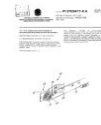


» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: PI0005477-1 A2

[Leia-me antes](#)

(22) Data do Depósito: 13/10/2000

(51) Classificação: C12N 15/63 ; G01N 33/569

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE HIDATIDOSE

"PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE HIDATIDOSE". Onde o antígeno recombinante AgB/2 de Echinococcus granulosus foi produzido em Escherichia coli por meio de técnicas de DNA recombinante. A sequência de nucleotídeos que codifica esta proteína foi clonada em um vetor de expressão da série pGEX. O uso deste antígeno para imunodiagnóstico da hidatidose unilocular resultou em significativa sensibilidade (83,87%) e especificidade (98,28%), quando se utilizou o método de ELISA par detecção de anticorpos específicos no soro de pacientes com parasitose.

(71) Nome do Depositante: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS) / Alberto José Nieto Cadenazzi (UY) / Verônica Fernandez Mancebo (UY) / Cecilia Fernandez Granja (UY) / Gualberto Gerardo Gonzalez Sapienza (UY)

Arnaldo Zaha / Alberto José Nieto Cadenazzi / Verónica Fernandez Mancebo / Cecilia Fernandez Granja /

(72) Nome do Inventor: Gualberto Gerardo Gonzalez Sapienza / [Sandra Estrazulas Farias](#) / Henrique Bunselmeyer Ferreira / Janine Marta Ceni / Marilise Brittes Rott

(74) Nome do Procurador: Paulo Afonso Pereira Consultores em Marcas e Patentes Ltda. S/C

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE HIDATIDOSE”

O presente invento refere-se a uma seqüência peptídica imunogênica de *E. granulosus*, obtida através de técnicas de DNA recombinante e denominada AgB/2, a uma seqüência de DNA que codifica esta proteína e também a aplicação desta seqüência peptídica para fins diagnósticos e terapêuticos.

A hidatidose é reconhecida como uma das zoonoses de maior importância a nível mundial, afetando o homem como os seus animais domésticos e levando a importantes repercussões econômicas, tanto no campo médico, como veterinário. A doença no hospedeiro intermediário é causada pela infecção com o estágio metacestóide do parasita *Echinococcus granulosus*, que tem o cão como hospedeiro definitivo, e é caracterizada pela formação de um cisto (cisto hidático) preenchido com um fluido (líquido hidático). Este cisto pode sobreviver por muitos anos sem ser significativamente afetado pelo sistema imune do hospedeiro e seu contínuo crescimento em órgãos tais como o fígado, pulmões, baço e cérebro pode causar severa patologia. A relativa escassez de dados epidemiológicos na hidatidose humana e animal é uma consequência da dificuldade em diagnosticar a presença do cisto hidático nos hospedeiros intermediários (MCMANUS & SMITH, 1989; SCHANTZ et al., 1995). Em humanos, o diagnóstico é complicado pelo fato de que os sintomas da hidatidose usualmente manifestam-se muitos anos após a exposição ao patógeno e, além disso, essas manifestações clínicas não são específicas, variando de acordo com o tamanho, localização e estado do cisto (SCHANTZ, 1989).

A cirurgia é a principal forma de tratamento após um diagnóstico por métodos de imagem, como tomografia computadorizada, ressonância magnética, raio X e/ou ultrassom.

A detecção precoce da hidatidose humana é importante e pode resultar em reduzida morbidade, sendo o imunodiagnóstico de grande utilidade em diagnóstico clínico, controle de pacientes e após tratamento e estudos epidemiológicos, por se tratar da mais específica das alternativas para detecção de infecções com a fase larval de *E. granulosus*. Imunoeletroforese, dupla difusão em ágar, hemaglutinação indireta, aglutinação do látex, enzima imuno ensaio ou ELISA e immunoblotting são os testes mais comumente usados. Na maioria deles, anticorpos contra antígenos parasitários são detectados em soros de pacientes. Entretanto, testes imunológicos apresentam problemas crônicos associados com a qualidade e disponibilidade de antígenos parasitários. Neste sentido a produção de antígenos através de métodos de DNA recombinante constitui uma importante ferramenta para sua caracterização, permitindo que proteínas antigênicas sejam descritas a nível de seqüência de aminoácidos e epitopos.

Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa clonaram e caracterizaram genes que codificam antígenos de *E. granulosus*, muitos dos quais com potencial de utilização em diagnóstico, vacinação, imunoterapia ou como alvos potenciais para a quimioterapia. Os resultados obtidos nos testes imunodiagnósticos, embora encorajadores, reforçam a necessidade de uma melhora nas suas especificidades e sensibilidade. Assim, os reforços devem ser concentrados na identificação de epitopos espécie-específicos em antígenos

previamente caracterizados e na descoberta e caracterização de outros antígenos com potencial diagnóstico, produtos de genes de *E. granulosus*.

Dentre os diversos antígenos de *E. granulosus* identificados em líquido hidático fértil, dois deles, as lipoproteínas conhecidas como antígeno 5 (Ag5) e antígeno B (AgB), são os mais relevantes para o diagnóstico da hidatidose humana (LIGHTOWLERS & GOTTSTEIN, 1995), por serem imunodominantes nas preparações antigênicas do parasita. Os antígenos usados na rotina para diagnóstico imunológico de hidatidose são usualmente obtidos do líquido hidático de cistos férteis de animais domésticos podendo conter produtos do metabolismo do parasito comuns a outros helmintos, o que leva à produção de reações falso-positivas, bem como muitos componentes do hospedeiro (CAPRON et al., 1968; BEM ISMAEL et al., 1980).

O antígeno B é uma lipoproteína termoestável de cerca de 120-160 kDa. Em SDS-PAGE apresenta-se como um grupo de moléculas regularmente espaçadas não afetadas pela redução. É um antígeno fortemente imunogênico e seu alto conteúdo no líquido hidático sugere um importante papel deste antígeno na biologia do parasito e, particularmente, em sua relação com o hospedeiro. O antígeno B foi identificado como um possível inibidor de protease e também com capacidade de inibir o recrutamento de neutrófilos (SHEPHERD et al., 1991). Cerca de 90% dos pacientes com hidatidose unilocular e 40% de pacientes com hidatidose alveolar (causada por *Echinococcus multilocularis*), exibiram anticorpos contra o antígeno B (LEGGATT et al., 1992). A menor subunidade do antígeno B é estimada em 8 kDa (SHEPHERD & MCMANUS, 1987; LIGHTOWLERS et al., 1989) e acredita-se que seja *Echinococcus* – específica e que tenha, por isso, potencial valor diagnóstico (MADDISON et al., 1989).

FERNÁNDEZ et al. (1996), caracterizaram um cDNA (DNA complementar) codificando um antígeno similar, mas distinto da subunidade de 8 kDa do antígeno B que havia sido descrita por SHEPHERD et al. (1991) e FROSCH et al. (1994). O fago recombinante (λ 3C3) que codifica esta subunidade diferente de 8 kDa do antígeno B foi isolado de uma biblioteca de expressão de cDNA de protozoários de *E. granulosus*. O procedimento de seleção utilizou um anti-soro hiperimune de coelho produzido contra uma fração lipoprotéica enriquecida de líquido hidático bovino. Anticorpos policlonais monoespecíficos, purificados por afinidade contra a proteína recombinante produzida por λ 3C3, reagiram por immunoblotting com bandas de pesos moleculares aparentes de 8, 16, 24 e 32 kDa da fração lipoprotéica enriquecida do líquido hidático. Portanto, o padrão descrito como correspondente às subunidades do antígeno B (LIGHTOWLERS et al., 1989) foi reproduzido com anticorpos λ 3C3.

O seqüenciamento do clone 3C3 revelou um fragmento de cDNA de 393 pb com uma open reading frame (ORF) de 270 pb (tercer os nucleotídeos 41 e 311) e um típico sinal de poliadenilação no nucleotídeo 342 seguido por uma cauda poli (Adenina). Esta seqüência encontra-se publicada na base de dados Gen-Bank (código de acesso: U15001) (FERNÁNDEZ et al., 1996).

```
1 ggtgtatct gcgttgaca ttgtggaga caatcgcata atgaggactt acatccttct
61 ctctcttgcct ctcgtggcct tcgtggccgt cggtcaagct aaagatgagc caaaagcaca
121 catggggcaa gtggtaaaaa aaagatgggg tgaacttca gacttctta gaaatgatcc
```

181 actgggtcaa agacttgctg ctctggcaa tgacctaact gccattgcc agaagctgca
214 attgaagatt cgtgaggtgc tgaagaagta tgtaagaat ttgggtggaag aaaaagatga
301 tgattcaaag taagcatgc gtcgggacac atgattgcc taataaattc tacttaccat
361 cccat

A comparação desta seqüência com seqüências de nucleotídeos publicadas no Gen-Bank revelou 40% de identidade com a subunidade menor do antígeno B e de *E. granulosus* (FROSCHE et al., 1994). A análise da seqüência de aminoácidos deduzida do clone 3C3 mostrou uma porção hidrofóbica compreendida entre as posições por peptídeo (VON HEIJNE, 1986), indicando, portanto, que o polipeptídeo codificado pelo 3C3 poderia ser uma proteína secretória (FERNÁNDEZ et al., 1996).

O gene foi subclonado em um vetor de expressão da série pGEX (vetor plasmidial de expressão) (SMITH & JOHNSON, 1998) e expressado como uma proteína de fusão com a glutatona S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum* em *Escherichia coli* AD202. As células foram multiplicadas até a fase logarítmica em meio YT (extrato de levedo e triptona) suplementado com ampicilina (100 mg/mL) e induzidas com 0,1 mM de isopropiltiogalactopiranosídeo (IPTG) por 3 horas. O antígeno foi posteriormente purificado por cromatografia de afinidade, utilizando-se uma resina de glutatona-sepharose.

A proteína recombinante purificada foi analisada em gel de poliacrilamida-SDS 15% e transferida para membrana de nitrocelulose (TOWBIN et al., 1979) tendo sido reconhecida por um pool de soros de pacientes com hidatidose confirmada por cirurgia.

Procedeu-se então a avaliação do potencial diagnóstico da proteína purificada AgB/2 pelo método de ELISA (MAYER & WALKER, 1987; FERREIRA & ZAHA, 1994). Os soros testados foram diluídos em 1:200 em lisado de *E. coli* e o conjugado anti-IgG humana foi diluído 1:1000 em bloto.

Foram analisados 147 soros humanos pertencentes aos seguintes grupos com diagnóstico confirmado:

Grupo I: Hidatidose confirmada por cirurgia (10).

Grupo II: Hidatidose diagnosticada por DD5, western blotting e ELISA (21).

Grupo III: Hidatidose alveolar (*E. multilocularis*) (7)

Grupo IV: Esquistossomose (*Schistosoma mansoni*) (37).

Grupo V: Cisticercose (*Taenia solium*) (17).

Grupo VI: Hidatidose policística (*E. vogeli*) (18).

Grupo VII: Toxocarose (*Toxocara spp.*) (8).

Grupo VIII: Indivíduos clinicamente normais (29).

O percentual de positividade para cada grupo de soros está demonstrado na tabela a seguir. Após análise dos resultados obtidos verificou-se uma sensibilidade de 83,87% e uma especificidade de 98,28%.

Tabela I: Resultados obtidos em teste de ELISA para o antígeno recombinante AgB/2

Soros testados	Nº	Positivos
Grupo I	10	7
Grupo II	21	19
Grupo III	7	0
Grupo IV	37	1
Grupo V	17	0
Grupo VI	18	0
Grupo VII	8	1
Grupo VIII	29	1

Estes resultados foram comparados com testes similares realizados para o antígeno recombinante AgB/1 e para o antígeno B nativo obtido por cromatografia de troca aniônica (dados não mostrados) e mostraram melhor especificidade e sensibilidade.

FOTO

Figura 1. Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante AgB8/2 por eletroforese em SDS-PAGE. As amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE e coradas com coomassie blue (1) marcadores (2) extrato total de *E. coli* contendo pGEX4T-2 com a seqüência de cDNA que codifica o AgB8/2 sem a indução por IPTG (3) extrato total de *E. coli* contendo pGEX4T-2 com a seqüência de cDNA que codifica o AgB8/1 após indução com 0,1 mM de IPTG (4) proteína de fusão AgB8/2+GST (5) proteína AgB8/2 purificada (4,5µg) (6) GST (4,0 µg). As massas moleculares dos marcadores estão assinaladas. A seta indica a proteína purificada.

O processo do antígeno recombinante AgB8/2 para utilização no imunodiagnóstico da hidatidose, propriamente dito, é efetuado como segue.

O antígeno AgB8/2 expressado como uma proteína de fusão com a GST de *Schistosoma japonicum* utilizando um vetor da série pGEX é purificado de acordo com SMITH & JOHNSON (1988). Um volume de 80 ml de uma pré-cultura da cepa bacteriana contendo o plasmídeo recombinante, cultivada em YT suplementado com ampicilina a uma concentração final de 50 µg/ml, por 14 – 16 horas, a 37°C e com agitação (150 rpm), é inoculado em 800 ml de YT e incubado, por 1h a 37°C com agitação.

Adiciona-se então IPTG 91-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) para a concentração final de 0,1 mM e a cultura é incubada por 3 h nas mesmas condições. As células sedimentadas por centrifugação a 5krpm, por 5 min a 4°C (centrífuga Sorvall RC5C, rotor GSA), e ressuspensas em 8 ml de PBA. A lise das

células é feita por sonicação (4 a 6 pulsos de 30 Seg com amplitude máxima – sonicador Cole-Palmer 4710) em banho de gelo e posterior adição de triton X-100 (Sigma) para concentração final de 1%. Após centrifugação a 10krpm, por 5 min a 4°C (rotor Sorvall SS34), o sedimento é ressuspenso em 8 ml de PBS e uma alíquota de 10 µl é ressuspenso em 8 ml de PBS e uma alíquota de 10 µl é coletada para posterior análise por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, para análise das proteínas da fração insolúvel. O sobrenadante (fração solúvel) é misturado a 1,5 ml de resina glutathiona-sepharose 4B (Pharmacia) 50% em PBS e agitado suavemente por 30 min, à temperatura ambiente, para a ligação da proteína de fusão à resina, por afinidade da porção GST com a glutathiona. A resina é coletada por centrifugação, por 3 min a 1 krpm e lavada por 5 vezes com 50ml de PBS. A proteína de fusão é clivada com trombina pela adição de 50 U de trombina para cada mililitro de resina utilizando, mais 950µl de PBS. A reação é incubada à temperatura ambiente por 14-16 h com agitação.

Depois a resina é sedimentada por centrifugação a 1krpm, por 5min. O antígeno recombinante purificado permanecia no sobrenadante e posteriormente a proteína é dosada pelo método de Bradford.

O processo de purificação foi monitorado por análise de todas as frações obtidas, por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. A maior parte da proteína de fusão se encontrava na fração solúvel do extrato, a partir da qual foi feita a purificação. Um rendimento de cerca de 2 mg de antígeno recombinante AgB8/2 pode ser obtido de um valor total de 880 ml de cultura de *E. coli* (Fig. 1). Para controle da reação de clivagem da proteína de fusão com trombina, após a conclusão do processo de purificação, é feita a eluição da resina com glutathiona reduzida, para liberação da GST. Verificou-se que apenas cerca de 10% da proteína não era clivada pela trombina. O antígeno recombinante é então armazenado em 50% de glicerol a -20° ou -70°C. Para ser utilizado no imunodiagnóstico da hidatidose humana através do método de ELISA, o antígeno recombinante AgB8/2 é diluído para concentração desejada.

REIVINDICAÇÃO

1. "PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE HIDATIDOSE", caracterizado por o antígeno AgB8/2, expressado como uma proteína de fusão com a GST de *Schistosoma japonicum*, utilizando um vetor da série pGEX, é purificado e então em volume de 80 ml de uma pré-cultura da cepa bacteriana contendo o plasmódio recombinante, cultivada em YT, suplementado com ampicilina a uma concentração final de 50µg/ml, por 14 a 16