



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

(21) **PI0801906-1 A2**

(22) Data de Depósito: 15/01/2008
(43) Data da Publicação: 01/02/2011
(RPI 2091)



★ B R P I 0 8 0 1 9 0 6 A 2 ★

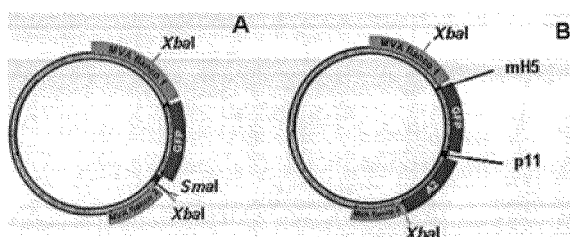
(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/44
C12N 7/01
A61K 39/05

(54) Título: **SEQÜÊNCIA GENETICAMENTE MODIFICADA DO ANTÍGENO TS DE TRYPANOSOMA CRUZI, PROTEÍNA RECOMBINANTE TS E VÍRUS GENETICAMENTE MODIFICADOS QUE EXPRESSAM O ANTÍGENO TS RECOMBINANTE**

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

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

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





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

- 5 A presente invenção diz respeito à construção de uma seqüência geneticamente modificada do antígeno TS de *Trypanosoma cruzi*, uma proteína recombinante codificada pela referida seqüência e vírus geneticamente modificados que expressam o antígeno TS 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 (BASOMBRIIO 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 fossem utilizados adjuvantes que direcionassem 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 codificassem 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 LY1 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)

TS é um antígeno expresso na fase tripomastigota que catalisa a transferência de ácidos siálicos de glicoconjugados do hospedeiro para o acceptor de moléculas na membrana plasmática do parasito (SCHENKMAN S., EICHINGER D., PEREIRA M.E., NUSSEN-ZWEIG V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. Annu. Rev. Microbiol. 1994. 48, 499-523).

Os 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
5 flanqueado por seqüências de DNA homólogas a 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
35 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
 5 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 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
 10 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
 15 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.

20

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
 25 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
 30 sítio de clonagem *Xho*I / *Nhe*I, 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
 35 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 epítomos 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 *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 demonstraram que o complexo 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 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 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 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 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 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.

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

Os vírus carreando um fragmento da proteína TS (vNA38-TS) de *Trypanosoma cruzi* foram obtidos pela técnica de obtenção de vírus recombinantes inteiramente a partir de plasmídeos (conforme descrito na figura 01). 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.

20 **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.

30 **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 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 Eugene 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 recombina

5 recombina

Figura 05: Produção das proteínas TS em células MDCK infectadas com vírus influenza recombina

Monocamadas confluentes de células MDCK foram infectadas com uma m.o.i superior a 1 dos vírus influenza recombina

10 ou pelo vírus selvagem vNA. 48 horas após a infecção, extratos das células MDCK foram preparados em tampão de amostra para gel de proteína SDS. Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com um pool de soros de camundongos imunizados com as proteínas recombina

15 TS. Os anticorpos ligados às membranas foram detectados pela incubação das membranas de imunoblot com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase. A reação de quimioluminescência foi visualizada com o reagente amplificador de quimioluminescência, seguido de exposição em filme fotográfico.

Figura 06: Genética reversa para obtenção de um vírus influenza que codifica para um fragmento da trans-sialidase (TS) de *T. cruzi*. Os vírus recombina

20 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

25 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). 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

30 de lise e submetidos a uma amplificação complementar em células MDCK. Os resultados aqui representados ilustram os fenótipo de 2 clones virais independentes de cada um dos vírus recombina

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

SEQ. ID N. 01 - Fragmento TS

1 ATG GGG AAA ACA GTC GTT GGG GCC AGT AGG ATG TTC TGG CTA ATG 45
 Met Gly Lys Thr Val Val Gly Ala Ser Arg Met Phe Trp Leu Met
 46 TTT TTC GTG CCG CTT CTT CTT GCG CTC TGC CCC AGC GAG CCC GCG 90
 Phe Phe Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Cys Pro Ser Glu Pro Ala
 91 CAT GCC CTG GCA CCC GGA TCG AGC CGA GTT GAG CTG TTT AAG CGG 135
 His Ala Leu Ala Pro Gly Ser Ser Arg Val Glu Leu Phe Lys Arg
 136 CAA AGC TCG AAG GTG CCA TTT GAA AAG GGC GGC AAA GTC ACC GAG 180
 Gln Ser Ser Lys Val Pro Phe Glu Lys Gly Gly Lys Val Thr Glu
 181 CGG GTT GTC CAC TCG TTC CGC CTC CCC GCC CTT GTT AAT GTG GAC 225
 Arg Val Val His Ser Phe Arg Leu Pro Ala Leu Val Asn Val Asp
 226 GGG GTG ATG GTT GCC ATC GCG GAC GCT CGC TAC GAA ACA TCC AAT 270
 Gly Val Met Val Ala Ile Ala Asp Gly Arg Tyr Glu Thr Ser Asn
 271 GAC AAC TCC CTC ATT GAT ACG GTG GCG AAG TAC AGC GTG GAC GAT 315
 Asp Asn Ser Leu Ile Asp Thr Val Ala Lys Tyr Ser Val Asp Asp
 316 GGG GAG ACG TGG GAG ACC CAA ATT GCC ATC AAG AAC AGT CGT GCA 360
 Gly Glu Thr Trp Glu Thr Gln Ile Ala Ile Lys Asn Ser Arg Ala
 361 TCG TCT GTT TCT CGT GTG GTG GAT CCC ACA GTG ATT GTG AAG GGC 405
 Ser Ser Val Ser Arg Val Val Asp Pro Thr Val Ile Val Lys Gly
 406 AAC AAG CTT TAC GTC CTG GTT GGA AGC TAC AAC AGT TCG AGG AGC 450
 Asn Lys Leu Tyr Val Leu Val Gly Ser Tyr Asn Ser Cys Arg Ser
 451 TAC TGG ACG TCG CAT GGT GAT GCG AGA GAC TGG GAT ATT CTG CTT 495
 Tyr Trp Thr Ser His Gly Asp Ala Arg Asp Trp Asp Ile Leu Leu
 496 GCC GTT GGT GAG GTC ACG AAG TCC ACT GCG GGC GGC AAG ATA ACT 540
 Ala Val Gly Glu Asp Thr Lys Ser Thr Ala Gly Gly Lys Ile Thr
 541 GCG AGT ATC AAA TGG GGG AGC CCC GTG TCA CTG AAG GAA TTT TTC 585
 Ala Ser Ile Lys Trp Gly Ser Pro Val Ser Leu Lys Glu Phe Phe
 586 CCG GCG GAA ATG GAA GGA ATG CAC ACA AAT CAA TTT CTT GGC GGT 630
 Pro Ala Glu Met Glu Glu Met His Thr Asn Gln Phe Leu Gly Gly
 631 ATT TAT AAC GTT GGG CAA GTA TCC ATT TAG 660
 Ile Tyr Asn Val Gly Gln Val Ser Ile STOP

REIVINDICAÇÕES

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

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

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

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

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

FIGURA 01

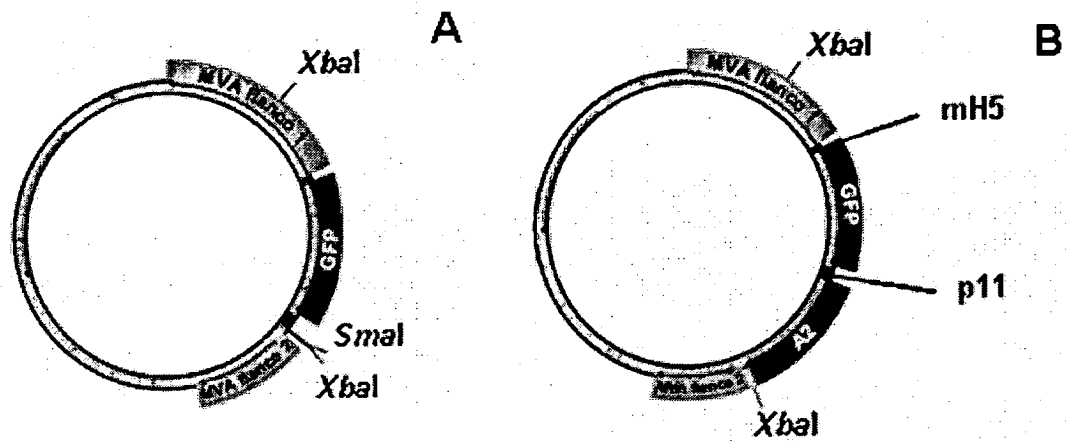


FIGURA 02

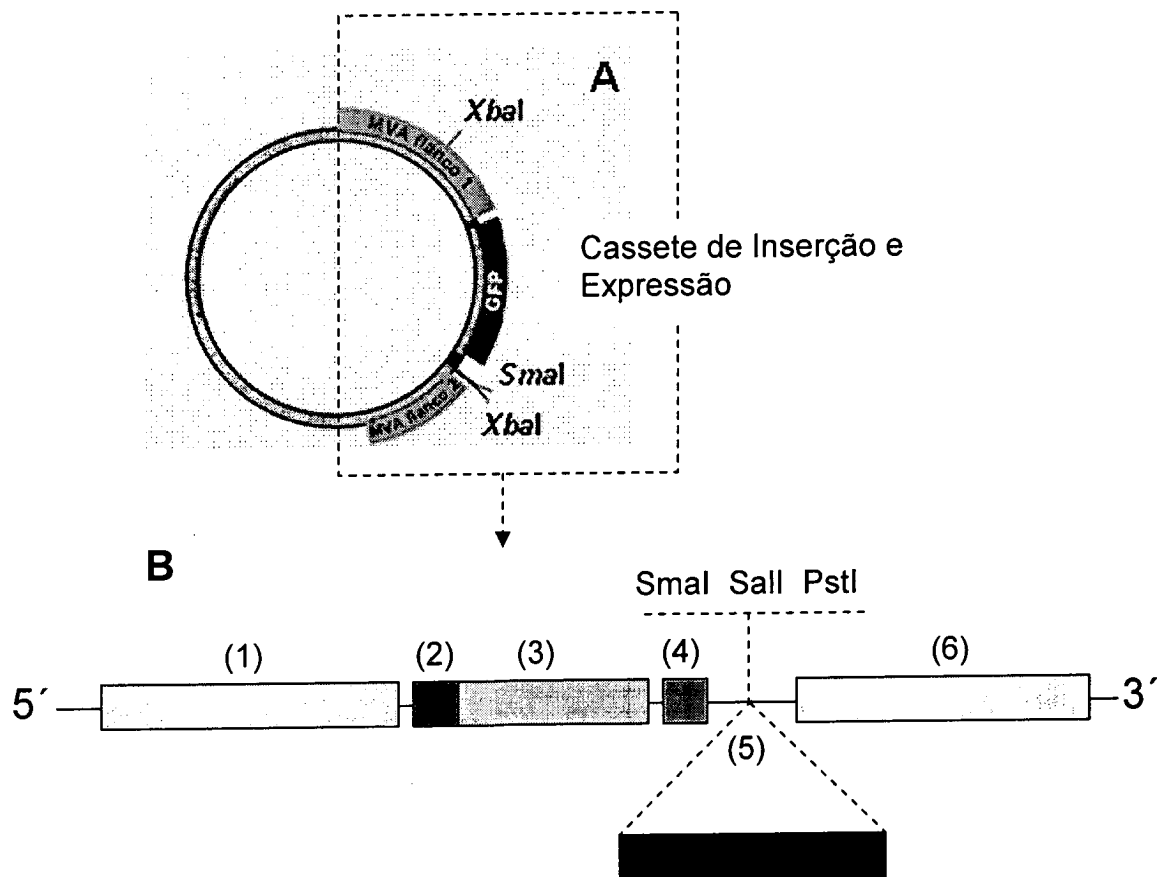


FIGURA 03

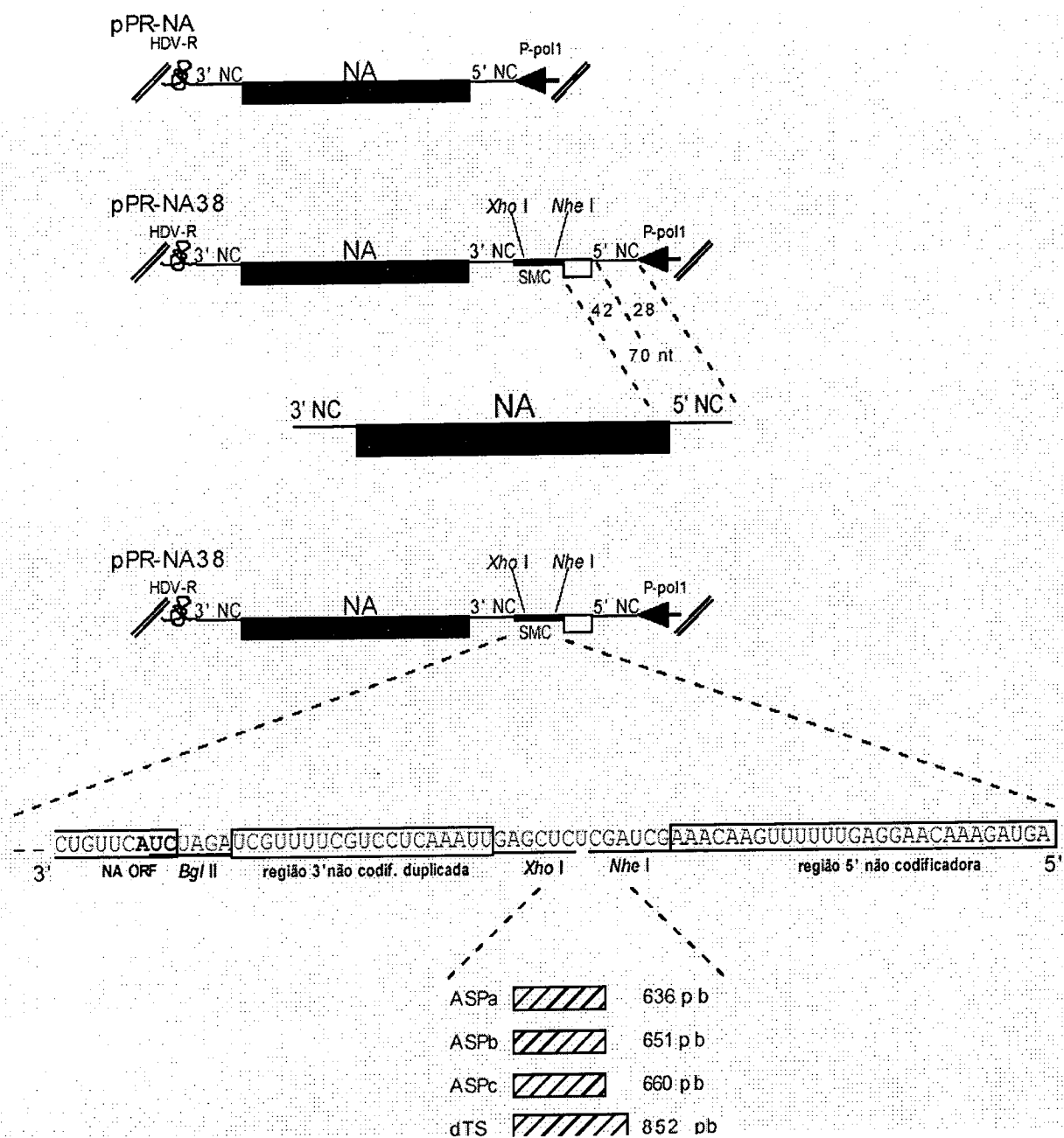


FIGURA 04

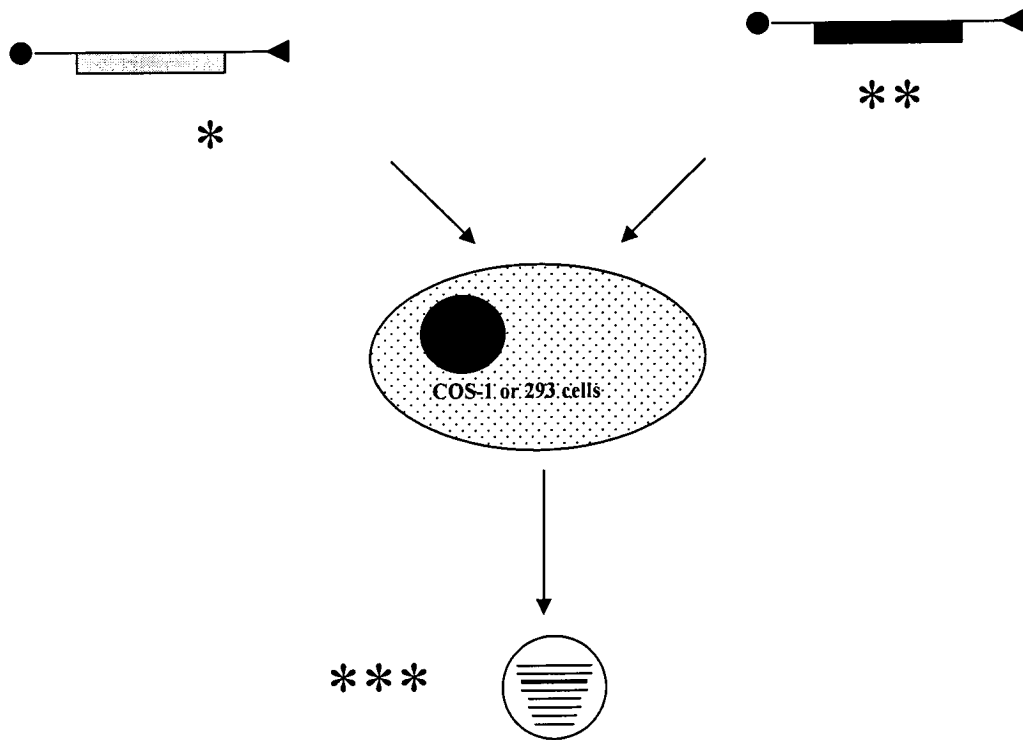
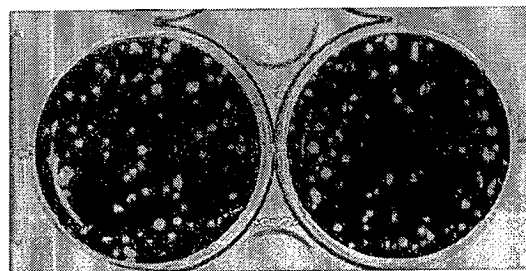


FIGURA 05

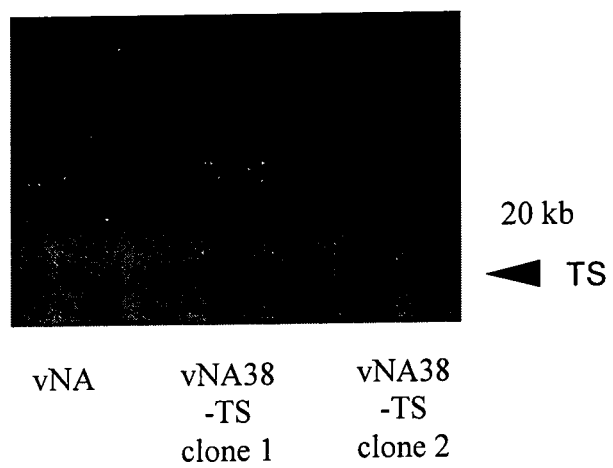
vNA38-TS



C1

C2

FIGURA 06



RESUMO

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

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