em células bacterianas cepa B121(DE) contendo o plasmídio controle.

A Figura 7B mostra a curva de indução da expressão das proteínas, com 1mM de IPTG, em células bacterianas cepa B121(DE) contendo o plasmídio controle.

A Figura 7C mostra a curva de indução da expressão das proteínas, com 2mM de IPTG, em células bacterianas cepa B121(DE) contendo o plasmídio controle.

A Figura 8A mostra a curva de indução da expressão das proteínas, com 0,5mM de IPTG, em células bacterianas cepa B121(DE) contendo o plasmídio pOM187 (rotavírus).

A Figura 8B mostra a curva de indução da expressão das proteínas, com 1mM de IPTG, em células bacterianas cepa B121(DE) contendo o plasmídio pOM187 (rotavírus).

A Figura 8C mostra a curva de indução da expressão das proteínas, com 2mM de IPTG, em células bacterianas cepa B121(DE) contendo o plasmídio pOM187 (rotavírus).

A Figura 9A mostra a curva de indução da expressão das proteínas, com 0,5mM de IPTG, em células bacterianas cepa B121(DE) contendo o plasmídio pOM186 (astrovírus).

A Figura 9B mostra a curva de indução da expressão das proteínas, com 1mM de IPTG, em células bacterianas cepa B121(DE) contendo o plasmídio pOM186 (astrovírus).

A Figura 9C mostra a curva de indução da expressão das proteínas, com 2mM de IPTG, em células bacterianas cepa B121(DE) contendo o plasmídio pOM186 (astrovírus).

A Figura 10 mostra o experimento de localização da proteína expressa feito com a cepa BL21(DE) contendo o plasmídio pOM187 (rotavírus).

5 A Figura 11 mostra o experimento de localização da proteína expressa feito com a cepa BL21(DE) contendo o plasmídio pOM186 (astrovírus).

A Figura 12A mostra a expressão da proteína VP6 de rotavírus através da indução de células bacterianas cepa Bl21(DE) contendo o plasmídio pOM187.

10 A Figura 12B mostra a expressão da proteína VP90 de astrovírus através da indução de células bacterianas cepa Bl21(DE) contendo o plasmídio pOM186.

15 A Figura 13A mostra o resultado da análise por Western-blot da proteína recombinante VP6 de rotavírus expressa pela cepa bacteriana Bl21(DE), contendo o plasmídio pOM187, revelada com anticorpo anti-histidina.

20 A Figura 13B mostra o resultado da análise por Western-blot da proteína recombinante VP6 de rotavírus expressa pela cepa bacteriana Bl21(DE), contendo o plasmídio pOM187, revelada com anticorpo anti-GST.

25 A Figura 13C mostra o resultado da análise por Western-blot da proteína recombinante VP6 de rotavírus expressa pela cepa bacteriana Bl21(DE), contendo o plasmídio pOM187, revelada com anticorpo anti-rotavírus produzido para o "kit EIARA".

A Figura 14A mostra o resultado da análise por Western-blot da proteína recombinante VP90 de astrovírus expressa pela cepa bacteriana Bl21(DE), contendo o plasmídio pOM186, revelada com o anticorpo anti-histidina.

A Figura 14B mostra o resultado da análise por Western-blot da proteína recombinante VP90 de astrovírus expressa pela cepa bacteriana BL21(DE), contendo o plasmídeo pOM186, revelada com o anticorpo anti-GST.

5 A Figura 15A mostra o resultado da análise por Western-blot do experimento de localização feito com a cepa BL21(DE) contendo o plasmídeo pOM187 (rotavírus) revelada com anticorpo anti-histidina.

10 A Figura 15B mostra o resultado da análise por Western-blot do experimento de localização feito com a cepa BL21(DE) contendo o plasmídeo pOM187 (rotavírus) revelada do experimento de localização feito com a cepa BL21(DE) contendo o plasmídeo pOM186 (astrovírus) revelada com anticorpos anti-histidina.

15 A Figura 16B mostra o resultado da análise por Western-blot do experimento de localização feito com a cepa BL21(DE) contendo o plasmídeo pOM186 (astrovírus) revelada com anticorpos anti-GST.

20 A Figura 17 mostra um esquema gráfico para o ensaio imunoenzimático IDEIA.

A Figura 18 mostra um esquema gráfico para o ensaio imunoenzimático EIARA.

A Figura 19 mostra a preparação dos corpos de inclusão.

25 A Figura 20 mostra os corpos de inclusão purificados.

A Figura 21 mostra as etapas da purificação da proteína recombinante VP6 por cromatografia de afinidade.

A Figura 22 mostra as etapas da purificação da proteína recombinante VP90 por cromatografia de afinidade.

A Figura 23 mostra as proteínas recombinantes VP6 e VP90 purificadas.

5 A Figura 24 mostra a quantificação das proteínas recombinantes VP6 e VP90 por eletroforese SDS-PAGE.

A Figura 25 mostra a avaliação da homogeneidade das proteínas recombinantes VP6 e VP90 purificadas.

10 A Figura 26 mostra o Western-blot da proteína viral VP6 revelada com soro dos coelhos inoculados com a proteína recombinante VP6 de rotavírus.

A Figura 27 mostra o Western-blot da proteína recombinante VP6 revelada com soro dos coelhos inoculados com esta mesma proteína.

15 A Figura 28 mostra o Western-blot da proteína recombinante VP90 revelada com soro dos coelhos inoculados com esta mesma proteína.

A Figura 29 mostra a análise por ELISA do soro policlonais anti-VP6 recombinante.

20 A Figura 30 mostra a avaliação da homogeneidade das imunoglobulinas purificadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO:

A presente invenção se refere à produção de proteínas virais específicas recombinantes, para aplicação na
25 construção de um kit de diagnóstico para detecção simultânea das duas principais viroses gastroentéricas. Mais particularmente, as viroses detectadas pelo dito kit são as causadas por rotavírus e astrovírus.

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

Exemplo 1: Obtenção dos vetores pOM187 para rotavírus e pOM186 para astrovírus.:

Moléculas moldes de RNA foram extraídas de amostras fecais positivas para as viroses causadas por rotavírus e
10 por astrovírus, por meio de um kit comercial adequado. As moléculas moldes de RNA foram utilizadas na obtenção dos cDNA.

Para a obtenção destes cDNA foram utilizados na presente invenção, uma seleção de seqüências de oligonucleotídios
15 iniciadores que estão agrupados na Tabela 1. Dito cDNA foi obtido por meio da reação de transcriptase reversa.

A Figura 1 mostra a localização das seqüências nucleotídicas clonadas no genoma dos vírus. A presente concretização possui como base o segmento 6 do RNA do
20 rotavírus Wa humano e ORF2 do RNA de astrovírus humano tipo 1.

Tabela 1- Oligonucleotídios iniciadores utilizados para síntese do cDNA, na reação de amplificação por RT-PCR

Iniciadores	Posição no genoma	Seqüência (5' - 3')
rotavírus positivo	17-42	CTTCgCCATggAggTTCTgTACTCAC
rotavírus negativo	730-757	gTCgCgCCATCggCCgAATTAATTACTC

astrovírus positivo	4139-4164	AATCACTCCATgggAAgCTCCTATgC
astrovírus negativo	5315-5340	gTgACAAgCTCggCCgCAgATACAgC

Inicialmente os fragmentos de cDNA obtidos por meio da reação de transcriptase reversa foram amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR) e recombinados em um vetor plasmidial adequado, como por exemplo, o vetor pOM.

5 Como resultado da recombinação destes fragmentos no vetor denominado pOM, obtiveram-se dois novos vetores, os quais foram denominados de pOM144- rotavírus, que contém um inserto de aproximadamente 776pb e pOM144-astrovírus, que contém um inserto de aproximadamente 1058pb.

10 O resultado da amplificação por meio da reação de PCR para os fragmentos de DNA é mostrado na Figura 2. Para a Figura 2, tem-se que: 1- Padrão de peso molecular 123pb (Sigma); 2- Produto de reação de PCR para o segmento 6 de rotavírus; 3- Produto de reação de PCR para a ORF 2 de
15. astrovírus.

A partir destes dois novos vetores, os fragmentos de DNA foram novamente amplificados por meio da reação de PCR. Os oligonucleotídios iniciadores utilizados nesta segunda reação foram:

20 Sense:

5' -AggAAAAAAGcggCCgCCACCATGGCGAAACgCgCCAgACCgTC;

antisense:

5' - AggAAAAAACggCCgATgTTTgCAGggCTAgC.

As bases sublinhadas representam os sítios de restrição das endonucleases NcoI e XmaIII, respectivamente.

Os produtos da reação de PCR foram purificados por meio do uso de um kit comercial. Na presente concretização se utilizou o kit NucleoSpin 2 em 1.

Ditos produtos da reação de PCR foram submetidos a reações de quebra enzimática por meio das endonucleases de restrição, NcoI e XmaIII e, em seguida, foram subclonados em um novo vetor pOM. Estes novos vetores foram denominados pOM32-rotavírus e pOM32-astrovírus.

Ditos vetores, pOM32-rotavírus e pOM32-astrovírus, os quais contém os sítios de restrição das endonucleases NcoI e MluI, foram novamente submetidos à reação de quebra enzimática por meio das endonucleases de restrição, NcoI e MluI.

Os fragmentos liberados por meio da reação de quebra enzimática, foram purificados e novamente subclonados em um vetor de expressão adequado, como por exemplo, o pGEX-NX-2T. Os novos vetores de expressão obtidos foram denominados de pOM187 para rotavírus e pOM186 para astrovírus. A Figura 3 mostra a estratégia de clonagem utilizada na presente concretização.

Exemplo 2: Transformação bacteriana e obtenção do DNA plasmidial com elevado grau de pureza

Uma cepa bacteriana de E. coli foi transformada, com os vetores de expressão pOM186 e pOM187, através da metodologia de eletroporação. Dita eletroporação foi realizada de modo a submeter as células bacterianas a uma

descarga elétrica de 2500 volts por 5 segundos. Na presente concretização se utilizou a cepa TOP10F' de E. coli.

Após o choque, a recuperação das células bacterianas foi realizada por meio da adição de aproximadamente 500µl de um meio de cultura adequado a reação. Na presente concretização utilizou-se o meio SOC líquido [2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 8,6mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 20mM de MgSO₄ e 20mM de glicose, pH 7,0]. Após a adição do meio SOC a reação, dita reação foi incubada a uma temperatura preferencial de 37°C sob agitação (aproximadamente 250rpm) por cerca de 1 hora.

Após o período de agitação realizou-se o plaqueamento da reação em duas placas de Petri contendo cerca de 20mL de um meio de cultura adequado, como por exemplo o meio LB-sólido [Luria Bertani:1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,0 (LB-líquido) contendo 1,5% (p/v) de ágar], o qual estava suplementado com ampicilina à uma concentração preferencial de 100µg/mL. Em uma primeira placa de Petri cerca de 20% da reação foi plaqueada em meio LB sólido. Em uma segunda placa de Petri cerca de 80% da reação foi plaqueada em meio LB sólido.

As duas placas de Petri foram mantidas por cerca de 16 horas a uma temperatura preferencial de 37°C. Após o período de incubação as duas placas de Petri foram observadas para se avaliar a formação de colônias bacterianas. Cerca de 10 colônias bacterianas, resistentes ao antibiótico ampicilina, foram retiradas das placas contendo 20% e 80% da transformação bacteriana (5 colônias de cada placa) e foram transferidas para tubos adequados,

os quais continham o meio de cultura LB líquido suplementado com um antibiótico, como por exemplo a ampicilina, na quantidade preferencial de 100µg/mL. Após a transferência, os tubos foram incubados por cerca de 16 horas sob agitação constante (aproximadamente 150rpm) a uma temperatura preferencial de 37°C.

O DNA plasmidial da cepa de E. coli cultivada foi extraído por meio de um kit comercial adequado, como por exemplo, o "Concert Rapid Plamid Purification Systems" (Invitrogen-USA), de acordo com as recomendações do fabricante, de modo a se obter este DNA plasmidial com elevado grau de pureza.

O DNA plasmidial purificado foi quantificado por meio da estimativa de quantidade aproximada, de acordo com a intensidade da banda de DNA específica submetida à técnica de eletroforese preferencialmente em gel de agarose 0,8% em uma solução tampão adequada, como por exemplo, a solução TBE 1X (89mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8,0). O gel de agarose foi corado com uma solução adequada. Na presente concretização, para coloração do gel se utilizou uma solução de brometo de etídio em uma concentração preferencial de 0,5µg/mL, para posterior visualização sob o equipamento de ultravioleta (U.V.).

Exemplo 3: Caracterização das construções plasmidiais pOM186 e pOM187

As construções plasmidiais finais foram caracterizadas por meio da reação de quebra enzimática com as endonucleases de restrição PstI/NcoI para os genes VP6 de

rotavírus (pOM187) e HindIII/NheI para os genes VP90 de astrovírus (pOM186).

As reações de digestão dos DNAs plasmidiais compreende os componentes e as etapas:

- 5 - aproximadamente 20 μ l de uma solução contendo 1 μ g/ μ l das construções plasmidiais pOM187 e pOM186 purificadas da cepa de E.coli TOP10F',
 - aproximadamente 1 μ l de cada uma das enzimas de restrição PstI/NcoI (contendo ambas 10U/ μ l) para os genes
10 VP6 de rotavírus,
 - aproximadamente 1 μ l de cada uma das enzimas de restrição HindIII/NheI (contendo ambas 10 U/ μ l) para os genes VP90 de astrovírus,
 - adição de aproximadamente 2,5 μ l de uma solução
15 tampão comercial recomendada para cada uma das enzimas, HindIII/NheI e PstI/NcoI, utilizadas, onde a dita solução tampão deve estar preferencialmente 10 vezes concentrada,
 - adição de água (q.s.p), de modo a se obter um volume final preferencial de 25 μ l,
20
 - incubação da reação por aproximadamente 2 horas a uma temperatura preferencial de 37°C, em equipamento específico como, por exemplo, banho-maria.

Após a reação de digestão, na qual ocorreu a clivagem enzimática, o produto da reação foi submetido à eletroforese em gel conforme descrito no exemplo 2. A
25 Figura 4A e a Figura 4B mostram o perfil eletroforético do DNA após a reação de digestão das construções plasmidiais pOM187 e pOM186 respectivamente. Para as ditas Figuras, tem-se que em A: 1- Padrão de peso molecular 100pb

(Invitrogen); 2- pOM187 não digerido; 3- pOM186 não digerido. Em B: 1- Padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen); 2- pOM187 digerido; 3- pOM186 digerido.

5 A reação de digestão dupla com as endonucleases de restrição apresenta um perfil eletroforético, no qual ambas as construções digeridas possuem duas bandas: uma primeira banda correspondente ao vetor e uma segunda banda correspondente ao inserto.

10 No perfil para a construção pOM 187 as bandas apresentam um tamanho aproximado de 5330pb para o vetor e um tamanho aproximado de 776pb para o inserto, enquanto que a construção pOM186 apresenta uma banda para o vetor com tamanho aproximado de 5507pb e uma outra banda com tamanho aproximado de 1058pb para o inserto.

15 Exemplo 4: Transformação bacteriana

Após a caracterização das construções plasmidiais pOM186 e pOM187, ditas construções foram utilizadas para uma nova transformação bacteriana. Para este experimento foram utilizadas células bacterianas competentes de uma
20 cepa de E. coli, as quais foram previamente preparadas por meio do método de CaCl₂. Na presente concretização utilizaram-se as células de E. coli da cepa B121DE.

As células bacterianas da cepa B121DE utilizadas foram inicialmente descongeladas em banho de gelo. Após o
25 descongelamento das ditas células bacterianas, cerca de 1µg do plasmídio purificado foi adicionado as ditas células bacterianas e a reação foi incubada para seu processamento em banho de gelo por aproximadamente 30 minutos.

Após os 30 minutos, a reação foi submetida a um choque térmico por aproximadamente 70 segundos a uma temperatura preferencial de 42°C e após este choque uma nova incubação para a finalização do processo de transformação foi realizada em banho de gelo por aproximadamente 10 minutos.

A recuperação das células bacterianas foi realizada por meio da adição de aproximadamente 300µl de um meio de cultura adequado a reação. Na presente concretização utilizou-se o meio LB líquido. Após a adição do meio LB a reação, esta foi incubada a uma temperatura preferencial de 37°C sob agitação (aproximadamente 250rpm) por cerca de 1 hora.

Após o período de agitação realizou-se o plaqueamento da reação. Dito plaqueamento ocorreu conforme descrito no Exemplo 2.

Em uma primeira placa de Petri cerca de 10% da reação foi plaqueada em meio LB sólido. Em uma segunda placa de Petri cerca de 90% da reação foi plaqueada em meio LB sólido. O crescimento bacteriano foi analisado conforme descrito no Exemplo 2.

Após o período para crescimento bacteriano foi realizada uma extração rápida do DNA plasmidial, de modo a avaliar a presença do plasmídio nos clones bacterianos resistentes ao antibiótico ampicilina.

Exemplo 5: Seleção e purificação do DNA plasmidial.

Neste procedimento de avaliação, cada um dos tubos, os quais havia ocorrido o crescimento das colônias bacterianas foi realizado uma extração do DNA plasmidial das ditas colônias, por meio da técnica rápida com fenol/cloroformio.

O material obtido na extração foi analisado por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose conforme descrito no exemplo 2. A Figura 5 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose para a extração rápida dos plasmídios.

- 5 Para a Figura 5, tem-se que as linhas de 1 a 17: Possíveis plasmídios recombinantes, a linha 18: Plasmídio controle sem inserto. Como pode ser observado os plasmídios das linhas 1, 2, 3, 6, 7, 12, 13 e 14 apresentam tamanho maior que o do controle (seta).
- 10 A seleção dos plasmídios ocorreu por meio da comparação do plasmídio com inserto com o plasmídio sem inserto. Os plasmídios maiores que o plasmídio sem inserto (controle) foram selecionados para as análises posteriores. Conforme mostrado na Figura 5, observa-se que para ambas as
- 15 construções plasmidiais, todas as colônias selecionadas tendem a apresentar plasmídio recombinante.

Após a seleção das colônias bacterianas, cada uma das culturas líquidas crescidas a partir dos clones bacterianos recombinantes selecionados por meio da extração rápida do

20 DNA plasmidial, foram purificadas por meio de um kit comercial adequado, como por exemplo, o "Concert Rapid Plamid Purification Systems" (Invitrogen-USA), de acordo com as recomendações do fabricante e analisadas por meio da reação de digestão com as endonucleases de restrição

25 semelhante a reação realizadas para caracterização das construções plasmidiais pOM187 e pOM186 purificadas da cepa TOP10F' de E. coli.

A Figura 6A e a Figura 6B mostram o plasmídio purificado não digerido e o perfil de restrição com as

enzimas PstI/NcoI para o plasmídio pOM187 (rotavírus) e com as enzimas HindIII/NheI para o plasmídio pOM186 (astrovírus) respectivamente, em comparação com o resultado obtido na digestão do plasmídio controle extraído da cepa TOP10F'. Para as ditas Figuras, tem-se que em A: 1- Padrão de peso molecular 1kB (Invitrogen); 2- pOM187 não digerido purificado da cepa TOP10F'; 3- pOM187 digerido purificado da cepa TOP10F'; 4- pOM187 não digerido purificado da cepa B121(DE); 5- pOM187 digerido purificado da cepa B121(DE). Em B: 1- Padrão de peso molecular 1kB (Invitrogen); 2- pOM186 não digerido purificado da cepa TOP10F'; 3- pOM186 digerido purificado da cepa TOP10F'; 4- pOM186 não digerido purificado da cepa B121(DE); 5- pOM186 digerido purificado da cepa B121(DE).

No perfil eletroforético para a construção pOM 187 as bandas apresentam um tamanho aproximado de 5330pb para o vetor e um tamanho aproximado de 776pb para o inserto, enquanto que a construção pOM186 apresenta uma banda para o vetor com tamanho aproximado de 5507pb e uma outra banda com tamanho aproximado de 1058pb para o inserto. A comparação realizada demonstra que o mesmo perfil eletroforético das bandas correspondentes ao inserto e vetor foi observado.

Exemplo 6: Seqüenciamento nucleotídico automático dos vetores plasmidiais.

Uma vez purificados os clones recóbinantes, foi realizado o seqüenciamento nucleotídico automático dos vetores plasmidiais.

Para o seqüenciamento nucleotídico dos vetores plasmídias foi utilizado um Kit comercial, para a preparação das reações, no qual cada didesoxinucleotídeo é marcado com uma molécula fluorescente, conforme instruções do fabricante. Na presente concretização o kit comercial utilizado foi o "ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" versão 3.1. O seqüenciamento e a leitura automática das seqüências foram realizados em um equipamento adequados, o qual gera e interpreta eletroferogramas para análise, como por exemplo, ABI PRISM Genetic Analyser.

Para visualização e impressão dos eletroferogramas obtidos no seqüenciamento automático foi utilizado um programa adequado, como por exemplo, o Chromas.

Para uma análise, as seqüências obtidas nos eletroferogramas foram comparadas com seqüências padrões das regiões do segmento 6 do RNA do rotavírus Wa humano e ORF2 do RNA de astrovírus humano tipo 1. Ditas seqüências padrões estão disponíveis no Banco de Genes do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Dita comparação foi realizada por meio do alinhamento das seqüências em programa adequado, como por exemplo, o programa Blast do NCBI. A comparação realizada demonstra que as seqüências clonadas não apresentam alterações nucleotídicas e confirmam que o material de clonagem realmente corresponde às regiões alvo da invenção, a qual corresponde a posição nucleotídica de 23 a 742(VP6) e posição nucleotídica de 4145 a 5325(VP90).

Exemplo 7: Construção da curva de indução

Para a padronização de parâmetros importantes necessários a expressão das proteínas recombinantes foi realizada a construção de uma curva de indução. Para dita construção, as culturas bacterianas da cepa BL21(DE), as
5 quais contém os vetores de expressão pOM187, pOM186 e o plasmídio controle (sem inserto) foram transferidas para tubos adequados, por meio da técnica de repique. Ditos tubos continham cerca de 5mL de um meio de cultura, como por exemplo, o meio LB líquido suplementado com ampicilina
10 a aproximadamente 50µg/mL. Ditos tubos foram incubados a uma temperatura preferencial de 37°C por aproximadamente 16 horas sob agitação constante (aproximadamente 150rpm).

Após o período de incubação, foram realizadas pelo menos três transferências, por meio da técnica de repique,
15 de cada uma das culturas bacterianas que continham um dos vetores de expressão. Aproximadamente 100µl de cada cultura bacteriana foi transferida para um novo tubo preferencialmente de 50mL que continha um volume final de aproximadamente 10mL de meio de cultura LB líquido
20 suplementado com ampicilina a aproximadamente 50µg/mL.

As novas culturas foram crescidas sob agitação vigorosa (aproximadamente 250rpm) a uma temperatura preferencial de 37°C até que a leitura das ditas culturas em espectrofotômetro atingisse uma D.O. mínima de 0,4. Na
25 presente concretização a leitura em espectrofotômetro ocorreu em um comprimento de onda de 550nm.

Uma alíquota de aproximadamente 1mL de cada uma das culturas bacterianas foi retirada e identificada como a alíquota de tempo zero(T0) ou cultura controle não

induzida. Ao restante das culturas bacterianas foi adicionado uma substância indutora, como por exemplo, o indutor isopropil-b-D-tiogalactopiranosideo (IPTG).

As concentrações de IPTG foram diferentes para cada uma das culturas bacterianas restantes. Na presente concretização as concentrações de IPTG utilizadas foram aproximadamente 0,5mM, 1mM e 2mM. Após a adição de IPTG as culturas bacterianas foram novamente incubadas sob agitação vigorosa (aproximadamente 250rpm) por um tempo máximo de 5 horas.

Durante o período de incubação, a cada hora passada após o tempo zero, uma nova alíquota de aproximadamente 1mL era retirada e identificada, conforme descrito na tabela 2. Tabela 2 - Esquema da coleta das alíquotas das culturas bacterianas recombinantes induzidas durante um período de 5 horas

	Descrição das alíquotas	Concentração de IPTG		
		0,5mM	1mM	2mM
Tempo	T0	Zero horas	Zero horas	Zero horas
	T1	1 hora	1 hora	1 hora
	T2	2 horas	2 horas	2 horas
	T3	3 horas	3 horas	3 horas
	T4	4 horas	4 horas	4 horas
	T5	5 horas	5 horas	5 horas

Todas as alíquotas retiradas foram avaliadas quanto a D.O. em espectrofotômetro em um comprimento de onda

preferencial de 550nm. Para leituras de D.O. acima de 1,0, as culturas foram diluídas de 2 a 10 vezes. O grau de diluição da amostra foi dependente do crescimento bacteriano obtido. Após a diluição foi realizada uma nova
5 avaliação da D.O. em espectrofotômetro em um comprimento de onda preferencial de 550nm.

Todas as alíquotas retiradas das culturas bacterianas foram centrifugadas preferencialmente a 8.500xg por cerca de .5 minutos. Os sobrenadantes das culturas bacterianas
10 após centrifugação foram descartados. O precipitado obtido foi congelado para posterior análise por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

O procedimento para análise dos produtos ocorreu de modo que todos os precipitados anteriormente congelados
15 foram ressuspensos em uma solução tampão de amostra 2X [50mM Tris-HCl pH6,8, 100mM de DTT, 2% de SDS, 0,1% de azul de bromofenol, 10% de glicerol].

O volume da solução de tampão de amostra, na qual os precipitados foram ressuspensos, variou conforme a D.O. de
20 cada alíquota obtida durante o experimento de curva de indução. Na presente concretização a quantidade de tampão de amostra adicionado seguiu a relação de que para cada 0,1 de D.O. foram adicionados cerca de 10 μ l de solução tampão de amostra 2X.

25 Após os precipitados terem sido ressuspensos as amostras foram aquecidas a uma temperatura variando de 95 à 105°C por cerca de 5 minutos. Após o aquecimento das amostras, ditas amostras foram centrifugadas a 8.500xg por aproximadamente 30 segundos.

Exemplo 8: Análise por meio da técnica de SDS-page

As amostras preparadas conforme descrito no exemplo 7 foram analisadas por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante do tipo SDS-PAGE. Dito gel foi preparado a uma concentração de 10% para a fase separadora do gel e então submetido à corrida eletroforética por cerca de 100 volts, por aproximadamente 2 horas em tampão adequado como, por exemplo, o tampão de corrida 1X [50mM de Tris pH8,3, 384mM de glicina, 0,1% de SDS].

As Figuras 7A, 7B, 7C, 8A, 8B, 8C, 9A, 9B, 9C e as tabelas 3, 4 e 5 mostram os resultados obtidos na curva de tempo e concentração de indutor realizada com a cepa B121(DE) transformada com as construções plasmidiais pOM187, pOM186 e plasmídeo controle (sem inserto). De acordo com as figuras observar-se que não houve diferença significativa entre os tempos de indução e as concentrações de indutor utilizadas.

Desta forma, houve uma padronização, na qual os experimentos de indução foram realizados utilizando 1mM de IPTG e que o tempo de indução seria de aproximadamente 4 horas. Para as ditas Figuras tem-se que em A- Curva de indução feita com 0,5mM de IPTG; B- Curva de indução feita com 1mM de IPTG; C- Curva de indução feita com 2mM de IPTG:

- 1- Padrão de peso molecular BenchMark (Invitrogen);
- 2- Cultura bacteriana não induzida;
- 3- Cultura bacteriana induzida por 1 hora;
- 4- Cultura bacteriana induzida por 2 horas;
- 5- Cultura bacteriana induzida por 3 horas;
- 6-

Cultura bacteriana induzida por 4 horas; 7- Cultura bacteriana induzida por 5 horas.

Tabela 3 - Avaliação da D.O. em espectrofotômetro em um comprimento de onda preferencial de 550nm das alíquotas da cultura bacteriana recombinante transformada com plasmídeo controle retiradas durante a construção da curva de indução.

Tempo	Descrição das alíquotas	Concentração de IPTG		
		0,5mM	1mM	2mM
T0		0,781	0,802	0,815
T1		1,832	1,906	1,958
T2		2,84	3,235	3,295
T3		4,96	5,115	5,195
T4		5,67	5,82	5,75
T5		6,77	6,59	6,44

Tabela 4 - Avaliação da D.O. em espectrofotômetro em um comprimento de onda preferencial de 550nm das alíquotas da cultura bacteriana recombinante transformada com plasmídeo POM187 retiradas durante a construção da curva de indução.

Tempo	Descrição das alíquotas	Concentração de IPTG		
		0,5mM	1mM	2mM
T0		0,444	0,458	0,483
T1		0,844	0,828	0,848
T2		1,145	1,1	1,12
T3		1,225	1,23	1,27
T4		1,25	1,26	1,275
T5		1,285	1,38	1,35

Tabela 5 - Avaliação quanto a D.O. em espectrofotômetro em um comprimento de onda preferencial de 550nm das alíquotas da cultura bacteriana recombinante transformada com pOM186 retiradas durante a construção da curva de indução.

5

Tempo	Descrição das alíquotas	Concentração de IPTG		
		0,5mM	1mM	2mM
T0		0,735	0,749	0,761
T1		1,444	1,464	1,448
T2		1,83	1,815	1,855
T3		2,06	2,0	2,08
T4		2,02	2,035	2,085
T5		2,425	2,43	2,525

Exemplo 9: Experimento de localização de expressão da proteína recombinante.

Após a construção da curva de indução, realizou-se o experimento de localização, o qual visa identificar o local de expressão de cada proteína recombinante. Para dito experimento, inicialmente as culturas bacterianas da cepa BL21(DE), as quais contém os plasmídios de expressão foram submetidas a uma reação de indução.

O procedimento da dita reação compreendeu: uma cultura, na qual cerca de 1mL do pré inóculo crescido foi adicionado a cerca de 100mL de meio LB líquido suplementado com 50µg/mL de ampicilina. Dita cultura foi mantida sob agitação vigorosa nas mesmas condições descritas no exemplo 7 até que a leitura em espectrofotômetro atingisse uma D.O.

mínima de 0,4, conforme descrito no exemplo 7. O volume de cultura utilizado para este experimento foi de 50mL.

Após o procedimento de indução, inicialmente realizou-se a separação das proteínas exportadas, que são aquelas liberadas para o meio de cultura onde as bactérias foram crescidas. Para dito procedimento, a cultura de células bacteriana foi centrifugada por aproximadamente 15 minutos a cerca de 6.500xg.

Após a centrifugação aproximadamente 1mL do sobrenadante foi transferido preferencialmente para um tubo de 1,5mL, no qual foi adicionado 100µl de ácido tricloriacético (TCA) 100%. Esta dita solução foi agitada vigorosamente, incubada em banho de gelo por cerca de 15 minutos e posteriormente centrifugado a aproximadamente 14.000xg por cerca de 15 minutos. Após esta centrifugação o precipitado obtido foi lavado com cerca de 100µl de acetona e rapidamente centrifugado a aproximadamente 14.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco foi ressuspenso em cerca de 100µl de uma solução de PBS (137mM de NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ e 1.8mM KH₂PO₄) 1X pH 7.4 e cerca de 100µl de uma solução tampão de amostra 2X.

Posteriormente, a solução protéica foi aquecida a uma temperatura em cerca de 95-105°C por aproximadamente 5 minutos. Após o aquecimento dita solução foi congelada para posterior análise por meio da técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE, conforme descrita no Exemplo 8.

Para a separação das proteínas periplasmáticas, o precipitado bacteriano obtido após a centrifugação foi ressuspenso em aproximadamente 30 mL de uma solução tampão

adequada. Na presente concretização, utilizou-se uma solução tampão Tris-HCl 30mM pH 8.0, a qual continha cerca de 20% de sacarose e cerca de 1mM de EDTA.

Dita suspensão celular foi mantida sob agitação mecânica constante por aproximadamente 10 minutos a uma temperatura preferencial de 23-26°C.

Após o período de agitação da suspensão celular, dita suspensão foi centrifugada a cerca de 10.000xg por aproximadamente 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi ressuspense em uma solução adequada, como por exemplo, uma solução de MgSO₄ 5mM gelada. A suspensão celular foi agitada mecanicamente por cerca de 10 minutos em gelo, de modo a permitir que as proteínas periplasmáticas fossem transferidas para a solução tampão. Após o período de agitação a suspensão celular foi novamente centrifugada a 10.000xg por cerca de 10 minutos. Após a centrifugação, cerca de 1mL do sobrenadante foi transferido para um tubo preferencialmente de 1,5mL e, a seguir, foi adicionado a este tubo cerca de 100µl ácido tricloriacético (TCA) 100%. Esta dita solução foi agitada vigorosamente, incubada em banho de gelo por 15 minutos e posteriormente centrifugada a 14.000xg por 15 minutos.

Após esta centrifugação o precipitado obtido foi lavado com cerca de 100µl de acetona e rapidamente centrifugado a 14.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco foi ressuspense em cerca de 100µl de uma solução de PBS 1X e cerca de 100µl de uma solução tampão de amostra 2X. Posteriormente, a solução protéica foi

aquecida a uma temperatura em cerca de 95-105°C por aproximadamente 5 minutos. Após o aquecimento da dita solução, esta foi congelada para posterior análise por meio da técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE, conforme descrita no Exemplo 8.

Para a preparação das proteínas citoplasmática, o precipitado bacteriano obtido após a última centrifugação da etapa descrita acima, foi ressuspenso em aproximadamente 4mL de uma solução tampão adequada, como por exemplo, a solução tampão Tris-HCl 20mM pH 7.5 gelada para posterior lise das células bacterianas.

A liberação do material protéico citoplasmático foi realizada após a lise bacteriana com lisozima. O procedimento de lise celular ocorreu por meio da adição de lisozima a uma concentração preferencial de 100µg/mL de cultura bacteriana, a uma temperatura preferencial de 30°C por cerca de 15 minutos. Após a adição das lisozimas, para que o procedimento de lise celular fosse completo, foi realizada a fragmentação celular, por meio do ultra-som.

A suspensão celular em gelo foi levada ao ultra-som e o processo de sonicação foi preferencialmente realizado em 3 ciclos de 2 minutos com pulso constante. O intervalo entre cada um dos ciclos foi de aproximadamente 10 minutos.

Para a separação da fração solúvel da fração insolúvel, cerca de 1,5mL da amostra de células bacterianas lisadas foi centrifugada a cerca de 14.000xg por aproximadamente 10 minutos. O sobrenadante da amostra foi transferido para um tubo de 1,5mL. Aproximadamente 100µl deste sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5mL, o

qual continha cerca de 100µl de uma solução tampão de amostra 2X. Após a adição do sobrenadante a solução tampão, esta dita amostra foi aquecida a uma temperatura em cerca de 95-105°C por aproximadamente 5 minutos e posteriormente
5 congelada para análise por meio da técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE conforme descrito no exemplo 8.

O precipitado formado na centrifugação das células bacterianas lisadas corresponde à fração insolúvel da amostra, denominada de corpos de inclusão. Dito precipitado
10 foi lavado pelo menos duas vezes, com uma solução tampão adequada, como por exemplo, a solução Tris-HCl 20mM pH 7.5, onde ao final de cada lavagem a amostra foi novamente centrifugada. Em seguida, o precipitado obtido após a última centrifugação feita no procedimento de lavagem foi
15 ressuspenso em aproximadamente 1,5mL de uma solução adequada, como por exemplo, uma solução de SDS 1%.

Após o precipitado ter sido ressuspenso em solução de SDS, cerca de 100µl desta suspensão foi transferida para um tubo, onde a esta dita suspensão foi adicionado cerca de
20 100µl de uma solução tampão de amostra 2X. Posteriormente, dita suspensão foi aquecida a uma temperatura em cerca de 95-105°C por aproximadamente 5 minutos. Após o aquecimento da solução protéica, dita solução protéica foi congelada para posterior análise por meio da técnica de eletroforese
25 em gel do tipo SDS-PAGE conforme descrito no exemplo 8.

As Figuras 10 e 11 mostram que as proteínas recombinantes estão em corpos de inclusões insolúveis no citoplasma da célula bacterianas. Para as Figuras 10 e 11, tem-se que 1 - Padrão pré-corado de baixo peso molecular

(GE Healthcare); 2 - Cultura bacteriana induzida por 4 horas; 3- Fração periplasmática; 4- Fração citoplasmática; 5 - Corpos de inclusão.

Exemplo 10: Expressão das proteínas recombinantes

5 Para a obtenção de proteínas recombinantes em baixa escala foi realizado o seguinte procedimento:

Dito procedimento consistiu inicialmente da preparação de um repique bacteriano denominado de pré-inóculo, o qual consistiu em cerca de 5mL de um meio de cultura adequado, como por exemplo o meio LB líquido, acrescido de 50µg/mL de antibiótico ampicilina o qual foi inoculado em tubos separados com cerca de 20µL de cada uma das culturas bacterianas, as quais continham os plasmídios recombinantes, pOM187 ou pOM186. Ditos tubos foram incubados a uma temperatura preferencial de 37°C por cerca de 16 horas sob agitação constante (aproximadamente 150rpm).

Após a etapa de incubação, para compor uma nova cultura bacteriana de modo a conter os plasmídios recombinantes, pOM187 ou pOM186, cerca de 1mL do pré-inóculo crescido foi adicionado à cerca de 100mL de meio LB líquido suplementado.

Dita cultura, foi mantida sob agitação vigorosa (aproximadamente 250rpm) a uma temperatura preferencial de 37°C e submetida a leitura em espectrofotômetro conforme descrito no exemplo 7.

Quando a D.O. desejada foi atingida, uma alíquota de cerca de 1mL foi retirada da cultura. Dita alíquota foi centrifugada por cerca de 15 minutos a aproximadamente

8.500xg e foi identificada como cultura não induzida ou cultura controle. Os sobrenadantes das culturas bacterianas após centrifugação foram descartados. Os precipitados obtidos foram congelados para posterior análise por meio da
5 técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE conforme descrito no exemplo 8.

Ao restante da cultura crescida foi adicionada cerca de 1mM de IPTG. Dita cultura foi mantida sob agitação vigorosa (aproximadamente 250rpm) por cerca de 4 horas.

10 Ao final do período de indução, uma nova alíquota de cerca de 1mL foi retirada da cultura. Dita alíquota foi avaliada conforme descrito no exemplo 7. Para leituras acima de 1,0, a cultura foi diluída de 2 a 10 vezes. O grau de diluição da amostra foi dependente do crescimento
15 bacteriano obtido. Após a diluição foi realizada uma nova avaliação da D.O. em espectrofotômetro em um comprimento de onda preferencial de 550nm.

Após a leitura, dita alíquota foi centrifugada por cerca de 15 minutos a aproximadamente 8.500xg. Os
20 sobrenadantes das culturas bacterianas após centrifugação foram descartados. O precipitado obtido foi congelado para posterior análise por meio da técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE, conforme descrito no exemplo 8. Esta dita alíquota foi identificada como cultura induzida.

25 O volume restante da cultura induzida foi centrifugado por cerca de 15 minutos a aproximadamente 6.500xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi congelado para posterior processamento.

Os precipitados anteriormente congelados foram ressuspensos em uma solução tampão de amostra 2X. O volume da solução de tampão de amostra, na qual os precipitados foram ressuspensos, variou conforme a D.O. de cada alíquota
5 obtida durante o experimento de indução. Para cada 0,1 de D.O. foram adicionados cerca de 10µl de solução tampão de amostra 2X.

Após os precipitados terem sido ressuspensos, as amostras foram aquecidas a uma temperatura em cerca de 95 à
10 105°C por aproximadamente 5 minutos. Após o aquecimento das amostras, ditas amostras foram centrifugadas a 8.500xg por aproximadamente 30 segundos.

As amostras preparadas conforme descrito acima foram analisadas por meio da técnica de eletroforese em gel do
15 tipo SDS-PAGE, conforme descrita no exemplo 8.

A Figura 12A e a Figura 12B mostram o resultado da indução, obtido para as proteínas recombinantes VP6 e VP90 respectivamente. Para a dita Figura, tem-se que 1- Padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad); 2- Cultura bacteriana não induzida; 3- Cultura bacteriana induzida por
20 4 horas.

Exemplo 11: Análise da antigenicidade das proteínas recombinantes expressas

Para a análise da antigenicidade das proteínas
25 recombinantes expressas, foi realizada uma análise por meio da técnica de Western-blot. As proteínas após terem sido submetidas à técnica de eletroforese, foram transferidas para membranas de nitrocelulose por meio do uso de um sistema Transblot. Após a transferência das proteínas para

as membranas de nitrocelulose, ditas membranas foram bloqueadas por cerca de 16 horas a uma temperatura aproximada de 4°C com uma solução de bloqueio adequada. Na presente concretização utilizou-se como solução de bloqueio
5 uma solução de PBS 1X, a qual continha cerca de 0,05% (v/v) Tween 20, 5% (p/v) leite Molico.

A seguir, cada uma das membranas de nitrocelulose foi incubada separadamente com um dos seguintes anticorpos:
~~anti-histidina, o qual foi produzido em camundongo,~~
10 anticorpo anti-GST, o qual foi produzido em cabra e anticorpo policlonal específico (anti-rotavírus produzido em cabra para o kit EIARA, BioManguinhos). Ditos anticorpos foram diluídos segundo as recomendações do fabricante em solução tampão de bloqueio.

15 As membranas de nitrocelulose foram incubadas com estas soluções contendo os anticorpos por cerca de duas horas com agitação suave a uma temperatura aproximada de 25°C.

20 As membranas de nitrocelulose foram lavadas pelo menos três vezes com uma solução de PBS 1X, a qual continha cerca de 0,05% de Tween 20. Cada uma das lavagens foi feita de modo que as ditas membranas fossem incubadas por cerca de 10 minutos com a dita solução de lavagem.

25 Após a realização de pelo menos três lavagens consecutivas, foi adicionado as ditas membranas de nitrocelulose, um anticorpo anti-camundongo ou um anticorpo anti-cabra conjugados a fosfatase alcalina e diluídos segundo as recomendações do fabricante em solução tampão de bloqueio.

As ditas membranas foram incubadas com as ditas soluções, as quais continham os anticorpos por pelo menos 1 hora a uma temperatura de aproximadamente 23 - 25°C sob agitação suave.

5 Após o período de incubação, as membranas foram novamente lavadas pelo menos três vezes com uma solução de PBS 1X, a qual continha cerca de 0,05% de Tween 20. Cada uma das lavagens foi feita incubando as membranas de nitrocelulose por cerca de 10 minutos com a dita solução de
10 lavagem.

Após a lavagem com a solução de PBS 1X, as membranas de nitrocelulose foram lavadas pelo menos uma vez com uma solução tampão 100mM Tris-HCl pH 9, a qual continha cerca de 150mM NaCl e 1mM CaCl₂. A revelação das membranas de
15 nitrocelulose ocorreu por meio da adição do substrato NBT/BCIP (Promega) a dita solução tampão descrita acima, de acordo com as recomendações do fabricante.

Todos os Western-blot realizados para avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes expressas pela
20 cepa bacteriana B121(DE) forneceram resultados positivos havendo reconhecimento pelos anticorpos anti-GST, anti-histidina e anticorpo específico anti-rotavírus.

As Figuras 13A, 13B e 13C mostram os resultados das avaliações da antigenicidade da proteína recombinante VP6
25 de rotavírus expressa pela cepa bacteriana B121(DE) revelada com anticorpo anti-histidina, anticorpo anti-GST e anticorpo anti-rotavírus respectivamente.

As Figuras 14A e 14B mostram o reconhecimento da proteína recombinante VP90 de astrovírus expressa pela cepa

bacteriana BL21(DE) revelada com o anticorpo anti-histidina e com anticorpo anti-GST respectivamente.

Para as Figuras 13A, 13B,13C, 14A e 14B,tem-se que em 1. Corpos de inclusão isolados; 2. Extratos bacterianos induzidos; 3. Extrato bacteriano não induzido; 4. Padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad).

As Figuras 15A e 15B mostram o experimento de localização realizado com a cepa BL21(DE), a qual contém o plasmídio pOM187 (rotavírus) revelada com anticorpo anti-histidina e com o anticorpo anti-GST respectivamente.

As Figuras 16A e 16B mostram o experimento de localização realizado com a cepa BL21(DE), a qual contém o plasmídio pOM186 (astrovírus) revelada com anticorpo anti-histidina e com o anticorpo anti-GST respectivamente.

Para as Figuras 15A, 15B, 16A e 16B tem-se que 1- Corpos de inclusão; 2- Fração citoplasmática; 3- Fração periplasmática; 4- Cultura bacteriana induzida; 5- Cultura bacteriana não induzida; 6- Cultura bacteriana sem plasmídio induzida; 7- Padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad).

Um outro método utilizado na avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes, foi realizado por meio do ensaio imunoenzimático tipo ELISA.

Os ensaios imunoenzimáticos, foram realizados por meio de "kits" comerciais. Na presente concretização para avaliação da proteína recombinantes VP90 de astrovírus utilizou-se o kit IDEIA (DAKO, Inc). Dita proteína foi reconhecida conforme mostra a Figura 17.

Para avaliação da proteína recombinante VP6 de rotavírus utilizou-se o kit EIARA. Para esta proteína recombinante VP6 de rotavírus foram realizados inúmeros ensaios com diferentes concentrações da proteína, mas a
5 mesma não foi reconhecida pelo "kit" EIARA, conforme mostra a Figura 18.

Exemplo 12: Obtenção dos corpos de inclusão

Para a obtenção dos corpos de inclusão, foi utilizado um volume de aproximadamente 100mL de cultura bacteriana
10 induzida. A dita cultura bacteriana induzida foi centrifugada a 6.500xg por cerca de 20 minutos a uma temperatura preferencial de 4°C para obtenção do precipitado celular. Dito precipitado celular foi ressuspensão em uma solução tampão Tris-HCl 20mM pH 8.0 e
15 posteriormente submetido ao ultra-som, sob um processo de sonicação no gelo conforme descrito no exemplo 9. O produto resultante da sonicagem foi centrifugado a 7.000xg por cerca de 15 minutos.

Após a centrifugação do produto sonicado, o
20 sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado foi lavado pelo menos 2 vezes com uma solução tampão adequada, como por exemplo, a solução Tris-HCl pH 8.0, a qual continha 4M de uréia, 0.5M de NaCl e 2% de triton X-100 de modo que o precipitado fosse ressuspensão.

25 Após a ressuspensão do precipitado, a porção insolúvel foi submetida ao ultra-som, sob um processo de sonicação no gelo conforme descrito no exemplo 9. O produto resultante da sonicagem foi centrifugado a 7.000xg por cerca de 15

minutos, de modo que os corpos de inclusão fossem purificados.

Os corpos de inclusão purificados foram ressuspensos em uma solução tampão adequado, como por exemplo, uma
5 solução Tris-HCl pH 8.0, a qual continha 6M de hidrocloreto de guanidina, 0.5M de NaCl e 5mM de imidazol, sob agitação constante a uma temperatura em torno de 23- 26°C por aproximadamente 1 hora.

Após este período de agitação uma nova centrifugação
10 foi realizada a 7.000xg por cerca de 20 minutos a uma temperatura preferencial de 4°C, de modo que a porção não solubilizada fosse separada. O sobrenadante obtido desta centrifugação foi filtrado preferencialmente em filtro de 0,45µm e armazenado a uma temperatura preferencial de 4°C.

Os corpos de inclusão obtidos foram analisados por
15 meio da técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE, conforme descrito no exemplo 8.

A Figura 19 mostra a preparação dos corpos de inclusão, no qual diferentes soluções tampões são
20 utilizadas em diversas lavagens, de modo a minimizar o número de contaminantes presente na preparação. Dita Figura 19 mostra que 1- Padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad); 2- Lavagem com tampão Tris-HCl 20mM pH 8.0; 3- Primeira lavagem com tampão Tris-HCl pH 8.0 contendo 4M de
25 uréia, 0.5M de NaCl e 2% de triton X-100; 4- Segunda lavagem com tampão Tris-HCl pH 8.0 contendo 4M de uréia, 0.5M de NaCl e 2% de triton X-100.

A Figura 20 mostra que quando os corpos de inclusão estão purificados e solubilizados, ditos corpos de inclusão

possuem um número reduzido de contaminantes. Dita Figura 20 mostra que 1- Padrão de peso molecular BenchMark (Invitrogen); 2- Corpos de inclusão purificados a partir da cepa BL21(DE) contendo o plasmídeo pOM187 (rotavírus) induzida; 3- Corpos de inclusão purificados a partir da cepa BL21(DE) contendo o plasmídeo pOM186 (astrovírus) induzida.

Exemplo 13: Purificação das proteínas recombinantes por meio da coluna de afinidades por íons metálicos

10 A purificação das proteínas recombinantes contidas nos corpos de inclusão solubilizados por meio da coluna de afinidade por íons metálicos, ocorreu de forma que cerca de 1,5mL da solução a qual continha os corpos de inclusão purificados foi adicionada a uma coluna, a qual continha 15 aproximadamente 5mL de uma resina de Ni⁺⁺ ProBond. Dito material foi incubado por aproximadamente 1 hora a uma temperatura preferencial de 4°C com agitação constante. Ao final do período de incubação, o volume líquido, o qual continha as proteínas que não foram capazes de se ligar a 20 resina foi retirado. O dito material, denominado de eluato, foi armazenado a baixa temperatura para posterior análise por meio da técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE, conforme descrito no exemplo 8.

25 A resina que continha as proteínas recombinantes, foi lavada com pelo menos duas vezes o volume de resina utilizado na purificação com uma solução tampão, Tris-HCl 0,01M pH 8.0, a qual continha 8M de uréia e 0,1mM NaH₂PO₄.

Após esta lavagem para retirada do material não ligado a resina, a mesma foi novamente lavada de modo que os

contaminantes que apresentassem menor afinidade pela resina, fossem eliminados. Para esta segunda lavagem, utilizou-se uma solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 8.0, a qual continha 8M de uréia, 0,1mM NaH₂PO₄ e 10mM de imidazol. Dita segunda lavagem ocorreu, por pelo menos 5 vezes, com aproximadamente 5mL da solução tampão com imidazol, sob constante agitação por cerca de 10 minutos a uma temperatura aproximada de 4°C.

Ao final das lavagens descritas acima, a resina foi lavada com a solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 8.0, a qual continha 0,1mM NaH₂PO₄ e 10mM de imidazol, de maneira que a uréia presente na resina fosse retirada.

Para eluição das proteínas recombinantes ligadas a resina de níquel, cerca de 1mL de uma solução tampão fosfato 50mM pH 4,5 contendo 300mM de NaCl e 2M de imidazol foi utilizado, incubando-se a coluna com este tampão por cerca de 16 horas a uma temperatura aproximada de 4°C. Foram feitas entre 3 a 4 eluições por processo purificativo realizado, todas da mesma maneira.

O eluato, lavados e eluídos foram estocados preferencialmente a -20°C para posterior análise por meio da técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE, conforme descrito no exemplo 8.

As proteínas recombinantes, as quais foram eluídas, durante a purificação em coluna de níquel foram reunidas em uma única alíquota e dialisadas contra uma solução de PBS 0,2X, por cerca de 16 horas a uma temperatura preferencial de 4°C. Após o término do período de diálise, as proteínas

recombinantes purificadas foram concentradas em cerca de 3X em sistema de vácuo.

As Figuras 21 e 22 mostram a purificação das proteínas recombinantes VP6 e VP90 respectivamente, nas quais 5 diferentes soluções tampão foram utilizadas em diversas lavagens, de modo a minimizar o número de contaminantes presentes na preparação. Ditas Figuras 21 e 22 mostram que 1- Padrão de peso molecular BenchMark (Invitrogen); 2- 10 Corpos de inclusão purificados; 3- Eluato; 4- Lavagem da resina com uma solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 8.0 contendo 8M de uréia e 0,1mM NaH₂PO₄; 5- Lavagem da resina com uma solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 8.0 contendo 8M de uréia, 0,1mM NaH₂PO₄ e 10mM de imidazol; 6- Lavagem da resina com uma solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 8.0, 15 contendo 0,1mM NaH₂PO₄ e 10mM de imidazol; 7- Resina antes da eluição da proteína.

A Figura 23 mostra que quando as proteínas recombinantes VP6 e VP90 estão purificadas e concentradas, ditas 20 proteínas apresentam um número reduzido de contaminantes. Para a Figura 23 tem-se que em 1- Padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad); 2- Proteína recombinante VP6 de rotavírus; 3- Proteína recombinante VP90 de astrovírus.

Exemplo 14: Quantificação e avaliação do grau de pureza das proteínas recombinantes

25 Para uma estimativa da concentração protéica, uma análise do concentrado foi realizada por meio da técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE, conforme descrito no exemplo 8. Para a quantificação das proteínas recombinantes purificadas e concentradas, o gel de poliacrilamida corado

com coomasie-blue foi submetido a uma densitometria, de modo a comparar as proteínas recombinantes purificadas e concentradas com uma curva padrão de albumina bovina (BSA), conforme mostra a Figura 24. Dita figura mostra que 1-
5 Padrão de peso molecular BenchMark (Invitrogen); 2 a 8- Curva padrão com BSA diluída nas concentrações de 5µg, 10µg, 20µg, 30µg, 40µg, 50µg e 100µg respectivamente; 9- Proteína recombinante VP6 de rotavírus purificada; 10- Proteína recombinante VP90 de astrovírus purificada.

10 A estimativa do grau de pureza das proteínas recombinantes purificadas a serem inoculadas em animais foi realizada por meio da técnica de eletroforese um gel do tipo SDS-PAGE, conforme descrito no exemplo 8. Neste procedimento, uma parte do pool obtido após a purificação
15 das ditas proteínas, foi preferencialmente concentrada 10X antes da análise. A Figura 25 mostra o resultado da estimativa do grau de pureza das proteínas recombinantes purificadas. Dita Figura mostra que as proteínas recombinantes purificadas apresentam um número reduzido de
20 contaminantes. Para Figura 25 tem-se que em 1- Padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad); 2- Proteína VP6 de rotavírus purificada e concentrada dez vezes; 3- Proteína VP6 de rotavírus purificada e concentrada três vezes; 4- Proteína VP90 de rotavírus purificada e concentrada dez
25 vezes; 5- Proteína VP90 de rotavírus purificada e concentrada três vezes.

Exemplo 15: Inoculação das proteínas recombinantes em animais

Para a realização do procedimento de inoculação das proteínas recombinantes em animais, foram selecionados quatro coelhos Nova Zelândia, machos, com peso variando de 3 a 3,5Kg.

5 Após a seleção dos animais, uma primeira sangria foi realizada por meio de um dispositivo perfurante 25x7 sem o uso de anestesia. O soro obtido nesta sangria foi utilizado como controle negativo.

10 Aproximadamente 15 dias após a sangria dos animais, cerca de 100µg de cada proteína recombinante purificada foi inoculada em 2 coelhos (100µg de proteína/coelho) por meio da utilização de um dispositivo perfurante sem o uso de anestesia. A inoculação foi realizada na parte interna da pata traseira, via intramuscular.

15 Para cada coelho, foram realizadas quatro inoculações e uma inoculação de reforço. As proteínas recombinantes foram inoculadas nos animais juntamente com solução de adjuvante de Freud's. A primeira inoculação das proteínas recombinantes foi realizada com o adjuvante completo de
20. Freud's, enquanto que as demais inoculações das proteínas recombinantes foram realizadas juntamente com adjuvante de Freud's incompleto.

25 O intervalo entre as inoculações foi de 15 a 20 dias. Entretanto, o intervalo para a aplicação da dose de reforço foi preferencialmente de 1 mês após a última inoculação.

Após o término de cada uma das inoculações, foi realizada uma sangria parcial com auxílio de um dispositivo perfurante, como por exemplo, um escalpe tamanho 25 ou uma agulha 25x7 sem o uso de anestesia para acompanhamento da

resposta imunológica específica dos animais. Na sangria parcial foram retirados aproximadamente 5mL de sangue de cada animal.

Uma sangria total foi realizada após um mês a
5 inoculação da dose de reforço, por meio da técnica de punção cardíaca com um dispositivo perfurante 40x12. Durante a sangria total, o animal permanecia anestesiado com cerca de 100mg/quilo de peso vivo de uma solução de cloridrato de quetamina.

10 Exemplo 16: Avaliação do anticorpos policlonais produzidos

A análise dos anticorpos policlonais foi realizada por meio da técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE, conforme descrito no exemplo 8. Na eletroforese foram utilizadas como amostra as proteínas recombinantes
15 purificadas, para todos os anticorpos produzidos, e no caso do rotavírus, também foi utilizada como amostra, a proteína VP6 nativa purificada.

As proteínas após terem sido submetidas à técnica de eletroforese, foram transferidas para membranas de
20 nitrocelulose por meio do uso de um sistema Transblot. Após a transferência das proteínas para as membranas de nitrocelulose, ditas membranas foram bloqueadas por cerca de 16 horas a uma temperatura aproximada de 4°C com uma solução de bloqueio adequada. Na presente concretização
25 utilizou-se como solução de bloqueio uma solução de PBS 1X, a qual continha cerca de 0,05% (v/v) Tween 20 e 5% (p/v) leite Molico.

A seguir, cada uma das membranas de nitrocelulose foi incubada separadamente com um dos seguintes anticorpos:

anti-histidina, o qual foi produzido em camundongo, anti-GST, o qual foi produzido em cabra e anticorpo policlonal específico (anti-rotavírus produzido em cabra Chemicon), além dos soros policlonais produzidos. Ditos anticorpos
5 foram previamente diluídos em tampão de bloqueio e as membranas foram incubadas com estas soluções contendo os anticorpos por cerca de duas horas com agitação suave a uma temperatura aproximada de 25°C.

Os soros obtidos após cada uma das sangrias, ou seja,
10 tanto os soros pré como os soros pós-imunização, foram testados preferencialmente numa diluição de 1/1000, independente da proteína imobilizada na membrana. Os controles utilizados neste procedimento foram os anticorpos específicos para as proteínas de fusão (histidina e GST) e
15 anticorpos policlonais específicos para rotavírus (Chemicon, Inc), todos diluídos segundo as recomendações do fabricante.

As membranas de nitrocelulose foram lavadas pelo menos três vezes com uma solução de PBS 1X, a qual continha cerca
20 de 0,05% de Tween 20. Cada uma das lavagens foi feita incubando as membranas de nitrocelulose por cerca de 10 minutos com a dita solução de lavagem. Depois de completadas as três lavagens das membranas de nitrocelulose, foi adicionado as ditas membranas, um
25 anticorpo anti-camundongo, um anticorpo anti-cabra ou um anticorpo anti-coelho. Todos os anticorpos adicionados estavam conjugados a fosfatase alcalina e diluídos de acordo com as recomendações do fabricante em uma solução tampão de bloqueio. As ditas membranas foram incubadas com

as ditas soluções contendo os anticorpos por pelo menos 1 hora a uma temperatura de aproximadamente 23 - 25°C sob agitação suave. Após o período de incubação, as membranas foram novamente lavadas pelo menos três vezes com uma 5 solução de PBS 1X acima descrita e incubação semelhante a acima descrita.

Após a lavagem com a solução de PBS 1X, as membranas de nitrocelulose foram lavadas pelo menos uma vez com uma solução tampão 100mM Tris-HCl pH 9, a qual continha, cerca de 10 150mM NaCl e 1mM CaCl₂. A revelação das membranas de nitrocelulose ocorreu por meio da adição do substrato NBT/BCIP (Promega) a dita solução tampão descrita acima, de acordo com as recomendações do fabricante.

As Figuras 26, 27 e 28 apresentam o resultados da 15 avaliação da imunogenicidade das proteínas VP6 e VP90 recombinantes. Ditas proteínas foram capazes de induzir a produção de imunoglobulinas específicas nos coelhos imunizados.

Ditas Figuras mostram que os anticorpos policlonais 20 produzidos foram capazes de reconhecer as proteínas recombinantes e no caso do anti-VP6 recombinante, este ainda reconheceu a proteína VP6 nativa purificada. Para as Figuras 26 e 27 tem-se que em 1- Revelação com soro de coelho 50 antes da inoculação da proteína recombinante; 2- 25 Revelação com soro de coelho 50 após a inoculação da proteína recombinante; 3- Revelação com soro de coelho 51 antes da inoculação da proteína recombinante; 4- Revelação com soro de coelho 51 após a inoculação da proteína recombinante; 5- Revelação com anti-histidina (Invitrogen);

6- Revelação com anti-GST (GE Health); 7- Revelação com anti-rotavírus (Chemicon); 8- Padrão de peso molecular BenchMark pré-corado (Invitrogen). Para a Figura 28 tem-se que em 1- Revelação com soro de coelho 48 antes da inoculação da proteína recombinante; 2- Revelação com soro de coelho 48 após a inoculação da proteína recombinante; 3- Revelação com soro de coelho 24 antes da inoculação da proteína recombinante; 4- Revelação com soro de coelho 24 após a inoculação da proteína recombinante; 5- Revelação com anti-histidina (Invitrogen); 6- Revelação com anti-GST (GE Health); 7- Padrão de peso molecular BenchMark pré-corado (Invitrogen).

Os soros contra rotavírus obtidos nas sangrias parciais também foram testados por meio da técnica de ELISA. Neste teste apenas os soros pós-imunização com resultado positivo no Western-blot foram utilizados como anticorpo de captura no ELISA.

A sensibilização das placas foi realizada com os soros contra VP6 recombinante preferencialmente na diluição de 1/1000 vezes em uma solução tampão de carbonato de sódio 0,016M/bicarbonato de sódio 0,034M pH 9,6, por cerca de 16 horas a uma temperatura aproximada de 4°C.

Após este período de incubação, as placas foram lavadas com uma solução tampão de lavagem, como por exemplo, uma solução de PBS 1X a qual continha cerca de 0,05% de Tween 20 e incubadas com as amostras a serem testadas por cerca de 90 minutos a uma temperatura preferencial de 37°C.

As amostras testadas durante a técnica de ELISA foram suspensões fecais a 10% positivas para rotavírus, o controle positivo do kit EIARA, a proteína recombinante purificada e concentrada e o vírus SA11 purificado de sobrenadante de cultura de célula. Como controle negativo foi utilizado uma suspensão fecal a 10% positiva para adenovírus, além de um controle de conjugado. Todas as amostras testadas foram anteriormente diluídas preferencialmente em 1/4 vezes em solução de PBS 1X, a qual continha 0,05% tween 20, 1% de albumina bovina (BSA) e 10mM de EDTA (diluyente da amostra). Para o controle conjugado, a amostra foi substituída pelo mesmo volume deste dito tampão.

A suspensão fecal a 10% (v/v) de cada uma das amostras de fezes foi preparada em uma solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,2 contendo 0,0015M de CaCl₂, homogeneizadas em equipamento adequado, como por exemplo, um vortex e clarificadas por meio da técnica de centrifugação a 3000xg por cerca de 10 minutos a uma temperatura preferencial de 4°C.

Após a incubação do soro de captura com as amostras, as placas foram lavadas pelo menos uma vez com uma solução tampão de lavagem e submetidas a uma reação com anticorpo específico anti-rotavírus (Chemicon, Inc) preferencialmente diluído 1/1000 em uma solução de PBS 1X, a qual continha 0,05% Tween 20 e 1% albumina, por cerca de 90 minutos a uma temperatura preferencial de 37°C.

Após o término da incubação, as placas foram lavadas pelo menos uma vez com a solução tampão de lavagem e

novamente submetidas à reação com anticorpo anti-cabra conjugado a peroxidase preferencialmente diluído 1/1000 em PBS 1X contendo 0,05% Tween 20 e 1% albumina, por cerca de 90 minutos a uma temperatura preferencial de 37°C. Após
5 o término desta incubação, as placas foram novamente lavadas pelo menos uma vez com a solução tampão de lavagem e submetidas ao procedimento de revelação.

O procedimento de revelação das reações foi realizado preferencialmente com 100µl de uma solução de água
10 oxigenada 30 volumes a uma concentração de 0,1% (substrato) e 100µl de uma solução cromógena, como por exemplo, a Tetrametilbenzidina (TMB-cromógeno) a uma concentração de 0,01%. Ambas as substâncias foram diluídas em uma solução tampão 0,0243M de citrato-0,0514M fosfato pH 5,6. Após a
15 diluição, as reações foram incubadas por cerca de 15 minutos em câmara escura. Após o período de incubação, as reações foram paralisadas com aproximadamente 25µl uma solução de ácido sulfúrico 2M.

A Figura 29 mostra o resultado da análise por ELISA
20 dos anticorpos policlonais anti-VP6 recombinante. Dita Figura mostra que este anticorpo foi capaz de detectar a presença do rotavírus em algumas amostras fecais.

As reações foram avaliadas em aparelho fotométrico equipado com filtro de 450nm. O valor de corte reação foi
25 calculado a partir da média das D.O. do controle de conjugado multiplicado por dois. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram D.O. mais alta que o valor de corte obtido.

Exemplo 17: Purificação das Imunoglobulinas

A partir dos soros pós-imunização obtidos as imunoglobulinas foram purificadas e posteriormente foram acopladas com látex. Para esta purificação foi utilizado o kit Affi-Prep Matrix Proteína A da Bio-Rad. A purificação
5 foi realizada conforme recomendação do fabricante.

As frações coletadas foram avaliadas por meio da leitura em espectrofotômetro (280nm) e por meio da técnica de eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE, conforme descrito no exemplo 8. As frações, as quais continham as
10 imunoglobulinas purificadas foram quantificadas por meio da dosagem de proteína na qual se utilizou o Bicinchonic Acid Protein Assay Kit, Sigma.

A Figura 30 mostra o resultado da purificação das imunoglobulinas. Dita figura mostra que as imunoglobulinas purificadas apresentam duas bandas: uma correspondente à
15 cadeia leve e outra correspondente à cadeia pesada. Para a Figura 30 tem-se que em 1- Padrão de peso molecular pré-corado BioRad e as linhas 2 a 7 as imunoglobulinas purificadas.

20 Assim, conforme aqui demonstrado, foi efetuada a expressão, purificação e caracterização dos epítomos das proteínas VP6 de rotavirus e VP90 de astrovirus, obtidas através do sistema de expressão de proteínas recombinantes de E. coli. Também foi aqui demonstrado o uso para
25 diagnóstico conjunto das viroses causadas por esses vírus.

A invenção aqui descrita, assim como os aspectos abordados devem ser considerados como uma das possíveis concretizações. Deve, entretanto ficar claro que a invenção não está limitada a essas concretizações e, aqueles com

habilidade na técnica irão perceber que, qualquer característica particular nela introduzida, deve ser entendida apenas como algo que foi descrito para facilitar a compreensão e não podem ser feitas sem se afastar do
5 conceito inventivo descrito. As características limitantes do objeto da presente invenção estão relacionadas às reivindicações que fazem parte do presente relatório.

REIVINDICAÇÕES:

1. Processo de produção de insumos imunobiológicos para aplicação em um kit de diagnóstico de viroses gastroentéricas

5 **caracterizado por** compreender:

- desenvolver por meio de metodologias de biologia molecular vetores plasmidiais de expressão de proteínas em sistema *E.coli*;

10 - avaliar o perfil protéico e o rendimento obtido em um cultivo bacteriano em baixa escala de clones transformados com os vetores plasmidiais de expressão;

- avaliar a antigenicidade dos epítopos expressos;

15 - padronizar um método purificativo dos epítopos recombinantes das proteínas VP6 e VP90 para serem utilizadas como imunógenos em modelos animais para a produção de anticorpos policlonais;

20 - caracterizar os anticorpos policlonais anti-VP6 rotavírus e anti-VP90 astrovírus produzidos a partir de proteínas recombinantes específicas.

2. Oligonucleotídeos iniciadores **caracterizados por** possuírem as SEQ ID. NO: 1, SEQ ID. NO: 2, SEQ ID. NO: 3 e SEQ ID. NO: 4, conforme abaixo:

25 CTTCgCCATggAggTTCTgTACTCAC - SEQ ID NO:1

GTCgCgCCATCggCCgAATTAATTACTC - SEQ ID NO:2

AATCACTCCATgggAAgCTCCTATgC - SEQ ID NO:3

GTgACAAgCTCggCCgCAGATACAgC - SEQ ID NO:4

3. Vetores de expressão plasmidial **caracterizado por** conter regiões específicas para a expressão de proteínas ou epítomos recombinantes da proteína VP6 de rotavírus e VP90 de astrovírus.

4. Vetores de expressão plasmidial de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** as seqüências clonadas corresponderem às regiões alvo da invenção, a qual corresponde a posição nucleotídica de 23 a 742 (VP6) e posição nucleotídica de 4145 a 5325 (VP90).

5. Kit de diagnóstico para diagnosticar viroses gastroentéricas **caracterizado por** empregar anticorpos produzidos a partir das proteínas recombinantes.

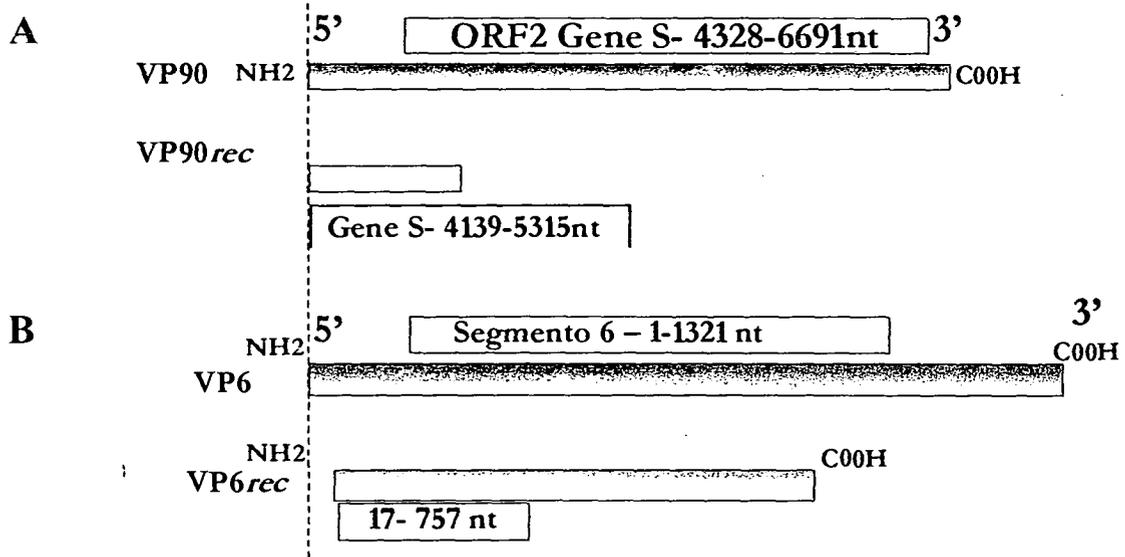


Figura 1

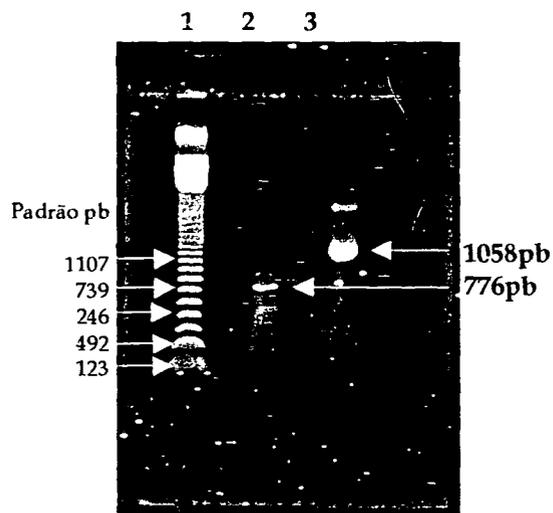


Figura 2

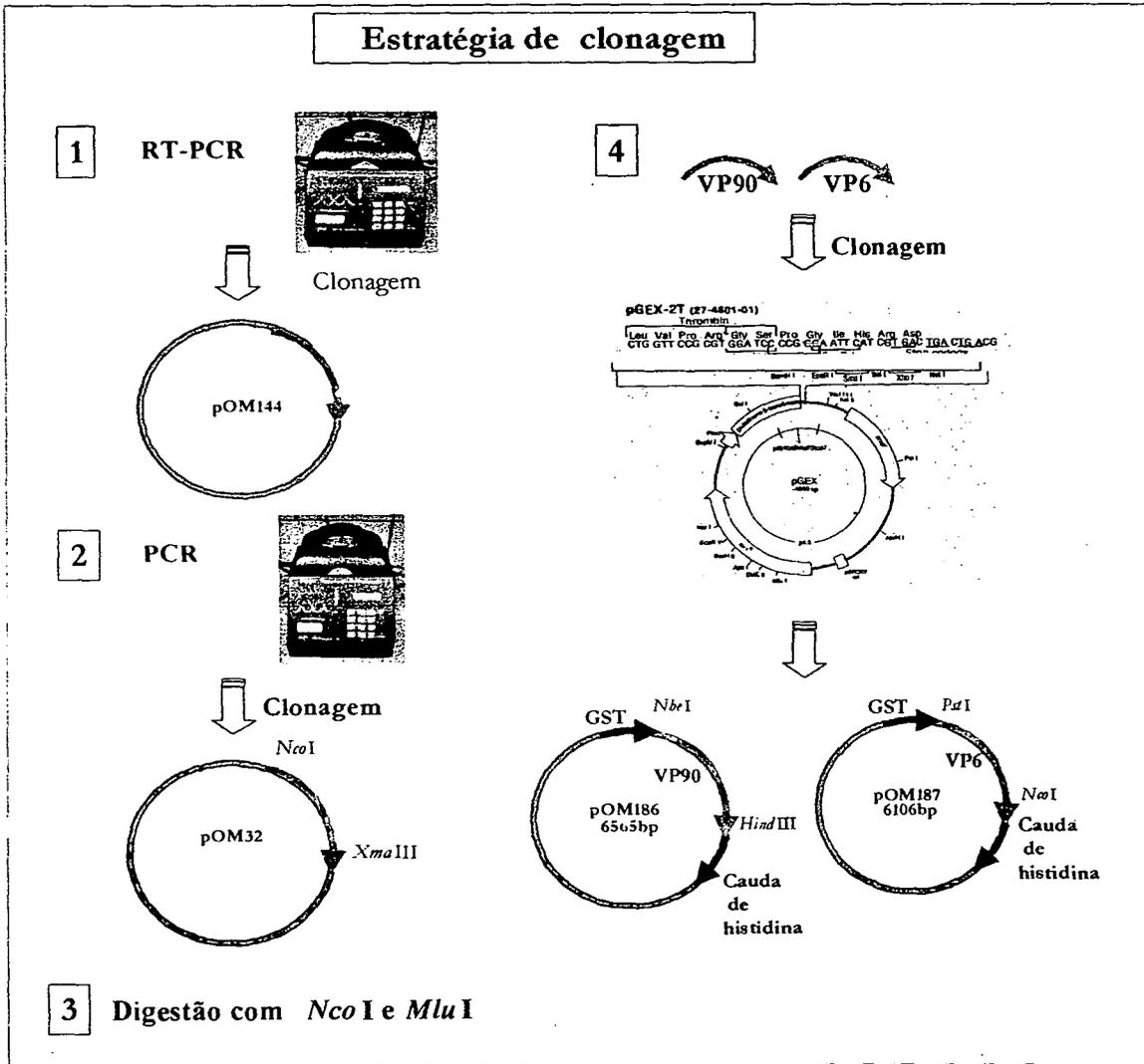


Figura 3

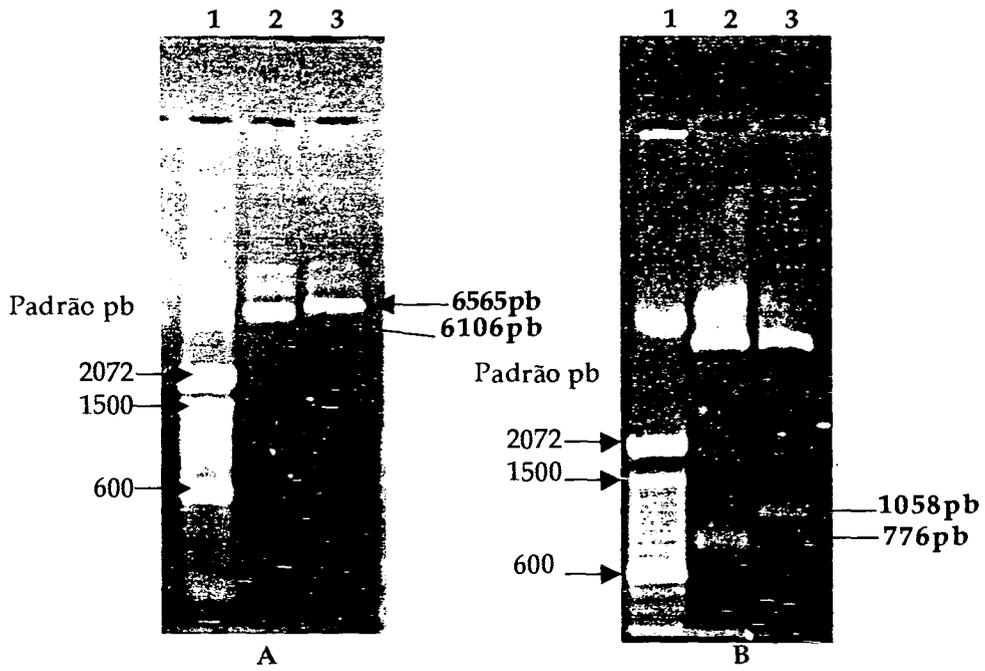


Figura 4A

Figura 4B

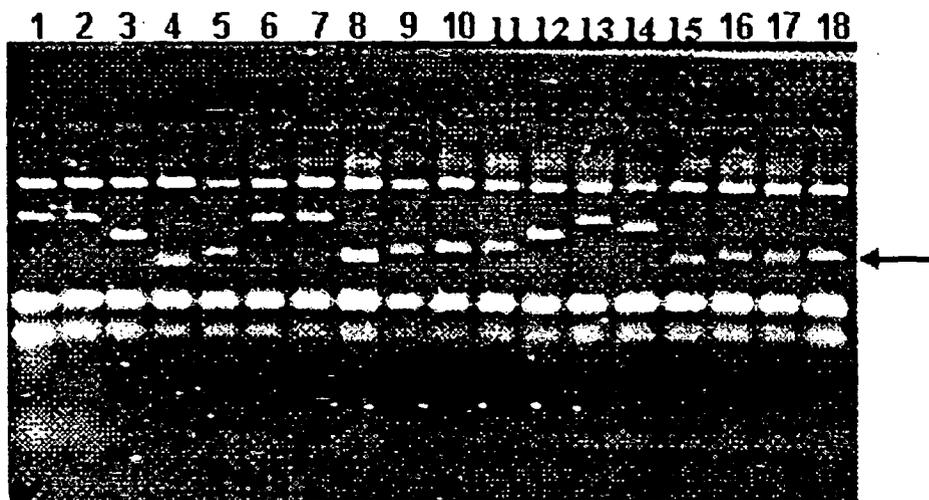


Figura 5

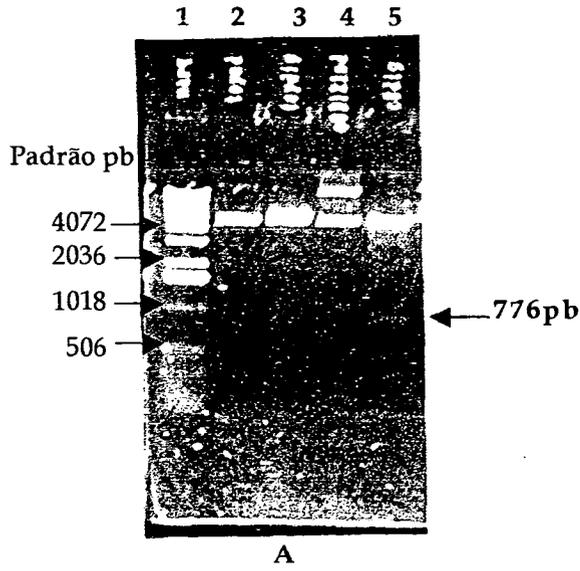


Figura 6A

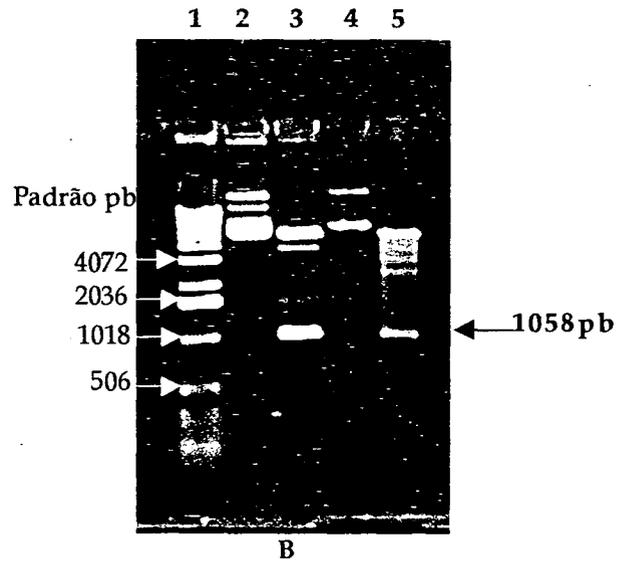


Figura 6B

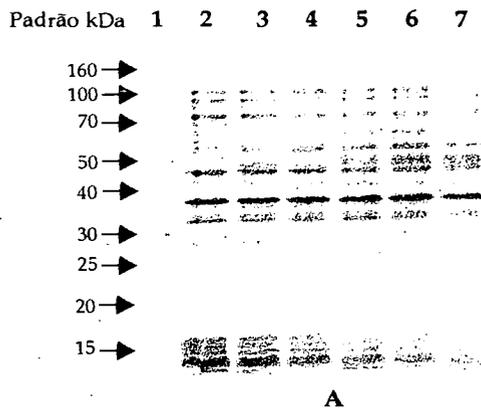


Figura 7A

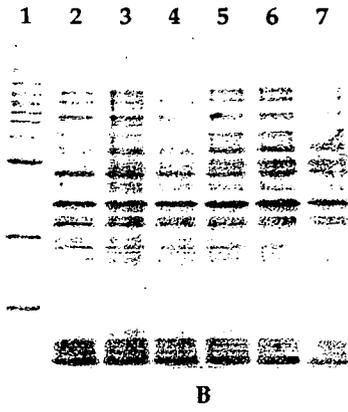


Figura 7B

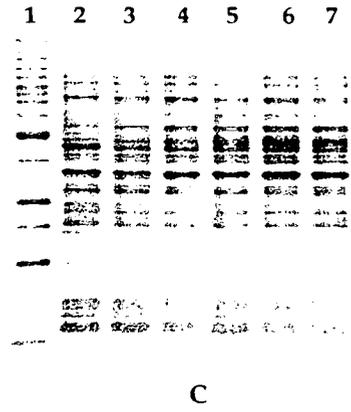


Figura 7C

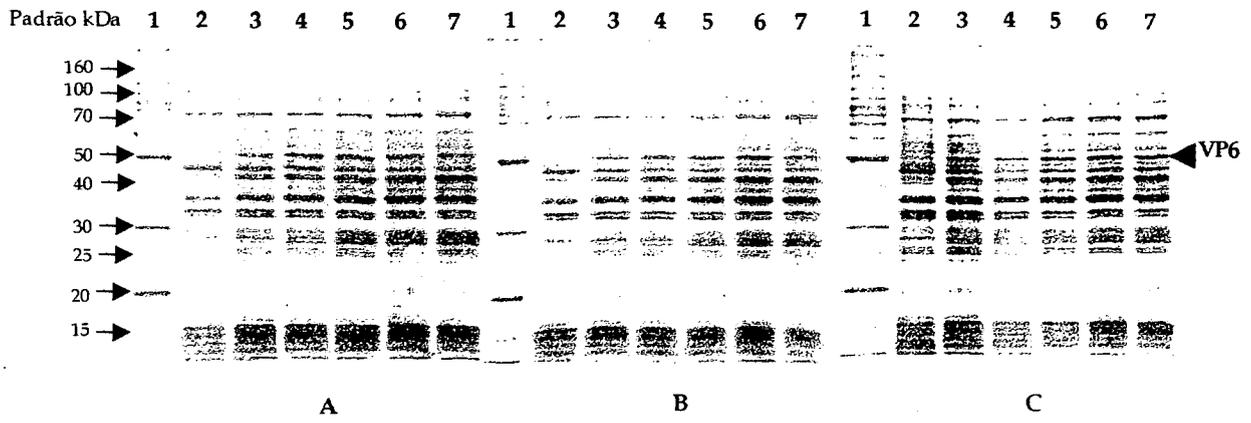


Figura 8A

Figura 8B

Figura 8C

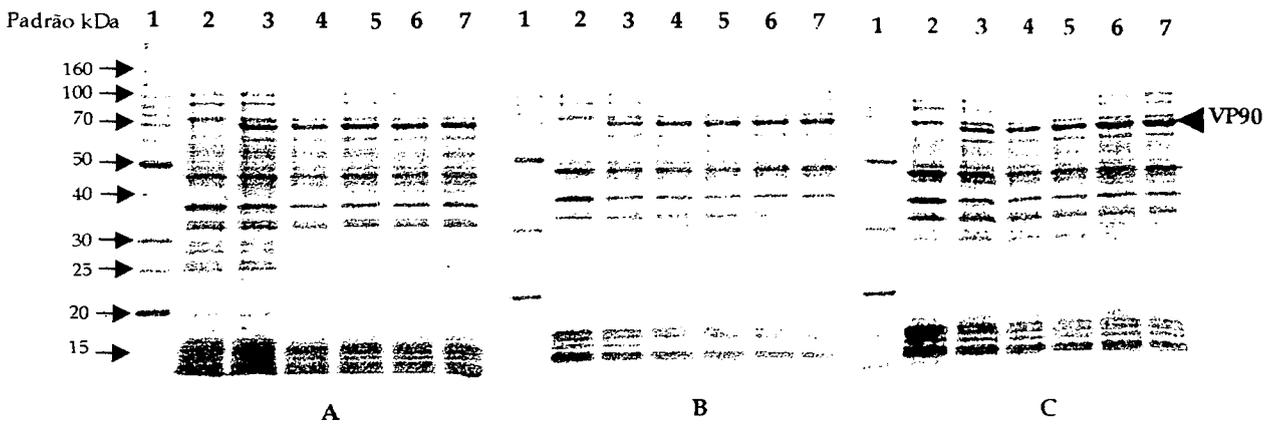


Figura 9A

Figura 9B

Figura 9C

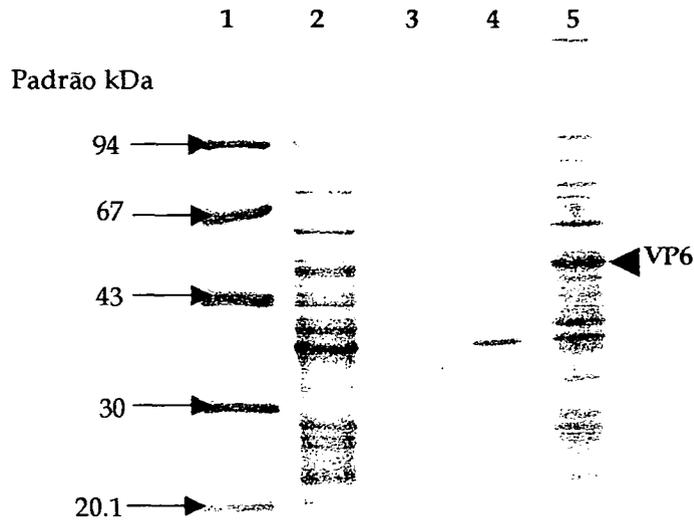


Figura 10

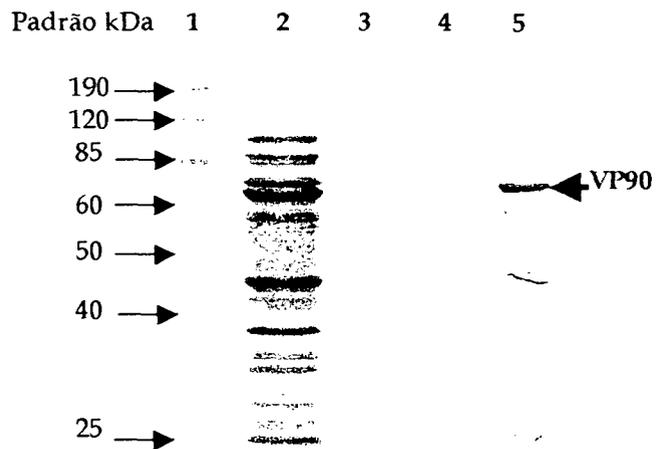


Figura 11

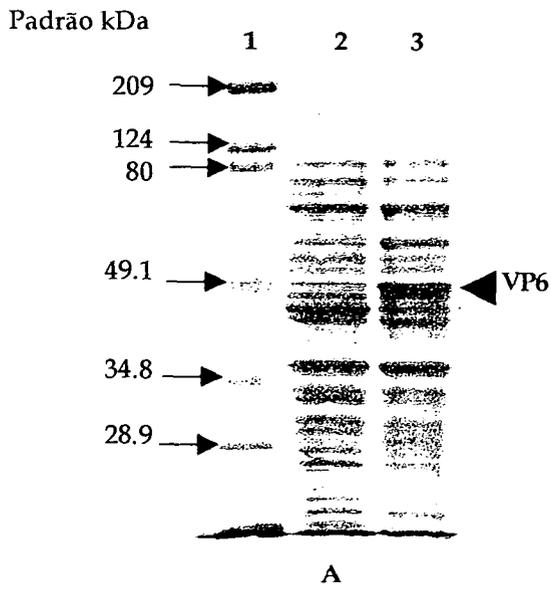


Figura 12A

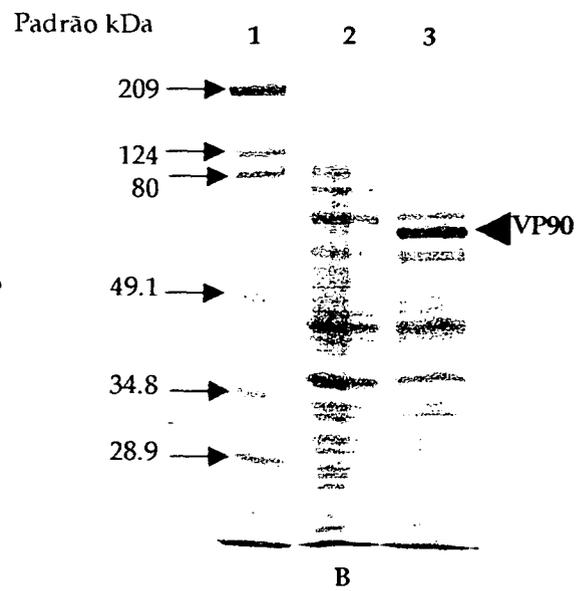


Figura 12B

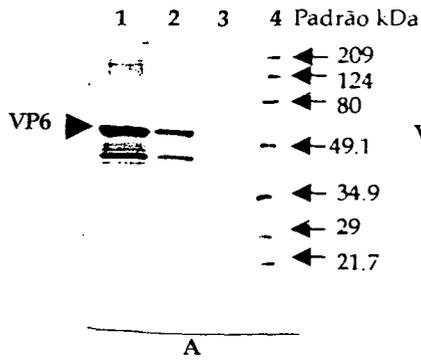


Figura 13A

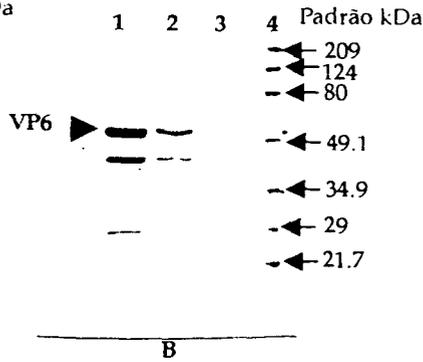


Figura 13B

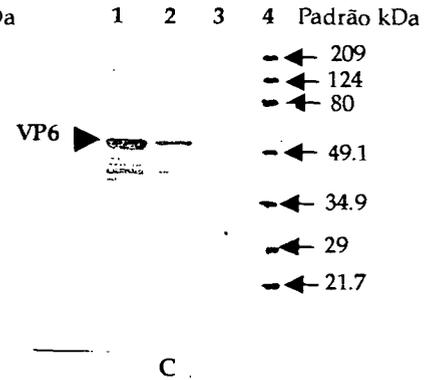


Figura 13C

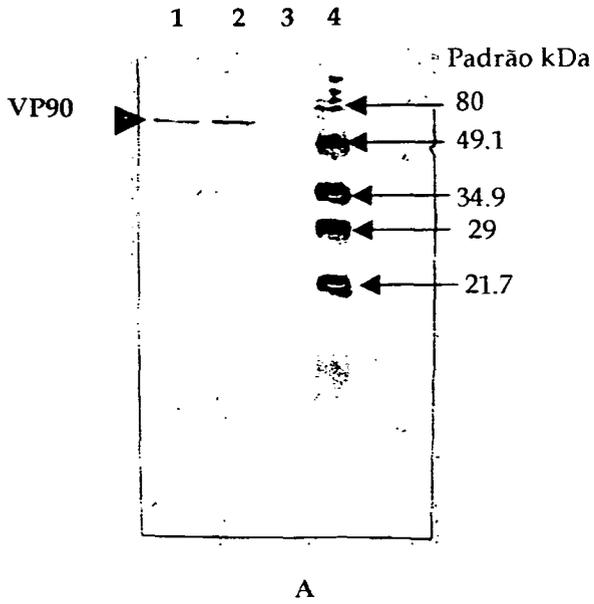


Figura 14A

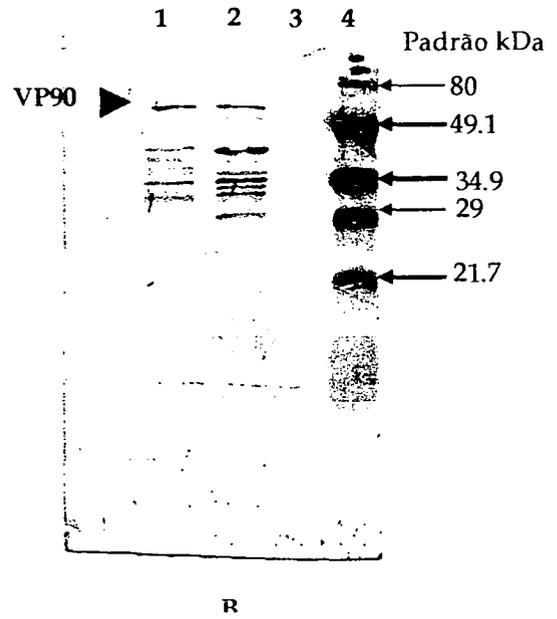


Figura 14B

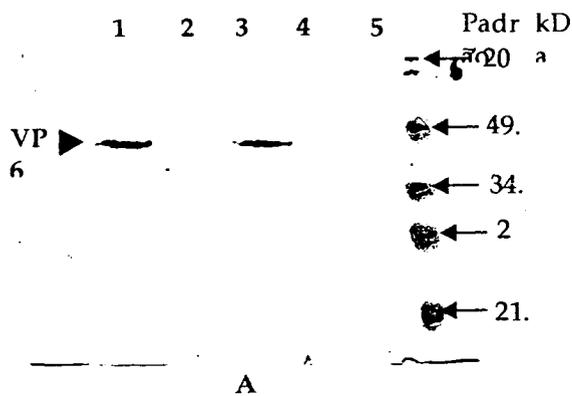


Figura 15A

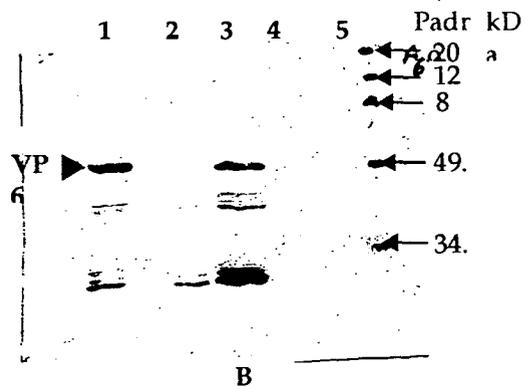


Figura 15B

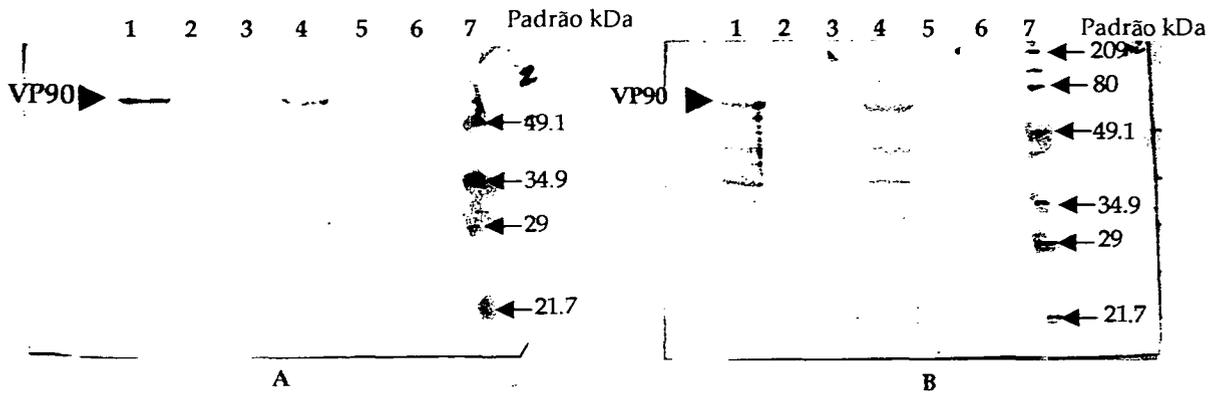


Figura 16A

Figura 16B

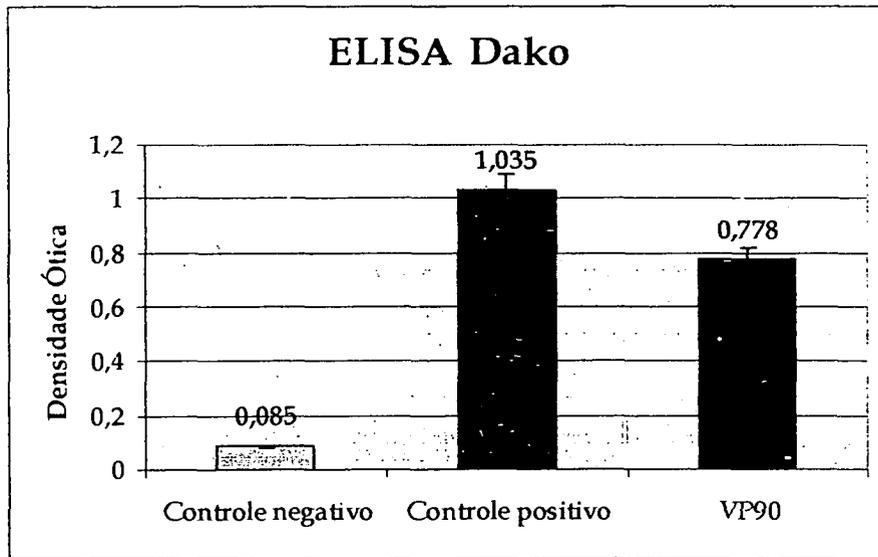


Figura 17

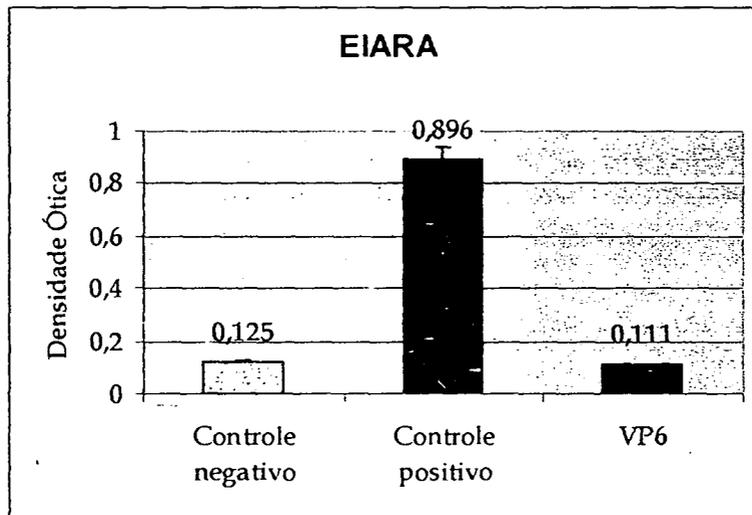


Figura 18

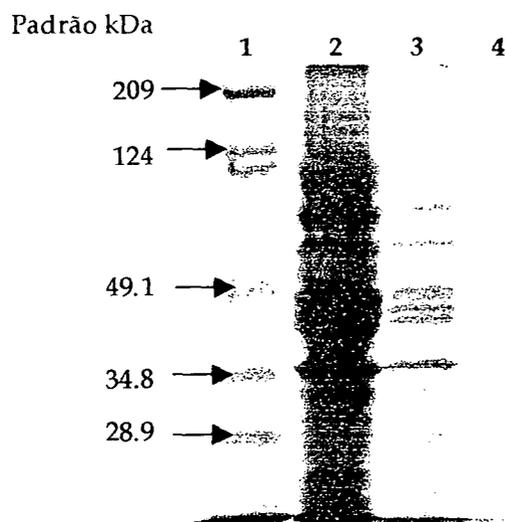


Figura 19

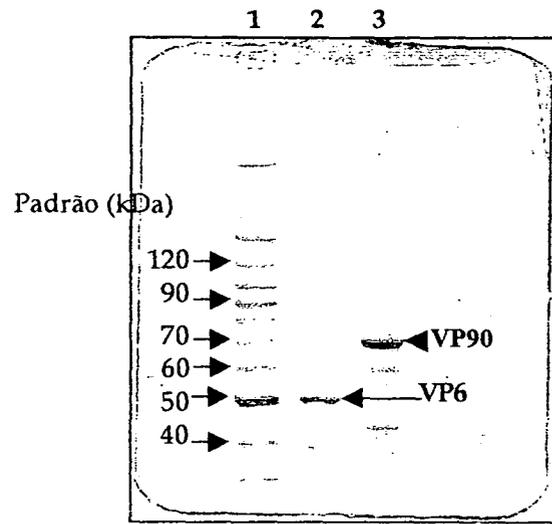


Figura 20

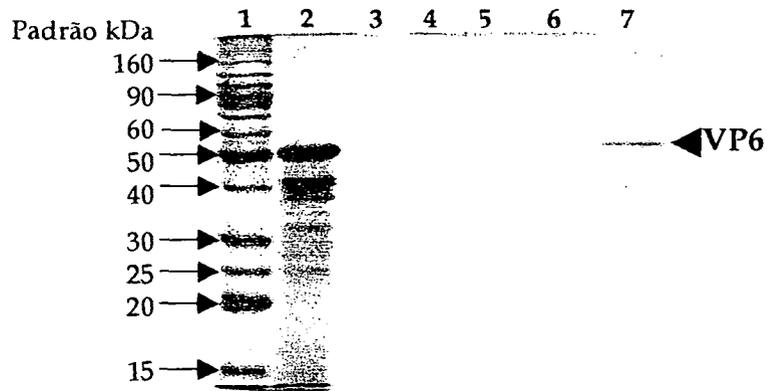


Figura 21

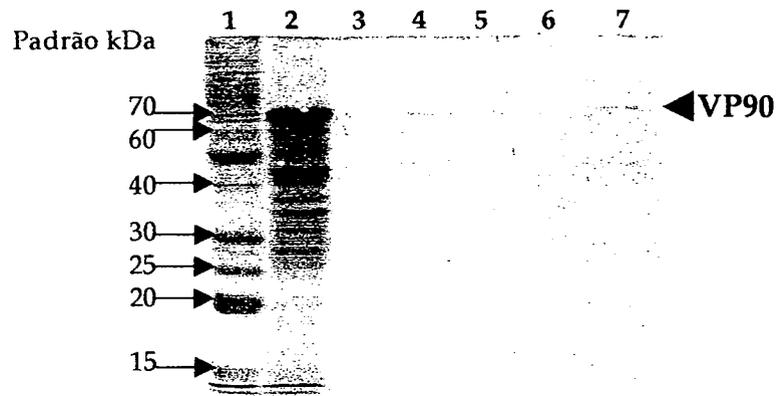


Figura 22

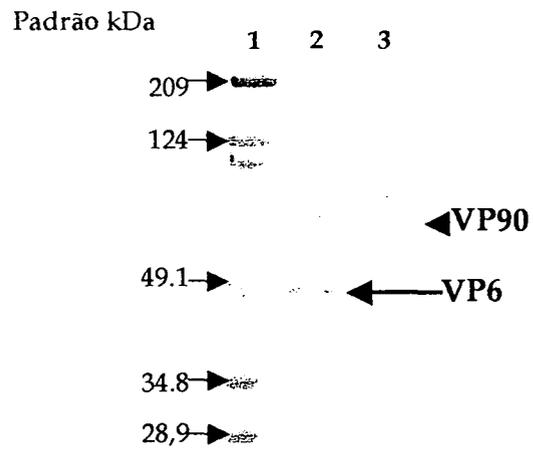


Figura 23

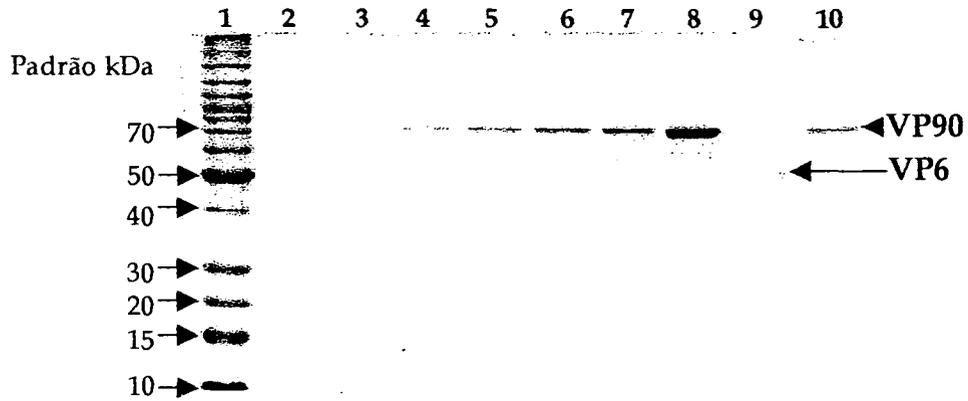


Figura 24

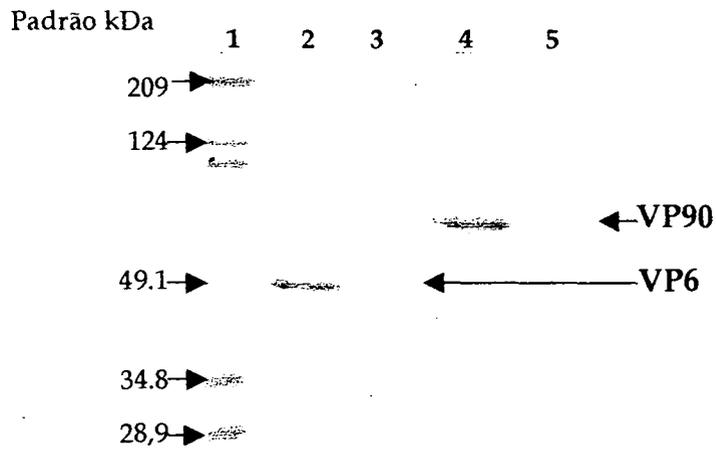


Figura 25

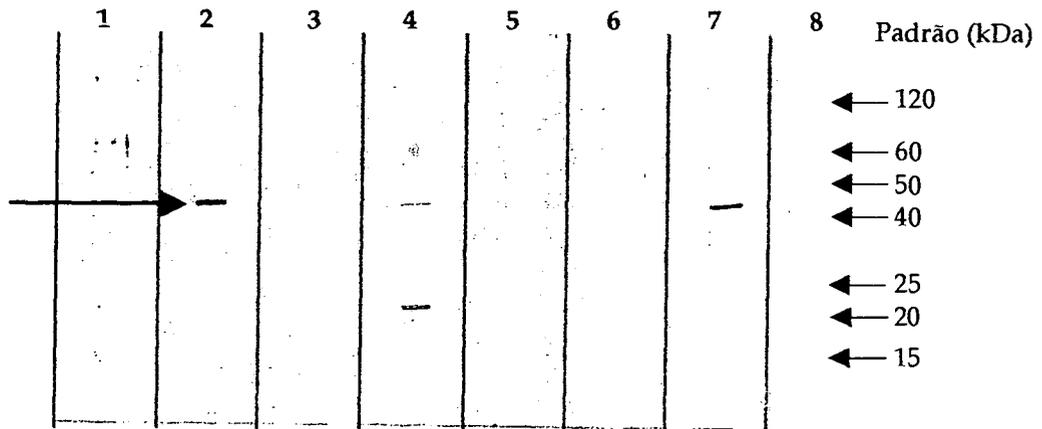


Figura 26

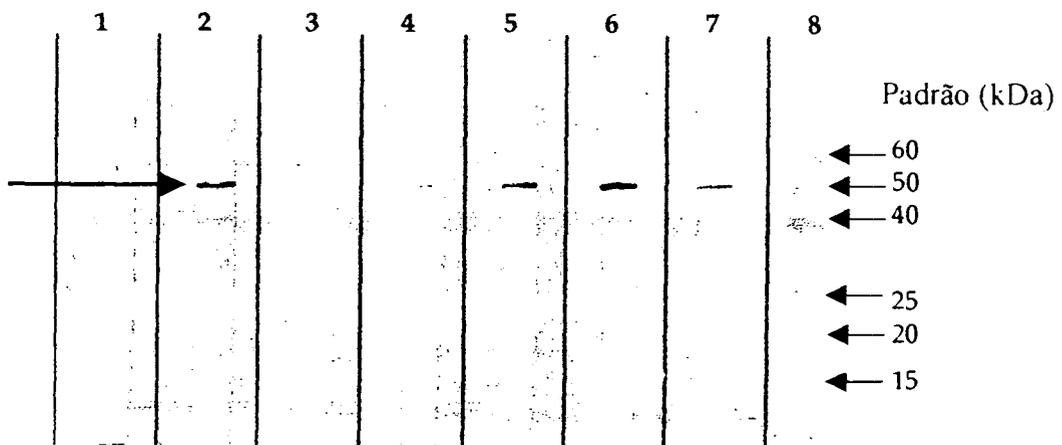


Figura 27

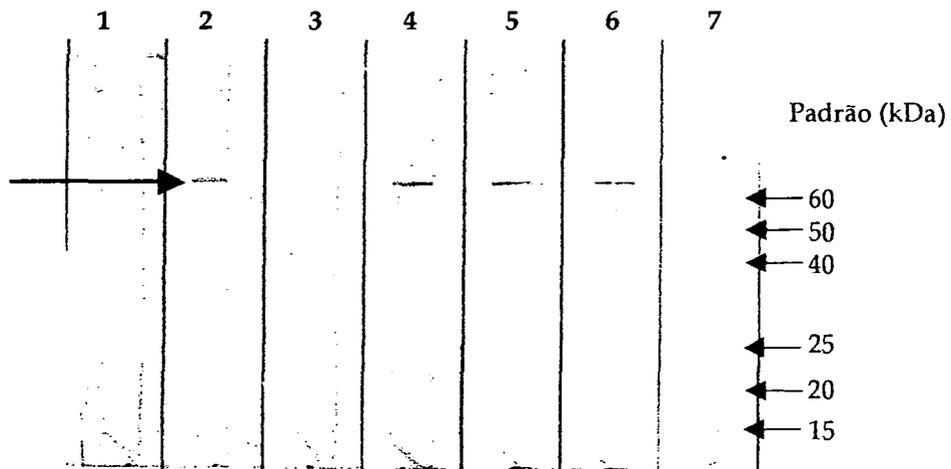


Figura 28

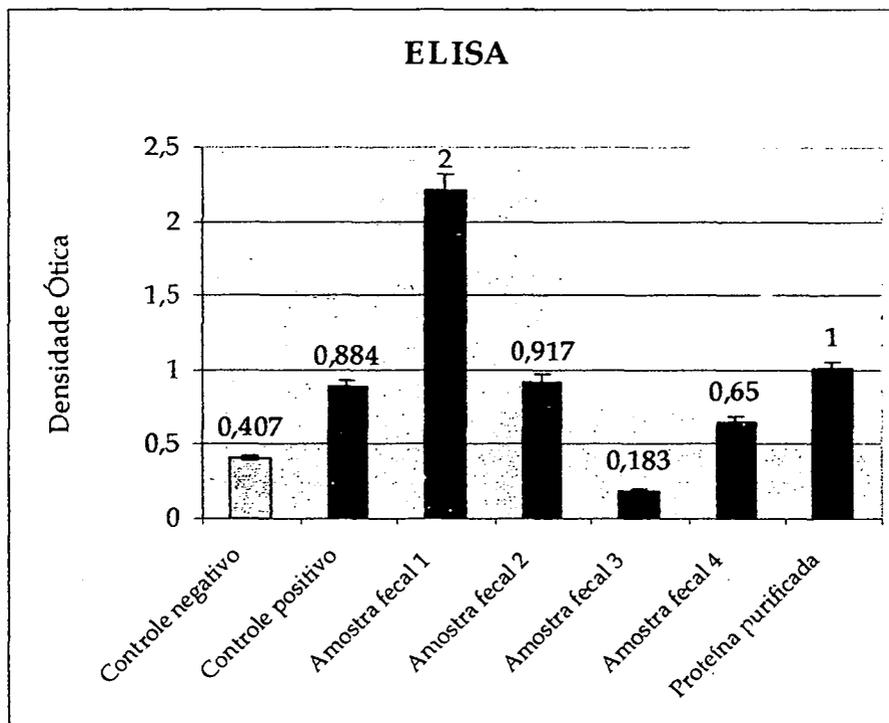


Figura 29

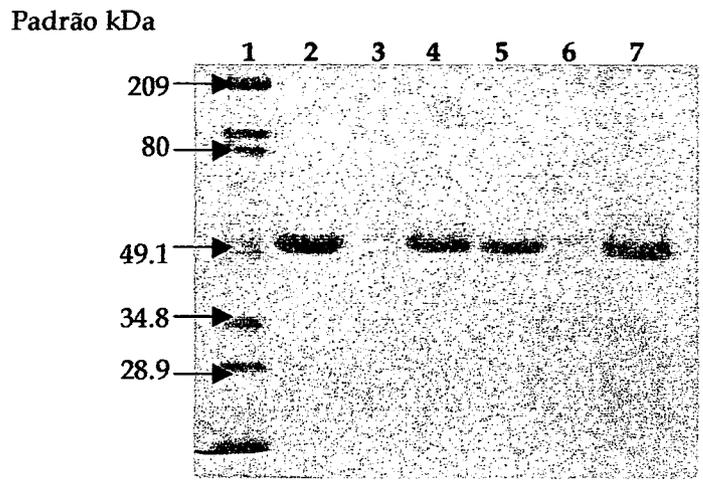


Figura 30

RESUMO

"Vetores de expressão plasmidial contendo regiões específicas para a expressão de proteínas ou epítopos recombinantes de rotavírus e astrovírus, 5 Processo de produção dos insumos para geração de imunobiológicos para diagnóstico".

A presente invenção se refere à produção de proteínas virais específicas recombinantes, para aplicação na construção de um kit de diagnóstico 10 para detecção simultânea das duas principais viroses gastroentéricas. Mais particularmente, as viroses detectadas pelo dito kit são as causadas por rotavírus e astrovírus.