



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

(21) **PI0806285-4 A2**

(22) Data de Depósito: 15/01/2008
(43) Data da Publicação: 11/01/2011
(RPI 2088)



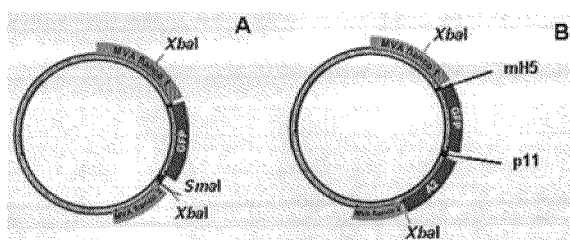
(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/30
C07K 14/44
C12N 7/01

(54) Título: **SEQUÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO ASP-2 DE TRYPANOSOMA CRUZI, PROTEÍNA RECOMBINANTE ASP-2 E VÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADOS QUE EXPRESSAM O ANTÍGENO ASP-2 RECOMBINANTE**

(73) Titular(es): Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

(72) Inventor(es): Alexandre de Magalhães Vieira Machado,
Ricardo Tostes Gazzinelli

(57) Resumo: SEQUÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO ASP-2 DE TRYPANOSOMA CRUZI, PROTEÍNA RECOMBINANTE ASP-2 E VÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADOS QUE EXPRESSAM O ANTÍGENO ASP-2 RECOMBINANTE. A presente invenção diz respeito à construção de uma sequência geneticamente modificada do antígeno ASP-2 de *Trypanosoma cruzi*, uma proteína recombinante codificada pela referida sequência e vírus geneticamente modificados que expressam o antígeno ASP-2 recombinante. A invenção é útil para a imunização de mamíferos contra doença de Chagas.





“SEQÜÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO ASP-2 DE TRYPANOSOMA CRUZI, PROTEÍNA RECOMBINANTE ASP-2 E VÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADOS QUE EXPRESSAM O ANTÍGENO ASP-2 RECOMBINANTE”

- 5 A presente invenção diz respeito à construção de uma seqüência geneticamente modificada do antígeno ASP-2 de *Trypanosoma cruzi*, uma proteína recombinante codificada pela referida seqüência e vírus geneticamente modificados que expressam o antígeno ASP-2 recombinante. A invenção é útil para a imunização de mamíferos contra doença de Chagas.
- 10 A infecção pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* causa a doença de Chagas, uma doença negligenciada que afeta mais de 16 milhões de habitantes na América Latina. Mais de 300.000 novos pacientes tornam-se infectados pelo *T. cruzi* anualmente, apesar do uso de fármacos ter diminuído sensivelmente os índices de mortalidade e morbidade associados a esta doença. Os fármacos utilizados para o
- 15 tratamento da doença de Chagas em indivíduos infectados cronicamente não são eficazes e parasitas naturalmente multiresistentes a quimioterapia já foram descritos em várias regiões da América Latina (URBINA. J.A. Specific treatment of Chagas disease: Current status and new developments. Curr. Opin. Infect. Dis. 14, 733-741. 2001).
- 20 A proteção imunológica contra esse parasita parece ser altamente dependente da indução das respostas das células T CD8+ e interferon gama (IFN-gama), similarmente ao encontrado para os estágios pré-eritrocíticos para espécies de *Plasmodium* ou para infecções causadas por *Toxoplasma gondii*. Células T CD4+ com perfil de secreção de citocinas de linfócitos T helper tipo 1 (Th1) e anticorpos tem sido
- 25 descritos como mediadores da proteção contra todas as doenças citadas anteriormente. Portanto, o desenvolvimento de uma vacina contra *T. cruzi* ajudaria na indução de ampla imunidade contra antígenos de parasitas (BRENER Z. and GAZZINELLI R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. Int. Arch. Allergy Immunol. 1997. 114,103-110).
- 30 Vários estudos focalizaram o desenvolvimento de uma vacina utilizando-se parasitas *T. cruzi* atenuados (MENEZES H. Active immunization of mice with the avirulent Y strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection of mice. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1968. 10, 1-4) ou mortos (BASOMBRIO M.A. *Trypanosoma cruzi*: Partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite
- 35 vaccine. Exp. Parasitol. 1990. 71,1-8). Infelizmente, a maioria das imunizações só foi

capaz de atrasar as manifestações da doença ou, na melhor das circunstâncias, diminuir a patologia associada. A proteção efetiva contra *T. cruzi* poderia ser alcançada quando forem utilizados adjuvantes que direcionam uma resposta Th1 (HOFT D.F. & EICKHOFF C.S. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. Infect. Immun. 2005. 73, 4934-4940) e/ou vacinas de subunidades de DNA que codificam certos antígenos do parasito (SEPULVEDA P., HONTEBEYRIE M., LIEGEARD P., MASCILLI A., NORRIS K.A. DNA-based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. 2000. 68, 4986-4991. SCHNAPP A.R., EICKHOFF C.S., SCHARFSTEIN J., HOFT D.F. Induction of B- and T-cell responses to cruzipain in the murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect. 2002. 4, 805-813. FRALISH B.H. & TARLETON R.L. Genetic immunization with LYT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. Vaccine. 2003. 21, 3070-3080).

Quando vacinas de DNA plasmidiais foram utilizadas, dois antígenos foram testados com sucesso: trans-sialidase (TS) e proteína-2 de superfície amastigota (ASP-2) (COSTA F., FRANCHIN G., PEREIRA-CHIOCCOLA V.L., RIBEIRAOM. M., SCHENKMAN S., RODRIGUES, M.M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Vaccine. 1998. 16, 768-774. FUJIMURA A.E., KINOSHITA S.S., PEREIRA-CHIOCCOLA V.L., RODRIGUES M.M. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. Infect. Immun. 2001. 69, 5477-5486. GARG. N. & TARLETON R.L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. 2002. 70, 5547-5555. BOSCARDIN S.B., KINOSHITA S.S., FUJIMURA A.E., RODRIGUES M.M. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. Infect. Immun. 2003. 71, 2744-2757. FRALISH B.H. & TARLETON R.L. Genetic immunization with LT1 or a pool of trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. Vaccine. 2003. 21, 3070-3080. VASCONCELOS J.R., HIYANE M.I., MARINHO C.R., CLASER C., MACHADO. A.M., GAZZINELLI R.T., BRUNA-ROMERO O., ALVAREZ J.M., BOSCARDIN S.B., RODRIGUES M.M. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse

strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. Hum. Gene Ther. 2004. 15, 878-886)

ASP-2 é um antígeno amastigota de superfície com uma função ainda desconhecida (LOW H.P., SANTOS M.A., WIZEL B. & TARLETON R.L. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. J. Immunol. 1998. 160, 1817-1823).

Vírus recombinantes têm se mostrado eficientes para o desenvolvimento de vacinas. Testes clínicos com candidatos de vacinas baseados em vírus recombinantes para malária, tuberculose e AIDS demonstram níveis sem precedentes de resposta imunológica celular contra os produtos recombinantes expressos pelos vírus, quando em comparação com formulações vacinais baseadas em proteínas recombinantes purificadas ou vacinas de DNA plasmidiais (ROCHA C., CAETANO B., MACHADO A., BRUNA-ROMERO O. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. Int. Microbiol. 2004. 7, 89-94).

Uma vantagem no uso de vírus recombinantes situa-se no fato de a própria partícula viral desempenhar um efeito adjunto por ela mesma, o que permite evitar o uso de outros compostos adjuvantes ou citocinas. Portanto, adenovírus recombinantes, vírus influenza, vírus vaccínia (MVA) destacam-se pela suas propriedades imuno-modulatórias (GUILLOT L., LE GOFFIC R., BLOCK S., ESCRIOU N., AKIRA S., CHIGNARD. M. SITAHAR M. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. J. Biol. Chem. 2003. 280, 5571-5580).

O mecanismo de ação das vacinas baseadas em adenovírus recombinantes consiste na infecção de células do hospedeiro, resultando na expressão dos antígenos heterólogos ao nível do citoplasma das células infectadas. O antígeno assim expresso poderá ainda ser secretado. Os adenovírus recombinantes são altamente imunogênicos, devido à sua capacidade em infectar células imunes especializadas na apresentação de antígenos, como as células dendríticas, por exemplo. Soma-se a isso, o efeito imuno-estimulador exercido por algumas proteínas do capsídeo viral, o que resulta na potencialização da resposta imune, bem como num melhor direcionamento do perfil de citocinas produzidas pelas células efectoras para um tipo Th1, o que é importante na proteção contra agentes parasitários como o *T. cruzi*.

A grande maioria das técnicas de construção de poxvírus recombinantes, entre os quais se inclui o vírus MVA (Vírus Vaccinia Ankara Modificado), envolve a recombinação homóloga de DNA em células infectadas. De uma forma geral, a

produção de vírus recombinantes emprega vetores plasmidiais de transferência contendo um cassete de expressão onde o gene exógeno é controlado por um promotor forte, normalmente precoce e tardio, dos poxvírus. Este cassete é flanqueado por seqüências de DNA homólogas à seqüências presentes no genoma do vírus, e servirão para dirigir a recombinação ao locus desejado.

Em nossas construções, os plasmídeos de transferência dirigem a inserção dos genes exógenos nos sítios denominados Região de Deleção II e/ou Região de Deleção III do genoma do vírus MVA. Estas são regiões genômicas cujos genes presentes foram alterados, removidos ou mutados durante o processo de geração do vírus, a cerca de 40 anos atrás. Desta forma, estas regiões ditas naturalmente modificadas (ou mutadas) são propícias para a inserção de cassetes de expressão de genes exógenos, uma vez que a inserção destes elementos não altera nenhuma função vital do vírus MVA. A taxa de recombinação é relativamente alta, em torno de 0,1%, e os vírus recombinantes podem ser selecionados, purificados em placa e amplificados.

A segurança do vetor vacinal baseado no MVA foi experimentalmente demonstrada quando macacos artificialmente imuno-suprimidos foram inoculados com altas doses do vírus (109 PFUs – uma quantidade 100 vezes superior à dose normalmente usada para imunização por poxvírus). Durante todo período de acompanhamento os animais não demonstraram nenhuma anormalidade hematológica ou patológica. Estas características não-replicativas do MVA fazem com que o vírus possa ser trabalhado em condições de Biossegurança de Nível 1, e também impedem que o vírus se espalhe para indivíduos não vacinados ou mesmo para o meio-ambiente. Apesar da extensa limitação replicativa em determinadas células tais como as de mamíferos, o MVA manteve todas as características tão peculiares que fazem dos Poxvírus atraentes vetores de expressão eucariota, incluindo-se sua enorme capacidade de acomodar DNA exógeno em seu genoma (até 25 Kb); controle viral preciso da expressão de proteínas codificadas por genes virais ou recombinantes; absoluta ausência de persistência viral ou integração no genoma do hospedeiro; e facilidade para a produção de vetores e vacinas recombinantes.

Na presente invenção, os plasmídeos de transferência consistem basicamente de cDNAs codificantes das proteínas de interesse vacinal clonados no plasmídeo pLW44 (Figura 1) ou similares. Ao seu lado, e em orientação oposta, está clonado o gene marcador que codifica a proteína fluorescente verde (GFP). A co-expressão desta proteína é usada para facilitar a seleção dos vírus recombinantes. Estes dois

genes são, por fim, flanqueados por seqüências de DNA do vírus MVA homólogas ao sítio de inclusão no genoma do vetor viral, denominado Região de Deleção III.

Na figura 2, no sentido 5' - 3', o cassete de inserção consiste de: Seqüência nucleotídica homóloga à porção 5' da Região de Deleção II e/ou Região de Deleção III do genoma de MVA ⁽¹⁾; Promotor modificado precoce/tardio do vírus Vaccínia ⁽²⁾; gene codificador de proteína marcadora – Proteína Verde Fluorescente (GFP) ou proteína vermelha Fluorescente (RFP) ⁽³⁾; sítio de clonagem para o cDNA/Gene exógeno de interesse ⁽⁴⁾, Promotor modificado precoce/tardio do vírus Vaccínia ⁽⁵⁾; nucleotídica homóloga à porção 3' da Região de Deleção II e/ou Região de Deleção III do genoma de MVA ⁽⁶⁾. Embora tanto as regiões de Deleção II e III do vírus MVA possam ser igualmente utilizadas para a inserção de cassetes de expressão de genes exógenos, as construções descritas nesta patente foram criadas a partir da inserção de diferentes cassetes de expressão apenas na região de Deleção III, ficando a inserção na região II como uma alternativa metodológica factível, a ser usada oportunamente.

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

EXEMPLO 01: Construção dos Plasmídeos de Transferência

A construção dos plasmídeos de transferência contendo o cDNA que codifica o segmento selvagem da neuraminidase (NA) do vírus WSN contém o segmento da NA clonado em orientação negativa no plasmídeo de transferência pPR7 entre a seqüência truncada do promotor da polimerase I humana (pol I) e a seqüência da ribozima do vírus da hepatite δ . Este tipo de construção permite a síntese de uma molécula de vRNA sintética nas células transfectadas. O plasmídeo pPRNA38 foi construído a partir do plasmídeo pPRNA35. Ele codifica um segmento recombinante da NA, na qual a ORF da NA é seguida pela duplicação da região promotora 3', um sítio de clonagem *XhoI* / *NheI*, uma duplicação dos últimos 42 nucleotídeos da ORF da NA e a região promotora 5' original (Figura 03).

O plasmídeo de transferência pPRNA38-dTS foi construído para a expressão de um fragmento de 660 nucleotídeos do gene da TS, o qual contém os epítomos reconhecidos por linfócitos B, T CD4+ e CD8+. Resumidamente, para a construção do plasmídeo pPRNA38-TS, o fragmento da TS foi obtido por PCR utilizando os oligonucleotídeos senso GGG CTC GAG CAT GGG GAA AAC AGT CGT TGG e anti-

senso GGG GCT AGC TAA ATG GAT ACT TGC CCA ACG TTA TAA ATA CCG CCA
AGA AAT TGA TTT GT. Este último contém a sequência que codifica para os epitopos
da TS reconhecidos pelos linfócitos T CD8+. O produto de amplificação obtido foi
purificado e posteriormente clonado no plasmídeo pPRNA38, entre os sítios *Xho*I e
5 *Nhe*I.

EXEMPLO 02: Produção dos vírus Influenza recombinantes por genética reversa

A estratégia de expressão utilizada pelos pesquisadores da presente invenção
foi baseada nos estudos de Flick e Hobom, os quais demonstraram que o complexo
10 polimerase do vírus influenza é capaz de reconhecer os promotores 3' e 5' mesmo
quando estes se localizam no interior de um pseudo-segmento viral. Desta forma, os
pesquisadores da presente invenção exploraram essas observações para construir
vírus influenza recombinantes, carregando de maneira estável um segmento
bicistrônico da NA, na qual uma sequência heteróloga se encontra sob o controle de
15 uma região promotora 3' duplicada. Tais segmentos bicistrônicos podem ser transcritos
e replicados de duas maneiras distintas, após a interação da região promotora 5' com
cada uma das duas regiões promotoras 3'. Neste tipo de construção, a região
codificadora da NA se encontra na posição 3' proximal e a sequência heteróloga está
localizada próxima à extremidade 5'. Dessa forma, uma vez que a expressão da
20 proteína NA é essencial para a viabilidade viral, nós asseguramos que um segmento
bicistrônico completo, foi mantido ao longo da propagação dos vírus recombinantes.
Os vírus influenza foram obtidos por genética reversa de acordo com a técnica
descrita previamente por Fodor e colaboradores (Figura 04).

Resumidamente, monocamadas sub-confluentes de células co-culturas de
25 células MDCK e HEK 293T, cultivadas em meio mínimo modificado por Dulbecco
(DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) foram transfectadas pelos
plasmídeos codificando o segmento selvagem ou recombinantes da NA, bem como os
plasmídeos que codificam os demais 7 segmentos do vírus influenza, juntamente com
os plasmídeos que codificam as quatro proteínas do complexo de replicação do vírus
30 influenza (pcDNA-PB1, pcDNA-PB2, pcDNA-PA e pcDNA-NP), utilizando o reagente
de transfecção Fugene 6 (Roche) (Figura 05).

Desta forma, oito complexos ribonucleoprotéicos foram reconstituídos *in vivo*
permitindo a transcrição e a replicação de todos os segmentos virais e a síntese de
novos vírions. Após 24 horas de incubação a 35°C, as células transfectadas foram
35 incubadas durante mais dois dias em DMEM suplementado 2% SFB. Os vírus

recombinantes assim obtidos foram amplificados uma vez em células MDCK e purificados duas vezes por placas de lise em células MDCK, antes de serem submetidos a uma amplificação final em células MDCK. Os estoques virais terão seus títulos infecciosos determinados em células MDCK pelo método de placas de lise sob uma camada de agarose em meio DMEM com 2% de SFB. A presença da sequência heteróloga no genoma viral foi analisada pelas técnicas de PCR e seqüenciamento.

EXEMPLO 03: Obtenção e caracterização de vírus influenza recombinantes carreando uma seqüência heteróloga.

Os vírus carreando um fragmento da proteína TS (vNA38-TS), a porção n-terminal (vNA38-ASP2-PTN1) ou medial (vNA38-ASP2-PTN2) da proteína ASP-2 do *Trypanosoma cruzi* foram obtidos pela técnica de obtenção de vírus recombinantes inteiramente a partir de plasmídeos (conforme descrito na figura 01). Os resultados ilustrados na Figura 06 representam os vírus vNA38-ASP2-PTN1 e vNA38-ASP2-PTN2 após clonagem e amplificação complementar em células MDCK. Os genomas dos vírus portadores dos segmentos bicistrônicos acima mencionados foram analisados por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos que permitem analisar a região de inserção da seqüência heteróloga. Fragmentos de amplificação do tamanho esperado foram obtidos foram observados (dados não mostrados), indicando que os mesmos haviam conservado a seqüência heteróloga nos seus genomas.

EXEMPLO 04: Produção de um fragmento da proteína heteróloga TS em células MDCK infectadas pelos vírus influenza recombinantes.

Monocamadas confluentes foram infectadas com 2 m.o.i. do vírus selvagem vNA ou do dois clones vírus recombinante vNA38-TS. 24 horas após as infecções, extratos celulares foram preparados e a proteína TS foi analisada por *western blot*. Conforme apresentado na Figura 05, níveis significativos das proteínas TS puderam ser detectados nas células MDCK, demonstrando a capacidades dos vírus influenza recombinantes em expressar essas seqüências heterólogas.

EXEMPLO 05: Produção dos Vírus Parentais e Recombinantes em cultivo celular.

A multiplicação dos vetores virais parentais (MVA) ou recombinantes deve ser feita em células fibroblásticas de embriões de galinha (CEF), produzidos através do cultivo primário de embriões de cerca de 10 dias de postura. Brevemente, os embriões são dissecados em condições estéreis para retirada dos órgãos internos. Em seguida as células são dispersas mecanicamente, através de passagem em seringas, e também quimicamente, através da incubação com tripsina. As células são lavadas

para remoção de hemácias e outros contaminantes, e em seguida são suspensas e sedimentadas em frascos plásticos contendo meio E-MEM ou DMEM suplementados com 10% de soro fetal bovino. A construção dos vetores poxvirais se baseia na recombinação homóloga dos vírus em células infectadas na presença de plasmídeos de transferência contendo os DNAs codificadores dos antígenos-alvo.

Em seguida, os recombinantes são gerados através da transfecção dos plasmídeos de transferência em células de embrião de galinha (CEF) previamente infectadas pelo vírus MVA. Resumidamente, CEFs são infectados com MOI de 0,1 a 1 dos vírus MVA parentais. Após uma hora de adsorção, adiciona-se às células infectadas uma solução contendo 2 µg do plasmídeo de transferência e 5µl do agente transfectante Lipofectamina (Invitrogen, EUA). As células são incubadas por 5 horas, quando o meio de transfecção é removido e substituído por meio de cultivo suplementado com 2,5% de soro fetal bovino. As células são então incubadas por mais 48 horas e coletadas ao final do período. Os vírus recombinantes são selecionados e purificados em ciclos sucessivos de purificação de placa, através da visualização em microscópio da presença da proteína marcadora GFP (fluorescência verde). Cabe ressaltar que, através da maneira como o vetor de transferência foi elaborado, somente vírus recombinantes contendo o cassete de expressão do gene exógeno deverão expressar também a proteína GFP. Após os ciclos de purificação dos clones recombinantes, estes têm seus títulos amplificados em ciclos sucessivos de infecção de número crescente de células. Quando títulos da ordem de 10⁹ PFUs/ml são alcançados, as suspensões virais são purificadas em colchão de sacarose e homogeneizadas em Tris-HCl 10mM, sendo aliquotados e estocados a -70°C.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: A) Plasmídeo pLW44, vetor de transferência para construção dos vírus MVA recombinantes. O Sítio de clonagem do gene codificador da proteína de interesse é clonado entre os sítios de restrição para as enzimas SmaI e XbaI. O gene codificador da proteína GFP está representado. Os promotores não estão representados. B) Exemplo de plasmídeo pronto para utilização, onde o gene codificador da proteína A2, por exemplo, de *Leishmania*, foi inserido.

Figura 02 – (A) Plasmídeo de transferência para construção dos vírus MVA recombinantes. B) Detalhe do cassete de inserção e expressão contendo os seguintes elementos gênicos: Sequência nucleotídica homóloga à porção 5' da Região de Deleção II e/ou Região de Deleção III do genoma de MVA (1); Promotor modificado

5 precoce/tardio do vírus Vaccinia (2); gene codificador de proteína marcadora – Proteína Verde Fluorescente (GFP) ou proteína vermelha Fluorescente (RFP) (3); sítio de clonagem para o cDNA/Gene exógeno de interesse (4), Promotor modificado precoce/tardio do vírus Vaccinia (5); nucleotídica homóloga à porção 3'da Região de Deleção II e/ou Região de Deleção III do genoma de MVA (6) .

Figura 03: Representação esquemática dos plasmídeos de transferência para síntese dos segmentos bicistronicos da NA derivados do vírus influenza A/WSN/33. O plasmídeo pPR-NA35 é derivado do plasmídeo pPR-NA, o qual contém o cDNA do segmento completo da NA em orientação negativa sob o controle do promotor truncado da polimerase I humana. Ele contém o cDNA do segmento recombinante da NA em orientação negativa, no qual a ORF da NA é seguida pela duplicação do promotor 3', um sítio de clonagem XhoI/NheI e o promotor 5'original. O plasmídeo pPR-NA38 é derivado do plasmídeo pPR-NA35. Ele foi construído para conservar a integridade da extremidade 5' ao longo dos seus últimos 70 nucleotídeos. Isto foi obtido pela inserção de uma duplicação dos últimos 42 nucleotídeos da ORF da NA (quadrado branco) os quais foram inseridos entre o promotor 5' e o "linker" XhoI/NheI. pb: pares de base, SMC: sítio múltiplo de clonagem.

Figura 04: Genética reversa do segmento que codifica a neuraminidase do vírus A/WSN/33 sem vírus auxiliar (Plasmid only). Alternativamente, os vírus recombinantes poderão ser obtidos por genética reversa. Assim, células HEK 293T (7x10⁵ células em placas de 35 mm², respectivamente) serão co-transfectadas com o plasmídeo que codifica o segmento da NA selvagem ou recombinante (500 ng), por cada um dos plasmídeos que codificam os demais segmentos do vírus influenza (500 ng de cada plasmídeo); e pelos plasmídeos que permitem a expressão das proteínas do complexo polimerase (PA, PB1 e PB2: 500 ng de cada) e da nucleoproteína NP (500 ng) em 10 µl de Fugene 6 (Roche), permitindo a reconstituição de 8 complexos ribonucleoprotéicos funcionais in vivo e desta forma, a transcrição e a replicação dos segmentos virais. Os sobrenadantes serão coletados 72 horas após a transfecção. Após uma etapa de amplificação em células MDCK, os vírus transfectantes serão clonados e posteriormente amplificados em células MDCK. * 4 plasmídeos de expressão das proteínas do complexo polimerase PA, PB1 e PB2 e da nucleoproteína NP. ** 8 plasmídeos de transferência dos segmentos do vírus influenza selvagem o recombinantes. *** vírus recombinantes.

Figura 05: Os vírus recombinantes foram obtidos por genética reversa sem vírus auxiliar. Resumidamente, células HEK 293T (7x10⁵ células em placas de 35

mm2, respectivamente) foram co-transfectadas com o plasmídeo pPRNA38-TS (500 ng), por cada um dos plasmídeos que codificam os demais segmentos do vírus influenza (500 ng de cada plasmídeo); e pelos plasmídeos que permitem a expressão das proteínas do complexo polimerase (PA, PB1 e PB2: 500 ng de cada) e da nucleoproteína NP (500 ng) em 10 µl de Eugene 6 (Roche). Os sobrenadantes das células foram coletados 72 horas após a transfecção. Os vírus foram submetidos a uma etapa de amplificação em células MDCK, clonados por placa de lise e submetidos a uma amplificação complementar em células MDCK. Os resultados aqui representados ilustram os fenótipos de 2 clones virais independentes de cada um dos vírus recombinantes.

LISTA DE SEQUÊNCIA

SEQ. ID N. 01 - Fragmento ASP

Fragmento ASP2-PTN1

1 ATG GGA ATG CAG GTG CAG ATC CAG AGC CTG TTT CTG CTC CTC CTG TGG GTG CCC GGG TCC. 60
 Met Gly Met Gln Val Gln Ile Gln Ser Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser
 61 AGA GGA GGT ACC GCC GCT GTG GAG AGT AAG TCC GGG GAT GCG CCG CTG CCT CAA TGG GTC 120
 Arg Gly Gly Thr Ala Ala Val Glu Ser Lys Ser Gly Asp Ala Pro Leu Pro Gln Trp Val
 121 GAT ATT TTT GTG CCG GAA AAG ACG CAG GTG CTG CCC AAA GAG GGG TCT AAA AGT GGA GTG 180
 Asp Ile Phe Val Pro Gly Lys Thr Gln Val Leu Pro Lys Glu Gly Ser Lys Ser Gly Val
 181 AAG AAA GCA TTT GCT GCG CCT TCT CTC GTC AGT GCT GGT GGA GTA ATG GTT GCC TTT GCT 240
 Lys Lys Ala Phe Ala Ala Pro Ser Leu Val Ser Ala Gly Gly Val Met Val Ala Phe Ala
 241 GAA AGC TTG TTC GTT TAT ATC GTC CAT GAA CAT AAC TTG TTT GGG ATT AAG CCT TAC GAA 300
 Glu Ser Leu Phe Val Tyr Ile Val His Gly His Asn Leu Phe Gly Ile Lys Pro Tyr Glu
 301 ATT GTG GCC GGG TAC ATC AAG GCT GCG GAA TCG TGG CCG TCC ATT GTC GCT GAG GTC AAT 360
 Ile Val Ala Gly Tyr Ile Lys Ala Ala Glu Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Glu Val Asn
 461 GCT ACT ACA TGG AGG ACA CAC ACC GTT ATT GGC AGT AGG AAT GGC AAT GAT CGT TTG TGT 420
 Ala Thr Thr Trp Arg Thr His Thr Val Ile Gly Ser Arg Asn Gly Asn Asp Arg Leu Cys
 421 TAT TTG CAA CGG CCC ACA GCA GTT GCA AGG GAC AGT AAG GTG TTT CTA CTT GTG GGA AGC 480
 Tyr Leu Gln Arg Pro Thr Ala Val Ala Arg Asp Ser Lys Val Phe Leu Leu Val Gly Ser
 481 GAT ACT ACA AGA TAT GAC AGC GAT GAT AAT ATG TGG GTG AAA GAT GGC TGG GAT ATT CAA 540
 Asp Thr Thr Arg Tyr Asp Ser Asp Asp Asn Met Trp Val Lys Asp Gly Trp Asp Ile Gln
 541 CTG GTT GAG GGT GTG GCC ACG CAG TCC AAG GAC GGC GTG CAG AGT AAA CTG GTC AGC TGG 600
 Leu Val Glu Gly Val Ala Thr Gln Ser Lys Asp Gly Val Gln Ser Lys Leu Val Ser Trp
 601 GGT GAA CCC AAG TCG CTT TTA AAA CAG ATA CTC AAT CAC ACT CAA GAT CAG CTG AGG TAG 660
 Gly Glu Pro Lys Ser Leu Leu Lys Gln Ile Leu Asn His Thr Gln Asp Gln Leu Arg STOP

Fragmento ASP2-PTN2

1 ATG GGA ATG CAG GTG CAG ATC CAG AGC CTG TTT CTG CTC CTC CTG TGG GTG CCC GGG TCC 60
 Met Gly Met Gln Val Gln Ile Gln Ser Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser
 61 AGA GGA GGT ACC GAT GTT GTG ACT GCT GGT GGT TCA GGC ATT GTG ATG CAG AAT GAC ACG 120
 Arg Gly Gly Thr Asp Val Val Thr Ala Gly Gly Ser Gly Ile Val Met Gln Asn Asp Thr
 121 CTT GTG TTT CCT CTG ATG GTG AAT GGG CAA AAT TAC CCT TTT TCC TCG ATC ACT TAC TCG 180
 Leu Val Phe Pro Leu Met Val Asp Gly Gln Asn Tyr Pro Phe Ser Ser Ile Thr Tyr Ser
 181 ACG GAC AAA GGC AAT ACC TGG GTG TTC CCA GAG GGC ATT TCT CCT GTA GGA TGC CTT GAT 240
 Thr Asp Lys Gly Asn Thr Trp Val Phe Pro Glu Gly Ile Ser Pro Val Gly Cys Leu Asp
 241 CCC CGC ATC ACC GAA TGG GAG ACG GGA CAA ATT CTC ATG ATC GTT CAG TGT AAA GAT GAC 300
 Pro Arg Ile Thr Glu Trp Glu Thr Gly Gln Ile Leu Met Ile Val Gln Cys Lys Asp Asp
 301 CAG AGT GTG TTC GAG TCG CGT GAC ATG GGG AAA ACG TGG ACG GAG GCT ATC GGG ACA CTC 360
 Gln Ser Val Phe Glu Ser Arg Asp Met Gly Lys Thr Trp Thr Glu Ala Ile Gly Thr Leu
 361 TCA GGC GTG TGG GTC ATG TCA CAA CCA GGA GTT CGT CTA TAC AAA ATT TTT CGT GTG GGA 420
 Ser Gly Val Trp Val Met Ser Gln Pro Gly Val Arg Leu Tyr Lys Ile Phe Arg Val Gly
 421 GCC CTC ATC ACC GCC ACC ATT GAG GGA AGG AAG GTC ATG CTT TAC ACT CAG AGA GGG TAC 480
 Ala Leu Ile Thr Ala Thr Ile Glu Gly Arg Lys Val Met Leu Tyr Thr Gln Arg Gly Tyr
 481 ACC TCG GGG GAG AAA GAG GCC ACT GCA CTC TAC CTT TGG GTC ACG GAC AAC AAC CGC ACG 540
 Thr Ser Gly Glu Lys Glu Ala Thr Ala Leu Tyr Leu Trp Val Thr Asp Asn Asn Arg Thr
 541 TTT CAT GTT GGA CCG CTT TTT TTG GAG GAT AAT GTG AAT GAG ACG CTT GCC AAC GCC CTA 600
 Phe His Val Gly Pro Leu Phe Leu Glu Asp Asn Val Asn Glu Thr Leu Ala Asn Ala Leu
 601 CTG TAC TCG GAT GGT GCG TTG CAC CTT TTA AAG GAG AGG GCC AAT GAA AAA GAC GAG TAG 660
 Leu Tyr Ser Asp Gly Gly Leu His Leu Leu Lys Glu Arg Ala Asn Glu Lys Asp Asp STOP

REIVINDICAÇÕES

1. "SEQÜÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO ASP-2 DE TRYPANOSOMA CRUZI caracterizada pela seqüência de nucleotídeos compreender a Seq. ID no(1).

5 **2. PROTEÍNA RECOMBINANTE ASP-2** caracterizada pela seqüência de aminoácidos compreender a Seq. ID no(1).

3. VÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADO QUE EXPRESSA O ANTÍGENO ASP-2 RECOMBINANTE caracterizado por compreender a Seq. ID no(1).

10 **4. VÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADO QUE EXPRESSA O ANTÍGENO ASP-2 RECOMBINANTE**, de acordo com a reivindicação 03, caracterizado pelo vírus ser um vírus influenza.

5. VÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADO QUE EXPRESSA O ANTÍGENO ASP-2 RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 03, caracterizado pelo vírus ser um vírus Ankara modificado (MVA).

FIGURA 01:

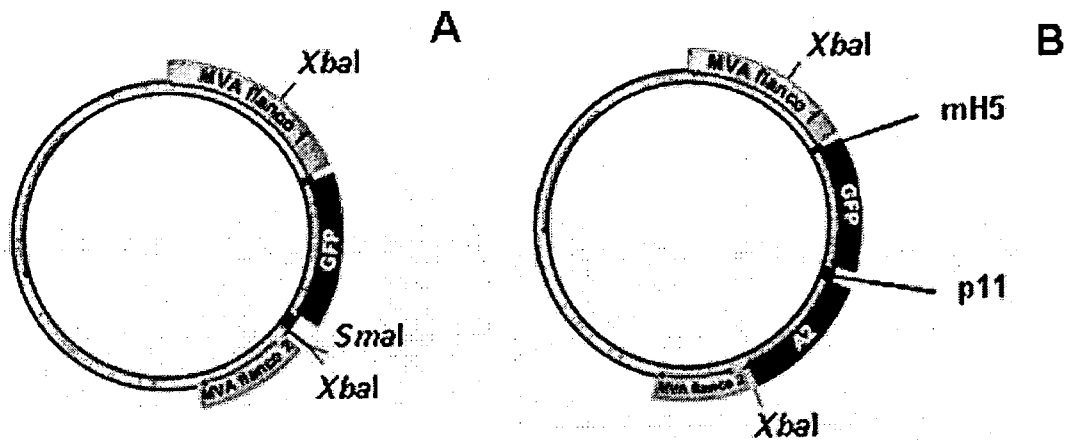


FIGURA 02:

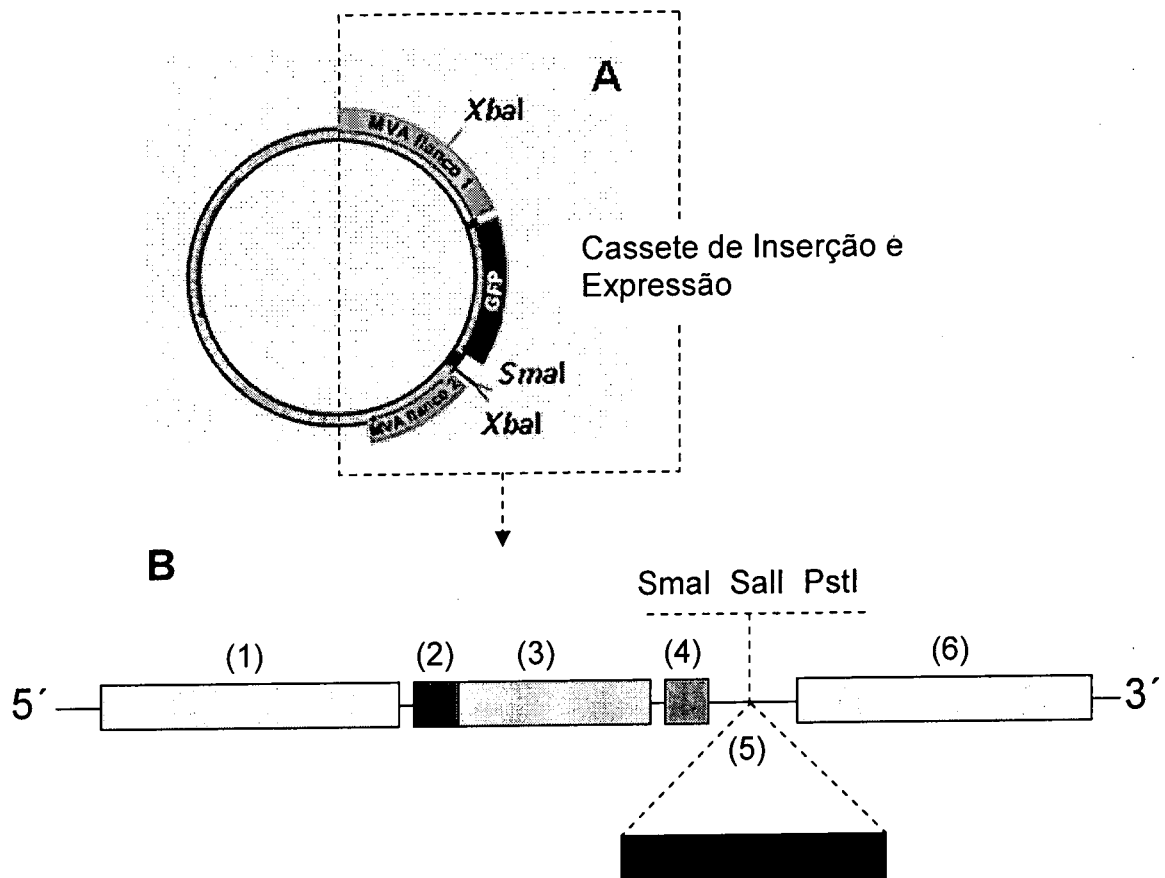


FIGURA 03:

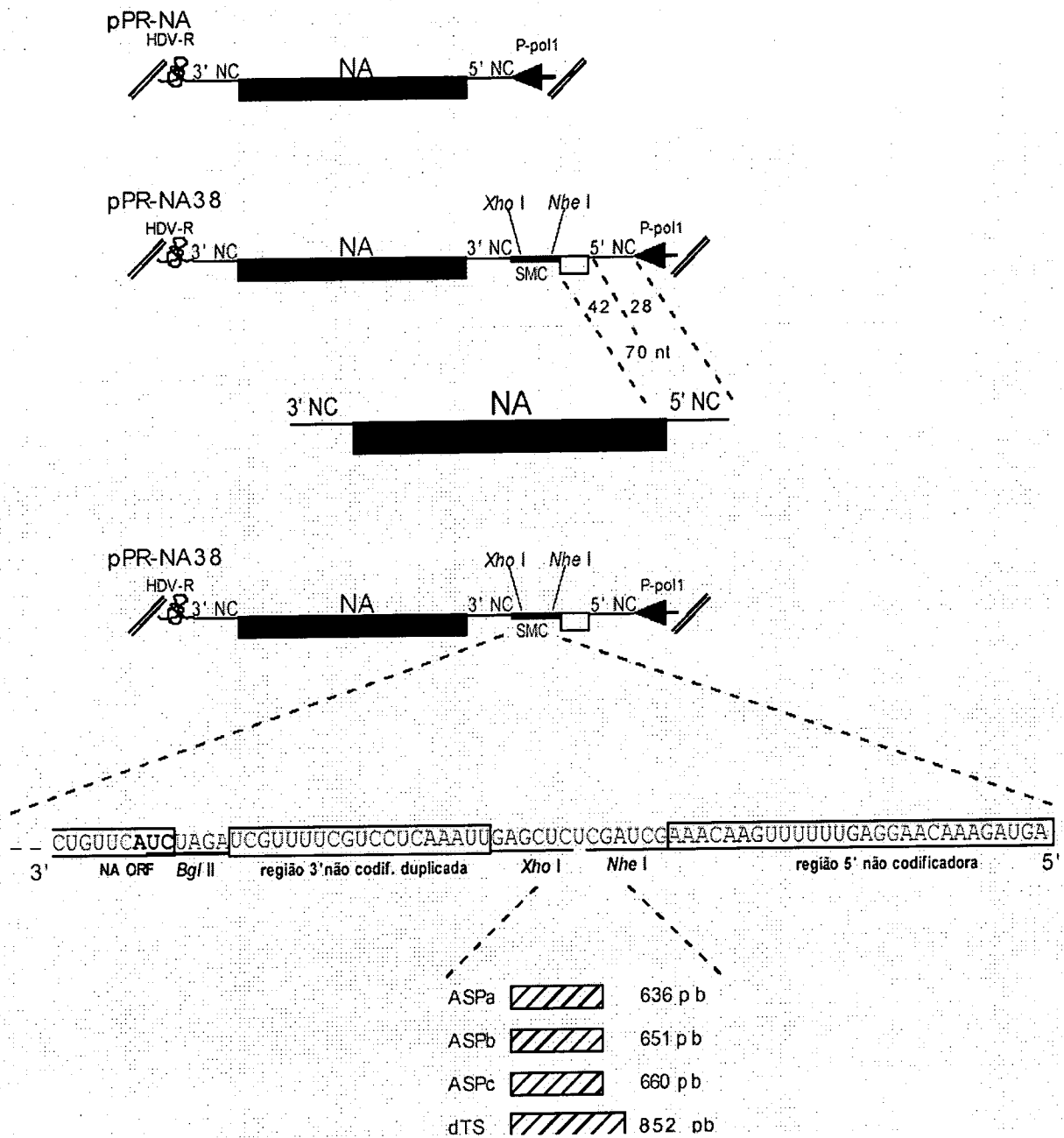


FIGURA 04:

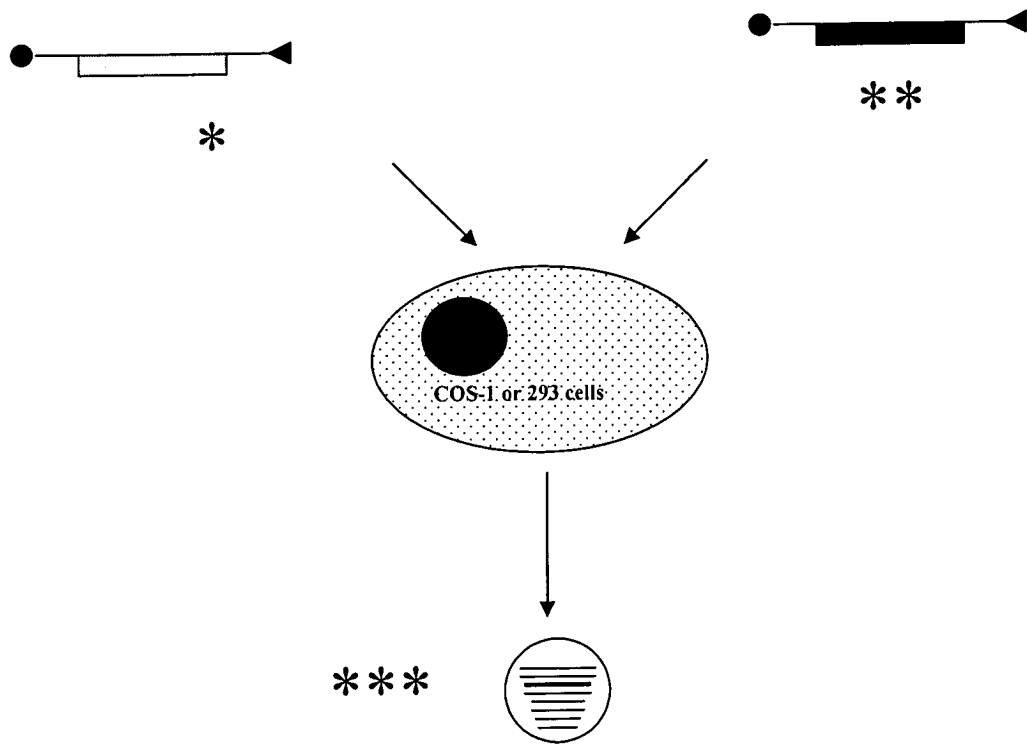
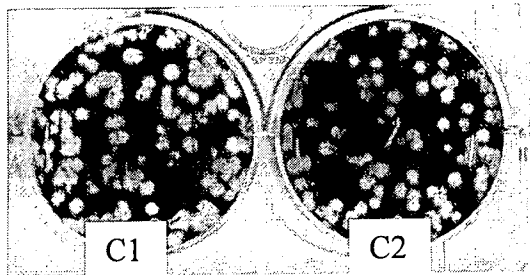
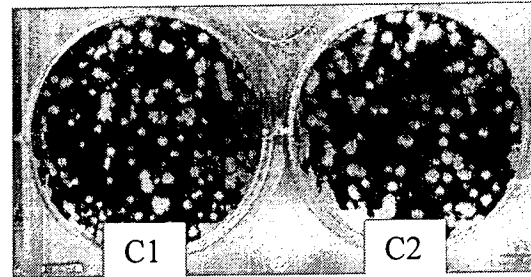


FIGURA 05:

vNA38-ASP-PTN2



vNA38-ASP-PTN1



RESUMO

**“SEQÜÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO ASP-2 DE
TRYPANOSOMA CRUZI, PROTEÍNA RECOMBINANTE ASP-2 E VÍRUS
GENETICAMENTE MODIFICADOS QUE EXPRESSAM O ANTÍGENO ASP-2
5 RECOMBINANTE”**

A presente invenção diz respeito à construção de uma seqüência
geneticamente modificada do antígeno ASP-2 de *Trypanosoma cruzi*, uma proteína
recombinante codificada pela referida seqüência e vírus geneticamente modificados
que expressam o antígeno ASP-2 recombinante. A invenção é útil para a imunização
10 de mamíferos contra doença de Chagas.