



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

(21) PI 1005909-1 A2



(22) Data de Depósito: 02/09/2010

(43) Data da Publicação: 15/09/2015  
(RPI 2332)

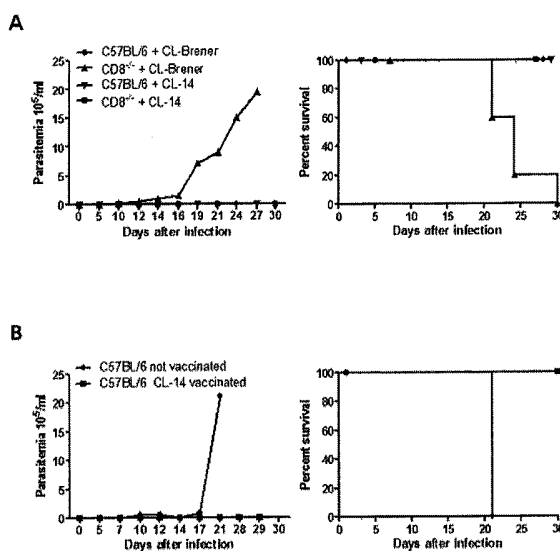
(54) Título: CEPA TRANSGÊNICA ATENUADA DE TRYPANOSOMA CRUZI COMO VETOR VACINAL

(51) Int.Cl.: C12N1/11; A61K39/005; A61K39/385

(73) Titular(es): Ludwig Institute For Cancer Research Ltd., Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

(72) Inventor(es): Bruno Galvão Filho, Caroline Junqueira Giusta, Ricardo Tostes Gazzinelli, Santuza Maria Ribeiro Teixeira

(57) Resumo: CEPA TRANSGÊNICA ATENUADA DE TRYPANOSOMA CRUZI COMO VETOR VACINAL. A presente invenção descreve uma cepa transgênica atenuada de Trypanosoma cruzi e sua utilização como vetor vacinal. Além disto, descreve-se um método de transformação de cepa atenuada de Trypanosoma cruzi com genes exógenos para obtenção deste vetor vacinal. Esta estratégia de vacinação pode ser usada no tratamento de doenças que necessitam de indução de uma resposta imune mediada por células, como o câncer e doenças causadas por microrganismos intracelulares, como a toxoplasmose, a malária, a tuberculose entre outras



## CEPA TRANSGÊNICA ATENUADA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* COMO VETOR VACINAL

A presente invenção descreve uma cepa transgênica atenuada de *Trypanosoma cruzi* e sua utilização como vetor vacinal. Além disto, descreve-se um método de transformação de cepa atenuada de *Trypanosoma cruzi* com genes exógenos para obtenção deste vetor vacinal. Esta estratégia de vacinação pode ser usada no tratamento de doenças que necessitam de indução de uma resposta imune mediada por células, como o câncer e doenças causadas por microrganismos intracelulares, como a toxoplasmose, a malária, a tuberculose entre outras.

No estado da técnica, alguns documentos de patente demonstram a utilização de cepas atenuadas de *Trypanosoma cruzi* como vacina: US 2005244437 - Live attenuated parasite vaccine; WO 8303199 - Method for obtaining reduced infectivity variants from protozoan parasites, thus obtained variants and utilization thereof; BE 892553 - Protozoal strains of reduced infectivity prepared by treating virulent strain with mutagen, useful as vaccine preparation. Porém, estas cepas não são transgênicas, ou seja, não possuem DNA exógeno, nem tampouco são utilizadas para profilaxia ou terapia de doenças diferentes daquela causada pelo próprio parasita selvagem. Além disto, a metodologia por eles utilizada para atenuação da cepa não é utilizada na presente invenção.

Diante da crescente incidência de câncer mundial e das ainda poucas intervenções médicas preventivas e até mesmo terapêuticas disponíveis, torna-se necessário o desenvolvimento de terapias alternativas capazes de prevenir e curar o câncer.

No final da década de 40, estudos utilizando *Trypanosoma cruzi* vivo ou seu extrato lisado demonstraram que esse protozoário possui efeito tumoricida (Roskin GI. 1946 Toxin therapy of experimental câncer. Cancer Res. 6: 363-5; Hauschka TS, Goodwin MB. 1948. *Trypanosoma cruzi* endotoxin (KR) in the treatment of malignant mouse tumors. Science, 107: 600-2.). Recentemente, Batmonkh e colaboradores (Batmonkh Z, Kallinikova VD, Pakhorukova LV, Kravtsov EG, Karpenko LP, Dalin MV. In vivo anticancer activity of lysates from

trypanosoma cruzi of different genetic groups. Bull Exp Biol Med. 2006 Oct;142(4):470-3. English, Russian) demonstraram que o lisado de epimastigotas de diferentes grupos genéticos de *T. cruzi* (P209-1, Gamba1, Sp104-1, MASu, Y7 / 1, MN12, CL-Brener, 86/2036, Y7/2-1) inibe o crescimento de adenocarcinoma de Erlich em ratos. Enquanto a base desta atividade antitumoral ainda é desconhecida, nosso grupo sugere que a ativação inicial de células do sistema imune inato por componentes do parasita pode contribuir para o desenvolvimento de imunidade protetora contra o parasita e outras agressões ao hospedeiro.

10 A possibilidade de se utilizar o parasita *T. cruzi* no tratamento do câncer abre uma nova perspectiva no desenvolvimento de vetores vacinais. Combinando-se a tecnologia de transformação de Tripanosomatídeos com antígenos exógenos (DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vasquez MP, Levin MJ, Teixeira SMR 2004 Expression of exogenous genes in Trypanosoma cruzi. Improving vectors and electroporation protocols. Parasitol. Res., 92: 113-20) e a utilização de cepas atenuadas como a CL-14 (Lima MT, Jansen AM, Rondinelli E, Gattass CR. 1991 Trypanosoma cruzi: properties of a clone isolated from the CL strain. Parasitol. Res., 77: 77-81; Lima MT, Lenzi HL, Gattass CR. 1995 Negative tissue parasitism in mice injected with a non-infective clone of Trypanosoma cruzi. Parasitol. Res. 81: 6-12), torna-se possível o desenvolvimento de parasitas transgênicos viáveis de serem utilizados em estratégias vacinais.

A base da atenuação e do fenótipo menos infectivo da cepa de *T. cruzi* CL-14 deve-se provavelmente à menor expressão da glicoproteína 82 (gp82), a qual é responsável pela interação do parasita com moléculas de superfície da célula hospedeira e posterior invasão à célula do hospedeiro (Ruiz RC, Favoretto SJr, Dorta ML, Oshiro MEM, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N. 1998 Infectivity of Trypanosoma cruzi isolates is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. Biochem. J., 330: 505-11), tornando a cepa citada quatro vezes menos infectiva que a sua parental CL (Atayde VD, Neira I, Cortez M, Ferreira D, Freymuller E, Yoshida N. 2004 Molecular basis of non-virulence of Trypanosoma cruzi clone

CL-14. Inter. J. Parasitol., 34: 851-60.). Estudos anteriores mostram que a inoculação de camundongos com tripomastigotas de CL-14, ao invés de induzir doença, é capaz de induzir proteção contra um subsequente desafio com a cepa virulenta CL, prevenindo parasitemia, mortalidade e o desenvolvimento de sintomas relacionados à doença de Chagas (Lima MT, Jansen AM, Rondinelli E, Gattass CR. 1991 *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from the CL strain. Parasitol. Res., 77: 77-81; Lima MT, Lenzi HL, Gattass CR. 1995 Negative tissue parasitism in mice injected with a non-infective clone of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 81: 6-12.). Complementarmente, foi observado que camundongos imunizados com CL-14 e posteriormente desafiados com CL apresentam produção de IFN- $\gamma$ , IgG1, IgG2a e IgG2b (Pyhrro AS, Moraes JLC, Peçanha LMT, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi* 1998 *Trypanosoma cruzi*: IgG1 and IgG2b are the main immunoglobulins produced by vaccinated mice. Parasitol. Res., 84: 333-7; Soares MBP, Gonçalves R, Pyhrro AS, Costa DA, Paiva CN, Gattass CR. 2003 Balanced cytokine-producing pattern in mice immunized with an avirulent *Trypanosoma cruzi*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 75(2): 167-72). Portanto, devido à sua baixa virulência e alta imunogenicidade, esta cepa tem grande potencial para ser utilizada como vetor vacinal.

Por meio da inserção de genes exógenos no genoma de *T. cruzi* CL-14, este vetor vacinal irá levar o antígeno até a célula hospedeira, favorecendo a apresentação de antígenos pelo MHC de classe I e ativação de linfócitos T CD8+, que são as células efetoras contra patógenos intracelulares e tumores.

Atualmente, formulações de vacinas em experimentação contra tumores e outras doenças vêm sendo feitas combinando-se antígenos protéicos com agonistas de TLR (Receptores do tipo Toll) como adjuvantes imunológicos, o que aumenta a capacidade de ativar DCs (células dendríticas) e favorecer, assim, o desenvolvimento de uma forte imunidade mediada por células T e por linfócitos Th1 (Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K, Koup RA, Kedl RM, Mattapallil JJ, Weiss WR, Roederer M, Seder RA. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8 T

cell responses in nonhuman primates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005, 102: 15190-4).

Os antígenos protéicos mais promissores para induzir resposta imune específica para células tumorais são os antígenos "cancer/testis", uma família de antígenos que não são expressos em células normais, com excessão das células germinativas do testículo, que não são reconhecidas pelo sistema imune (Kirkin, A. F., Dzhandzhugazyan, K. N., and Zeuthen, J. (2002). Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties. Cancer Invest 20, 222-236; Zendman, A. J., Ruitter, D. J., and van Muijen, G. N. P. (2003). Cancer/testis-associated genes: Identification, expression profile, and putative function. J. Cell Physiol 194, 272-288). O potencial terapêutico deste grupo de antígenos tumorais foi demonstrado por vários estudos (van Pel, A., van der Bruggen, P., Coulie, P. G., Brichard, V. G., Lethé, B., Van den Eynde, B. J., Uyttenhove, C., Renauld, J. C., and Boon, T. (1995). Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. Immunol. Rev. 145, 229-250.; Thurner, B., Haendle, I., Röder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Bröcker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kämpgen, E., and Schuler, G. (1999). Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage 1V melanoma. J. Exp. Med. 190, 1669-1678; Reynolds, S. R., Zeleniuch-Jacquotte, A., Shapiro, R. L., Roses, D. F., Harris, M. N., Johnston, D., and Bystry, J. C. (2003). Vaccine-induced CD8+ T-cell responses to MAGE-3 correlate with clinical outcome in patients with melanoma. Clin. Cancer Res. 9, 657-662). Devido à alta heterogeneidade na expressão dos diversos membros desta família, este grupo de antígenos ainda é pouco utilizado como alvo imunológico em relação aos antígenos de diferenciação ou aos antígenos superexpressos.

Na presente invenção descreve-se uma formulação vacinal anti-tumoral capaz de induzir resposta imune anti-NY-ESO-1 e resistência do hospedeiro contra tumores expressando tal antígeno. Esta formulação envolve o emprego de uma cepa recombinante de *Trypanosoma cruzi* atenuada, capaz de

expressar a proteína tumoral NY-ESO-1, um antígeno “cancer-testis” que apresenta alta imunogenicidade humoral e celular espontânea.

A proteína NY-ESO-1 pertence à família de antígenos tumorais “cancer/testis” é conhecida como um dos mais imunogênicos antígenos tumorais (Scalan MJ, et al., 2002 Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis. *Int. Cancer*, 98: 485-92). NY-ESO-1 é encontrada na maioria dos tipos tumorais, mas sua expressão varia de indivíduo para indivíduo. A frequência de expressão em alguns tipos tumorais, tais como melanoma, pulmão, esôfago e sarcomas sinoviais, pode chegar a até 80% dos pacientes (Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, Knuth A, Chen YT, Old LJ. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res*. 2006;95:1-30). Sua função nas células germinativas e no desenvolvimento de tumores continua desconhecida, assim como a da maioria dos antígenos “cancer/testis”. Devido, porém, à sua alta imunogenicidade e distribuição em diversos tipos de tecido tumoral, NY-ESO-1 constitui um forte candidato a antígeno a ser aplicado à imunoterapia do câncer.

Além do antígeno NY-ESO-1, a presente invenção também demonstra a elaboração e caracterização de parasitas transgênicos expressando as seguintes proteínas ou combinações de proteínas: MAGE-A3, CTSP-1, NY-ESO-1 + Timidina quinase (TK), CTSP-1 + MAGE-A3 + NY-ESO-1 + TK. Assim como NY-ESO-1, as proteínas MAGE-A3 e CTSP-1 pertencem à família dos “cancer/testis”. A idéia de utilizar diferentes antígenos no mesmo parasita é que desta forma aumenta-se a chance de sucesso da vacinação, uma vez que cada “cancer/testis” possui expressão variada de indivíduo para indivíduo.

A timidina quinase derivada do herpes vírus simplex pode ser utilizada neste sistema, em combinação com as proteínas “cancer/testis” ou outros antígenos protéicos, funcionando como um gene de biosegurança. Após a eliminação do tumor, o paciente administra uma substância análoga de nucleosídeos, como a guanosina encontrada na droga Aciclovir (Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, de Miranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl*

Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5716-20), Ganciclovir ou outras drogas com mecanismos de ação similares, as quais eliminarão todos os parasitas. Esta droga também pode ser utilizada para contornar qualquer reação exagerada do sistema imune.

- 5 O documento US 2010092498 – “Anti-tumour vaccine derived from normal chemically modified cells” descreve o uso de uma composição capaz de induzir resposta imune em mamíferos que compreende células linfóides na qual a expressão de antígenos tumorais “cancer/testis” é induzida. Os antígenos “cancer/testis” utilizados foram MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6,  
10 MAGE-A10, MAGE-A12, GAGE-3-7, NY-ESO-1 e BORIS. Neste documento demonstra-se um processo para preparo de células normais capazes de apresentar antígenos sem o uso de nenhum agente externo. Entretanto, o uso de células do próprio paciente encarece muito o tratamento.

A presente invenção descreve o emprego de uma cepa recombinante de  
15 *Trypanosoma cruzi* capaz de expressar proteínas “cancer/testis” como vetor vacinal. Uma vantagem do uso de *T. cruzi* como vetor vacinal, quando comparado com o uso de outras células, como a citada no documento anterior, está baseada no fato do *T. cruzi* ser produzido *in vitro* em grande escala e poder ser inoculado em qualquer paciente. Além disso, as cepas  
20 recombinantes são mais estáveis e podem ser transportadas em temperatura ambiente. Por fim, vale ressaltar que a administração da vacina da presente invenção é feita em poucas doses, o que é menos incômodo para o paciente.

Além do câncer, a presente invenção demonstra que a cepa transgênica atenuada de *T. cruzi* pode também ser utilizada na terapia ou profilaxia de  
25 qualquer doença que necessite da indução de uma resposta imune do tipo Th1, como as doenças causadas por microorganismos intracelulares (toxoplasmose, malária, tuberculose entre outras).

## BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

### **Figura 1 - Monitoramento da parasitemia e mortalidade de animais infectados com as cepas CL-14 e CL Brener.**

(A) Camundongos C57BL/6 e CD8<sup>-/-</sup> infectados com formas tripomastigotas metacíclicas das cepas CL-14 e CL Brener foram monitorados por 30 dias quanto à parasitemia e mortalidade. (B) Camundongos C57BL/6 vacinados com a cepa CL-14 foram desafiados com a forma tripomastigota sanguínea da cepa CL Brener. Estes foram acompanhados por 30 dias quanto à parasitemia e mortalidade.

### **Figura 2 - Western Blot para detectar expressão da proteína NY-ESO-1 pelos parasitas transgênicos.**

Western blot anti-NY-ESO-1 e anti-Histag. 10<sup>5</sup> parasitas foram usados para cada construção ou controle (0) *E. coli* expressando NY-ESO-1; (1) CL-14 WT; (2) CL-14 NY-ESO-1 His (+); (3) CL-14 NY-ESO-1 His (-); (4) sobrenadante de cultura de CL-14 NY-ESO-1 gp63 concentrado 10X; (5) CL-14 NY-ESO-1 gp63.

### **Figura 3 - Expressão da proteína NY-ESO-1 nas três cepas transgênicas.**

Microscopia confocal dos parasitas transgênicos CL-14 NY-ESO-1 His (-), CL-14 NY-ESO-1 His (+), CL-14 NY-ESO-1 gp63, comparados com a cepa CL-14 WT na formas infectante tripomastigota metacíclico. Preparações utilizando anticorpos anti-NY-ESO-1 e anti-Histag foram realizadas para distinção das construções com ou sem cauda de histidina. Em verde observa-se a proteína NY-ESO-1, em azul o núcleo corado com Dapi, em cinza a imagem transmitida (Dic) e, por último, a sobreposição das três imagens (Merge).

### **Figura 4 - Expressão da proteína NY-ESO-1 nas quatro fases do ciclo celular do parasita.**

Microscopia confocal do parasita transgênico CL-14 NY-ESO-1 His (+) nas formas epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota extracelular e tripomastigota de cultura. Em verde, observa-se a proteína NY-ESO-1, em azul, o núcleo corado com Dapi, em cinza, a imagem transmitida (Dic) e, por último, a sobreposição das três imagens (Merge).



**Figura 5 - Resposta humoral anti-NY-ESO-1 induzida por vacinação com parasitas transgênicos**

Com o intuito de avaliar a produção de anticorpos anti-NY-ESO-1 induzida por protocolos de vacinação com os parasitas transgênicos ou controle selvagem, soro de animais vacinados foram submetidos a ELISA anti-IgG total, IgG1 e IgG2c contra a proteína NY-ESO-1 recombinante (A) e Western blot (B).

**Figura 6 - Resposta celular anti-NY-ESO-1 induzida por vacinação com parasitas transgênicos**

Com o intuito avaliar a produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos de animais vacinados com parasitas transgênicos, foi realizado ensaio de ELISA anti-IFN- $\gamma$  após re-estimulação *in vitro* com peptídeos T CD4+ e T CD8+ NY-ESO-1-específicos e TSKB-18 como controle da resposta anti-CL-14.

**Figura 7 - Acompanhamento do crescimento tumoral após vacinação com parasitas transgênicos**

Animais vacinados com duas doses de  $10^7$  parasitas tripomastigota metacíclicos foram desafiados com  $5 \times 10^4$  células de melanoma B16 expressando ou não NY-ESO-1.

**Figura 8 - Resposta celular anti-NY-ESO-1 e anti-TSKB20 em animais deficientes**

Esplenócitos de animais deficientes para iNos (óxido nítrico sintetase), IL-12 (interleucina -12) ou Myd88 (fator mielóide 88) e o controle selvagem C57BL/6 que receberam protocolos de imunização nos dias 0 e 30, foram comparados quanto a produção de IFN- $\gamma$  através do ensaio de ELISA anti-IFN- $\gamma$  após re-estimulação com peptídeos T CD4+ e T CD8+ NY-ESO-1-específicos e TSKB-18 como controle da resposta anti-CL-14.

**Figura 9 - Avaliação da porcentagem de células CD8+ e tetrâmero+ para NY-ESO-1 e TSKB20 em animais selvagens e deficientes.**

Esplenócitos de animais deficientes para iNos (óxido nítrico sintetase), IL-12 (interleucina -12) ou Myd88 (fator mielóide 88) e o controle selvagem C57BL/6 vacinados foram submetidos a citometria de fluxo para avaliação do percentual de células positivas para CD8, assim como positivas para o peptídeo NY-ESO-

1 específico para células CD8+. Para tanto, os mesmos foram marcados com anticorpos anti-CD3 PerCP, anti-CD8 FITC e Tetrâmero NY-ESO-1 PE. As leituras foram feitas em FACScalibur e analisadas no programa FlowJo.

**Figura 10 – Western Blot para análise da expressão de NY-ESO-1 e HSV-1 TK pelo parasita transformado.**

O lisado celular dos parasitas transformados, ou da cepa selvagem CL-14, foram submetidos a Western blot para detecção de TK HSV-1 e NY-ESO-1. Para tanto, foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para NY-ESO-1 ou TK HSV-1. Para a construção B2, a qual secreta o antígeno NY-ESO-1, foi usado o sobrenadante de cultura concentrado 10X, ao invés do lisado celular.

**Figura 11 – Curva de morte dos parasitas induzida pela administração de Aciclovir.** Células L6 foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas em estufa a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> por um dia. No dia seguinte, as células foram infectadas com 10 parasitas/ célula, sendo estes na forma tripomastigota metacíclica de cada construção ou da cepa selvagem CL-14. Ao meio de cultura foram adicionadas diferentes concentrações da droga Aciclovir. Nos dias 5, 7 e 9 após a infecção foram coletados os sobrenadantes das culturas para contagem dos parasitas. Os valores do gráfico representam a soma das três contagens.

**DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA**

**EXEMPLO 1 - Método para preparação de cepa transgênica atenuada de *Trypanossoma cruzi***

Visando a utilização da cepa CL-14 como vetor vacinal, inicialmente camundongos C57BL/6 e camundongos CD8<sup>-/-</sup> foram infectados pela via intraperitoneal com 10<sup>7</sup> parasitas da cepa CL-14 ou 5 x 10<sup>5</sup> parasitas da cepa CL Brener na forma tripomastigota metacíclica para avaliação de parasitemia e mortalidade quando comparada à cepa virulenta CL Brener (**Figura 1 A**). Observa-se que a cepa CL-14 não causa parasitemia e mortalidade em animais C57BL/6 nem em animais CD8<sup>-/-</sup>.

Animais C57BL/6 previamente infectados com 10<sup>7</sup> parasitas da cepa CL-14, foram submetidos 30 dias após esta vacinação, a um desafio de 5 x 10<sup>3</sup>

parasitas CL Brener na forma tripomastigota sanguínea para acompanhamento de parasitemia e mortalidade dos mesmos (**Figura 1 B**). Somente os animais vacinados foram capazes de controlar a parasitemia e impedir sua mortalidade.

Uma vez estabelecida a baixa virulência da cepa CL-14 foi então iniciada a preparação da cepa transgênica, como se segue.

#### **Parasitemia e mortalidade**

Animais infectados com *T. cruzi* cepa CL-14 e cepa CL Brener foram monitorados quanto à presença de parasitas na forma de tripomastigota sanguíneo pelo período de 30 dias. Para tanto, foram retirados 5 µl de sangue da cauda dos animais e analisados 50 campos em lâmina de microscopia 20x20 com o aumento de 40 X. O valor da parasitemia foi dado pelo método de Brener, no qual se multiplica o número de parasitas pelo fator de correção do microscópio (**Figura 1**).

#### **Clonagem do antígeno protéico**

Com o intuito de gerar *Trypanosoma cruzi* da cepa CL-14 capazes de expressar o antígeno protéico de interesse (NY-ESO-1, por exemplo) realiza-se a clonagem do gene que codifica para este antígeno no plasmídeo pRockneo (DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, VazquezMP, Levin MJ, Teixeira SM. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. Parasitol Res. 2004 Jan;92(2):113-20.).

Neste exemplo com a proteína NY-ESO-1, três construções foram desenvolvidas: (a) pRockNY-ESO-1 sem calda de histidina, para expressão no citoplasma do parasita (b) pRockNY-ESO-1 com calda de histidina, para expressão no citoplasma do parasita (c) pRockNY-ESO-1 com peptídeo de sinal da glicoproteína 63 (gp63), para direcionar a secreção da proteína transgênica.

#### **Cultivo de *Trypanosoma cruzi***

A cepa de *T. cruzi* CL-14 é mantida em cultivo em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% SFB, penicilina a 100 U/ ml e estreptomicina a 100 µg/ml em estufa B.O.D a 28°C. Os parasitas transgênicos

são mantidos assim como a cepa selvagem, mas na presença de geneticina a 250 µg/ ml.

Para a obtenção de formas tripomastigotas ou amastigotas extracelulares, células LLCMK2 ou L6 foram mantidas em RPMI suplemento com 5% SFB e penicilina/ streptomycin são infectadas com trimastigotas metacíclicos na proporção de 5 parasitas/célula. As são mantidas em estufa a 34°C e 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, as culturas são tratadas por 24 horas com soro de cavalo para a eliminação de possíveis formas epimastigotas da cultura. Posteriormente, é restabelecida a cultura com SFB até o aparecimento de formas amastigotas extracelulares, em torno de 7 a 8 dias após a infecção.

#### **Transfecção de *T. cruzi***

Parasitas da cepa CL-14 são transfectados por eletroporação, na qual 10<sup>8</sup> parasitas na fase de crescimento logarítmica são lavados com PBS 1X, centrifugados e ressuspensos em tampão de eletroporação. À cubeta de eletroporação de 0,2 cm são adicionados 50 µg do plasmídeo previamente digerido com *NotI*, ou água como "mock" e, em seguida, são adicionados os parasitas. Os parasitas são eletroporados a 0.3 KV e 500µF, com dois pulsos com intervalos de 10 segundos, usando um Bio-Rad gene pulser (Bio-Rad). O produto da eletroporação é transferido para meio de cultura LIT suplementado com 10% SFB. 24 horas após a eletroporação, são adicionados à cultura 250µg/ ml de geneticina para seleção dos parasitas transgênicos. O período de seleção dura de 3 a 6 semanas. Os transgênicos foram avaliados quanto à integração dos cassetes de expressão no genoma do parasita, através de ensaio de Southern blot (dado não mostrado).

#### **Western Blot**

Para a realização de Western Blot, 10<sup>7</sup> parasitos na forma epimastigota são lavados em PBS 1X e ressuspensos em tampão de amostra 1 X e resolvidos em eletroforese em gel SDS PAGE 15%. Após a corrida, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e então incubadas com anticorpos primários (anti-NY-ESO-1, anti-His tag ou soro de animais imunizados) por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, são lavadas e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-

mouse IgG total – HRP. Após a incubação, as membranas são lavadas e a revelação é realizada após a aplicação de ECL plus na membrana, de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente, escaneada em Scanner Storm (GE).

- 5 Na **Figura 2** observa-se a expressão da proteína NY-ESO-1 pelos parasitas transgênicos por Western blot do lisado de parasitas para as construções sem e com cauda de histidina e da análise do sobrenadante da construção contendo o peptídeo de sinal da gp63.

### **Microscopia confocal**

- 10 Os parasitas transgênicos, assim como a forma selvagem, são submetidos à microscopia confocal para detectar a expressão do antígeno protético (NY-ESO-1) pelo parasita. Para tanto, formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, amastigotas extracelulares e tripomastigotas de cultura celular são fixadas com paraformaldeído 2%, lavados com PBS 1X e aplicados em  
15 lâminas de poli-L-lisina para aderência celular. No dia seguinte as amostras são reidratadas, permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 e bloqueadas por 1 hora com PBS 1X com 5% SFB. Em seguida, são incubadas com anticorpos primários (anti-NY-ESO-1 ou anti-His tag) por 1 hora. Antes e após a incubação com o anticorpo secundário Alexa 488 anti-mouse IgG total, as lâminas são  
20 lavadas 5 vezes com tampão de bloqueio. Como última etapa, é adicionado Vectashield (Vector Laboratories) antes da colocação da lamélula.

- As lâminas foram analisadas em microscópio laser confocal LSM Zeiss com laser a 488 nm para detecção da proteína NY-ESO-1, a 358 nm para o núcleo corado por DAPI e para visualização da imagem por DIC. As imagens foram  
25 adquiridas e formatadas pelo software Zeiss LSM Image Browser.

Observa-se na **Figura 3** a expressão da proteína por meio da técnica de microscopia confocal.

- Além de identificar a expressão da proteína na forma infectante tripomastigota metacíclica, também foi realizada microscopia confocal nos  
30 quatro estágios de diferenciação do parasita, nos quais foi possível comprovar a expressão persistente da proteína durante o ciclo celular do parasita (**Figura 4**).

## **EXEMPLO 2 – Avaliação da capacidade dos parasitas transgênicos de induzir resposta imune**

### **Infecção *in vivo* com *T. cruzi***

Camundongos C57BL/6 e camundongos deficientes que receberam  
5 inóculo de  $10^7$  parasitas por animal na forma tripomastigota metacíclica via intraperitoneal foram infectados com as cepas CL-14 ou seus transgênicos. Na ocasião das infecções com o intuito de imunização, foram realizadas duas infecções equivalentes, sendo a segunda 30 dias após a primeira.

O soro dos animais imunizados foi utilizado para verificar a produção de  
10 anticorpos específicos anti-NY-ESO-1 (Figura 5). A resposta celular induzida pelo protocolo de imunização foi medida 21 dias após a segunda imunização (Figura 6). Estes dados mostram que os parasitas transgênicos foram capazes de induzir resposta imune específica para o antígeno NY-ESO-1.

### **Cultivo de linhagem tumoral de melanoma B16 WT e B16 NY-ESO-1**

15 Células da linhagem celular de melanoma B16 foram cultivadas em RPMI suplementadas com 10% SFB e penicilina/ estreptomicina em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. À linhagem transgênica que expressa NY-ESO-1, foram adicionados 300 µg/ ml de geneticina para manutenção do plasmídeo de expressão.

### **Desafio com melanoma B16**

20 Camundongos imunizados foram desafiados com melanoma B16 expressando ou não o antígeno tumoral NY-ESO-1. Cada animal recebeu  $5 \times 10^4$  células pela via subcutânea na região dorso posterior. O crescimento tumoral foi acompanhado duas vezes por semana, por um período de 40 dias. A medida dos tumores foi dada como a área em mm<sup>2</sup> (Figura 7). Este dado  
25 mostra que os parasitas transgênicos foram capazes de induzir inibição tumoral específica para o antígeno NY-ESO-1.

### **Citometria de fluxo para avaliação de linfócitos CD8+/ tetrâmero+**

Uma vez estabelecido que o parasita transgênico vivo é eficaz tanto na  
indução da resposta imune específica, quanto na inibição do crescimento  
30 tumoral, surge a questão sobre qual o mecanismo envolvido na indução desta resposta. Visando responder tal pergunta, foram realizadas imunizações em

animais deficientes para IL-12, Myd88, CD8 e iNos, todos paralelamente ao controle selvagem.

Células derivadas do baço de animais imunizados com *T. cruzi* foram submetidas a citometria de fluxo para avaliação da população CD8+,  
5 responsiva aos tetrâmeros contendo peptídeos TSKB18 ou NY-ESO-1 CD8. Para tanto, as células foram marcadas com os tetrâmeros, anti-CD3 e anti-CD8. As leituras foram realizadas em FACScalibur e analisadas por meio do software FlowJo.

Os dados de resposta celular (**Figura 8**) e citometria (**Figura 9**) mostram  
10 que os animais deficientes em IL-12 e Myd88 têm uma diminuição na produção de IFN- $\gamma$ , quando comparados ao animal selvagem C57BL/6 e ao animal deficiente para iNos. Apesar dos camundongos deficientes para Myd88 e IL-12 não possuírem uma menor porcentagem de células CD8+/ NY-ESO-1 tetrâmero+, sugere-se que estas células não sejam capazes de produzir IFN- $\gamma$ ,  
15 sugerindo o papel crucial da molécula adaptadora Myd88 na indução da resposta imune específica após protocolos de vacinação com os parasitas transgênicos, assim como era de se esperar para os animais IL-12<sup>-/-</sup>, que já foram caracterizados anteriormente, quanto à baixa produção de IFN- $\gamma$ .

### **EXEMPLO 3 – Transfecção e caracterização da linhagem de *T. cruzi* CL-14 com NY-ESO-1 e Timidina Quinase.**

20

O gene da Timidina Quinase do vírus *Herpes simplex* tipo – 1 (HSV-1 TK) é largamente utilizado como marcador seletivo negativo em células de mamífero (Moolten, F. L. 1986. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control  
25 strategy. *Cancer Research* 46, 5276-5281.). Este é um exemplo de gene suicida, que, quando expresso, leva a célula transfectada a cometer suicídio metabólico na presença de uma droga apropriada (Ganciclovir ou Aciclovir). A HSV-1 TK, em contraste com a timidina quinase de mamíferos, é capaz de fosforilar análogos de nucleosídeos específicos, como Ganciclovir e Aciclovir, à  
30 sua forma monofosfatada. Este monofosfato é então convertido por quinases celulares a um nucleosídeo trifosfato muito tóxico, que é incorporado ao DNA levando à inibição da síntese de DNA e à morte celular (Elion, G. B. 1983. The

biochemistry and mechanism of action of acyclovir. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 12, 9–17.). A alta especificidade de HSV-1 TK para estes análogos de nucleosídeos torna possível a morte seletiva de células que expressam HSV-1 TK, não atingindo outras células em divisão.

- 5 O uso de HSV-1 TK neste sistema, em combinação com as proteínas “cancer/testis”, permite que, após a eliminação do tumor, o paciente adiministre a droga aciclovir e elimine todos os parasitas. Esta droga também pode ser utilizada para contornar qualquer reação exagerada do sistema imune.

### **Clonagem da Timidina Quinase**

- 10 Duas construções foram selecionadas para a inserção do gene de HSV-1 TK: pROCKNYESO-1His+ e pROCKNYESO-1GP63. Inicialmente, o gene de HSV-1 TK foi amplificado por PCR, utilizando-se iniciadores específicos contendo os sítios de restrição XbaI e XhoI nas extremidades. Após amplificação, o produto de PCR foi digerido com XbaI e XhoI e o produto da  
15 digestão foi inserido no plasmídeo pROCKHygro (DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, VazquezMP, Levin MJ, Teixeira SM. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*:improving vectors and electroporation protocols. Parasitol Res. 2004 Jan;92(2):113-20.). A presença do inserto foi confirmada por digestão com as mesmas enzimas e  
20 análise em gel de agarose 1%. A construção pROCKHygroTK foi então digerida com BamH1 e SpeI para remoção do inserto de HSV-1 TK e clonagem nos plasmídeos selecionados. A presença do inserto foi confirmada por digestão com XbaI e XhoI e análise em gel de agarose 1%. As construções foram digeridas com a enzima de restrição NotI e o produto foi eletroporado em  
25 *T. cruzi* CL-14.

### **Western Blot**

- Para análise da expressão das proteínas NY-ESO-1 e HSV-1 TK pelos parasitas transformados, lisados totais destes e o sobrenadante de cultura da construção foram submetidos a Western Blot, como descrito anteriormente,  
30 mas utilizando anticorpo monoclonal específico para HSV-1 TK, além do anti-NY-ESO-1 (**Figura 10**).

### **Análise de susceptibilidade à droga Aciclovir**



Células L6 mantidas em suplemento RPMI com 5% SFB e penicilina/streptomicina são infectadas com tripomastigotas metacíclicos na proporção de 5 parasitas/célula. As células são mantidas em estufa a 34°C e 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, as culturas são tratadas por 24 horas com soro de cavalo para a  
5 eliminação de possíveis formas epimastigotas da cultura. Posteriormente, é restabelecida a cultura com SFB com adição da droga Aciclovir em diferentes concentrações. Nos dias 7, 8 e 9 após a infecção foram coletados os parasitas presentes no sobrenadante da cultura e contados. Foi considerada a soma dos três dias para cada concentração da droga.

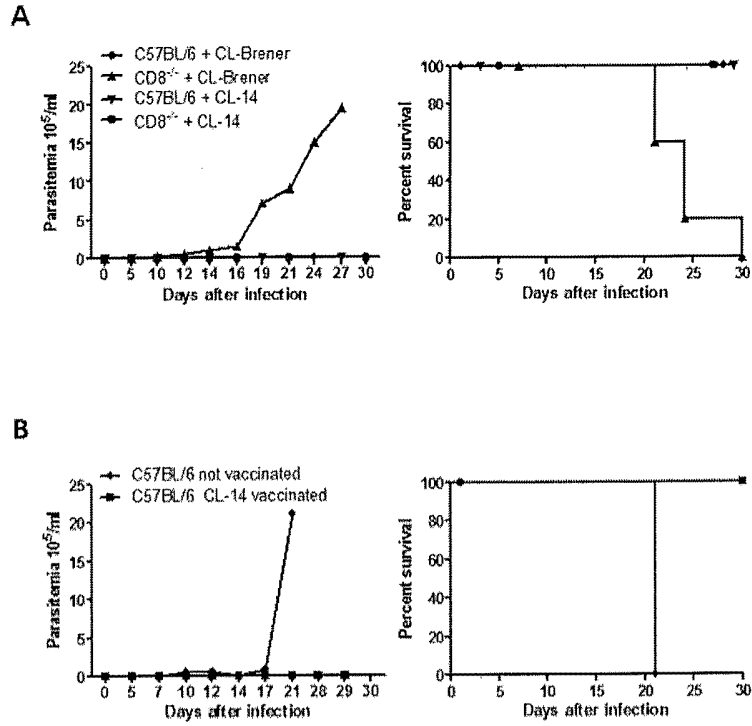
10 A **Figura 11** mostra a capacidade de proliferação dos parasitas após administração de Aciclovir. Este resultado demonstra que, com a combinação do HSV-1 TK e o antígeno protéico de interesse, é possível eliminar o parasita, de maneira específica, ao final do tratamento.

**REIVINDICAÇÕES**

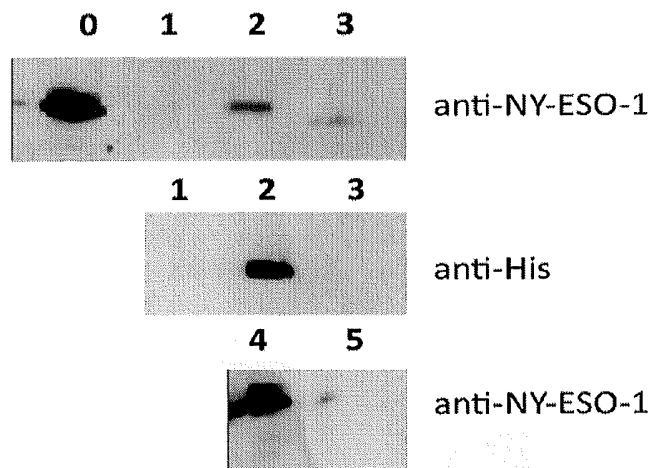
1. **Método para preparação de cepa transgênica atenuada de *Trypanosoma cruzi***, caracterizado por compreender as seguintes etapas:
  - a) Clonagem de gene para antígeno protéico em plasmídeo pRockneo, pRockHygro ou similares;
  - b) Transfecção por eletroporação da cepa atenuada de *T. cruzi* CL-14 com o plasmídeo contendo um ou mais genes para antígeno protéico.
2. **Cepa atenuada de *Trypanosoma cruzi***, caracterizada por ser transgênica, contendo pelo menos um gene exógeno que codifica para um antígeno polipeptídico.
3. **Cepa atenuada de *Trypanosoma cruzi***, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo antígeno polipeptídico ser selecionado de um grupo que compreende preferencialmente os antígenos NY-ESO-1, MAGE-A3, CTSP-1 ou parte destes, isolados ou em combinação.
4. **Cepa atenuada de *Trypanosoma cruzi***, de acordo com as reivindicações 2 e 3, caracterizada por conter, opcionalmente, gene que codifica para timidina quinase do HSV-1.
5. **Cepa atenuada de *Trypanosoma cruzi***, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizada por ser utilizada como vetor vacinal.
6. **Cepa atenuada de *Trypanosoma cruzi***, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizada por ser usada na preparação de uma vacina viva para tratamento ou profilaxia de doenças que necessitam de indução de uma resposta imune mediada por linfócitos, selecionadas do grupo que compreende doenças tumorais e doenças causadas por microorganismos intracelulares.
7. **Vacina viva**, caracterizada por compreender uma cepa transgênica atenuada de *Trypanosoma cruzi*, conforme definido nas reivindicações 2 a 5.
8. **Vacina viva**, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por ser terapêutica e/ou profilática.

9. **Vacina viva**, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por ser administrada em número reduzido de doses subseqüentes.
10. **Vacina viva**, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por poder ser utilizada em combinação com protocolos heterólogos de vacinação.

**FIGURAS**



**Figura 1**



**Figura 2**

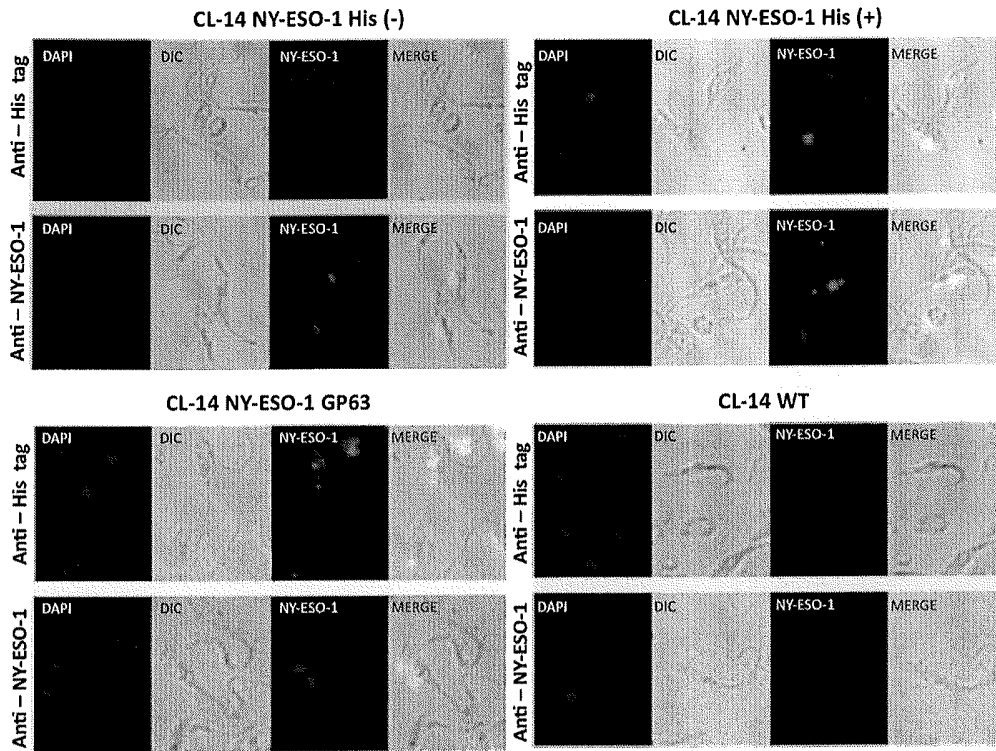


Figura 3

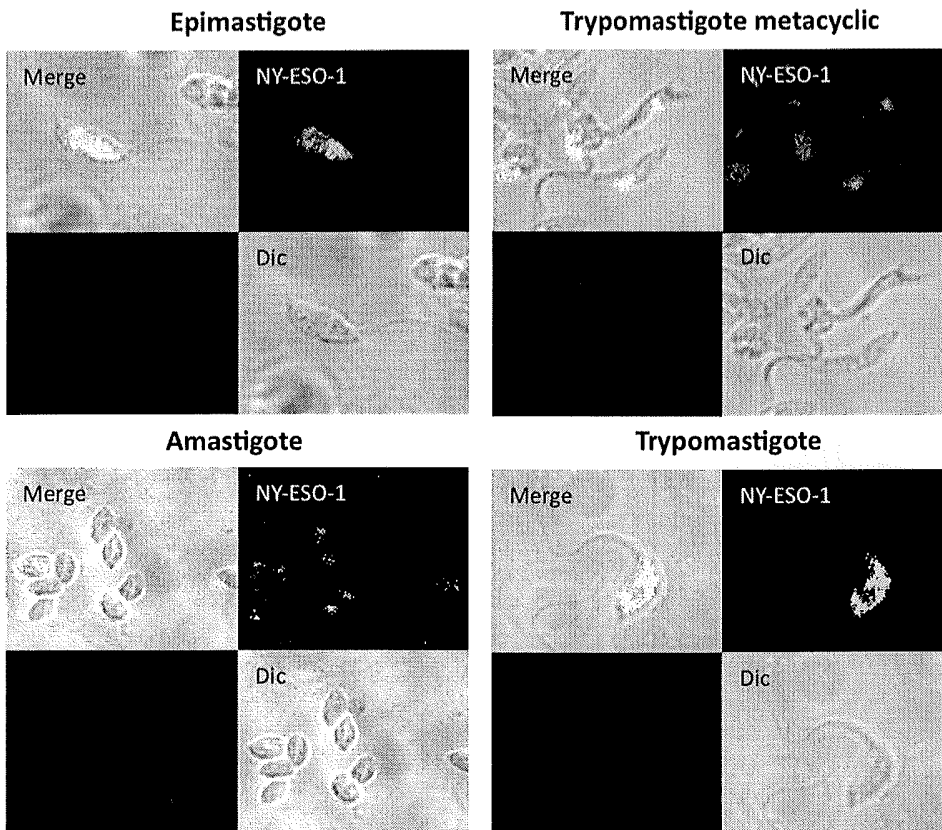


Figura 4

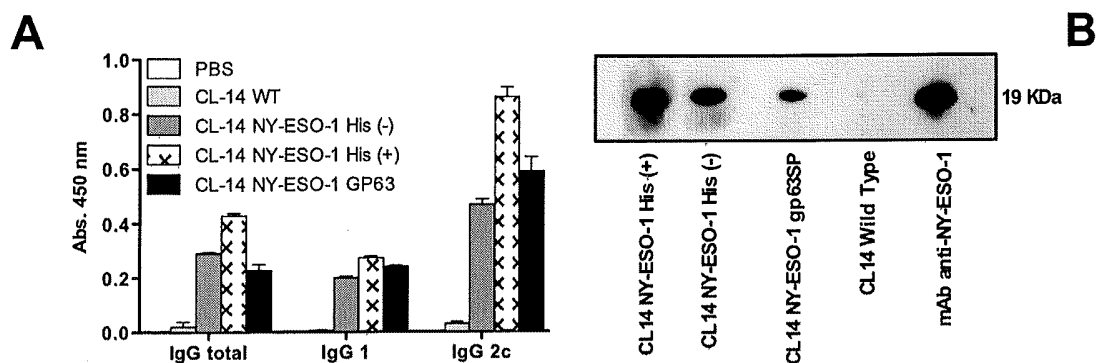


Figura 5

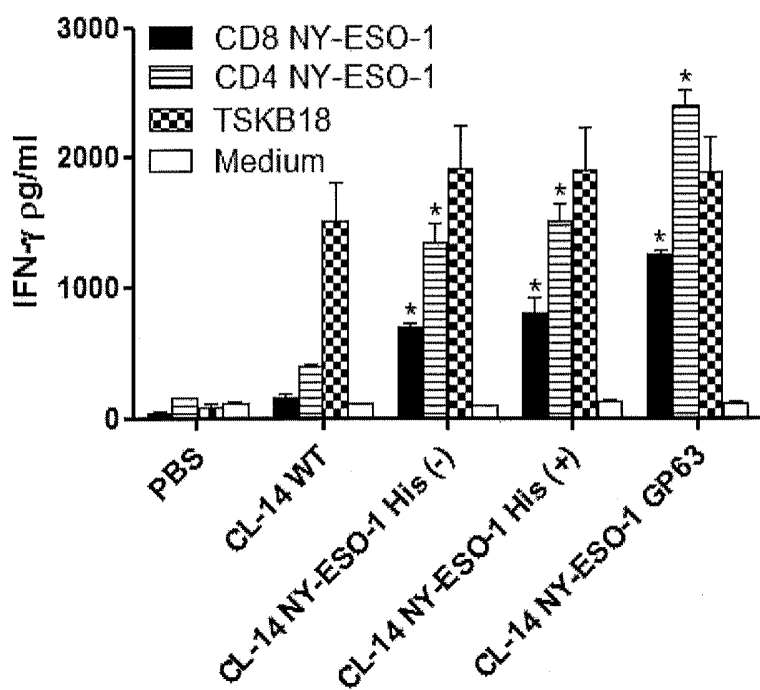


Figura 6

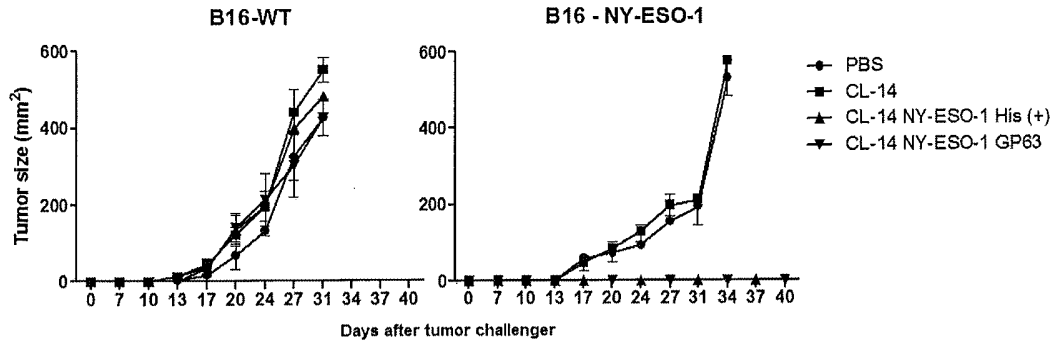


Figura 7

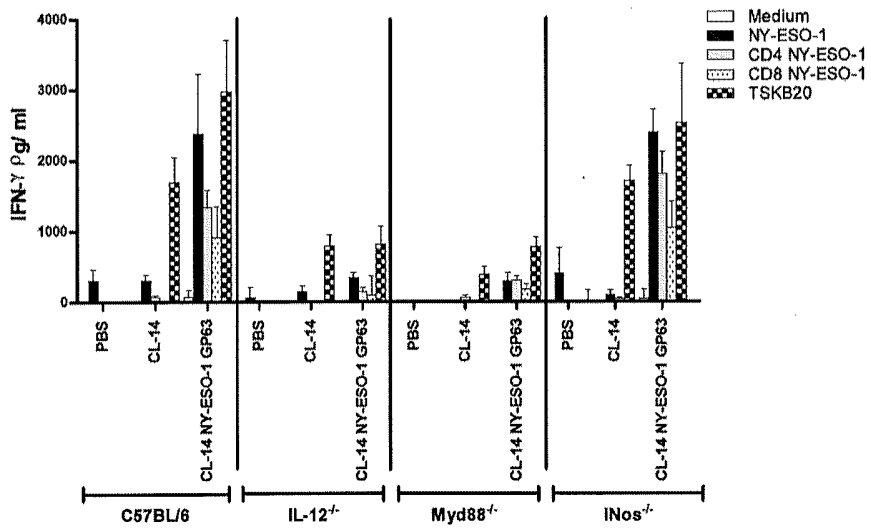


Figura 8

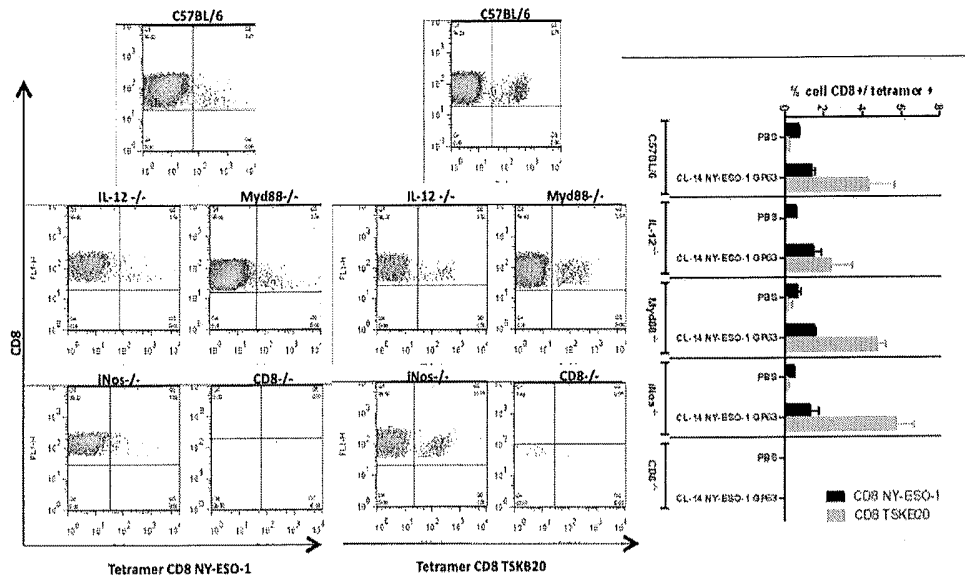
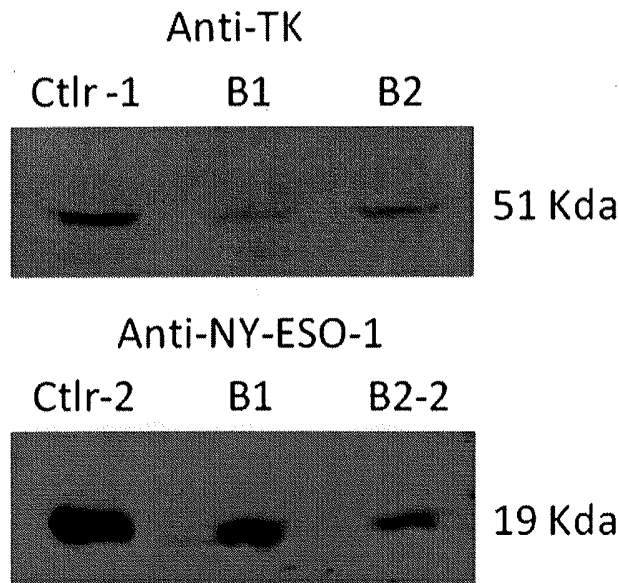


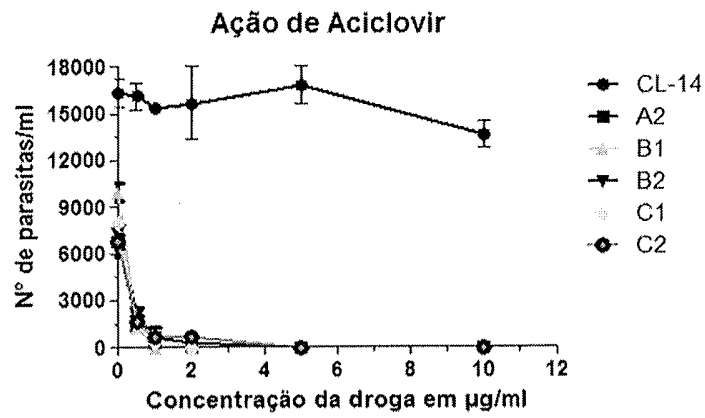
Figura 9



**Ctrl-1** – lisado de célula infectada com Herpes Vírus  
**Ctrl-2** – 10 ug NY-ESO-1 recombinante  
**B1** – lisado de CL-14 transfectado com pRockNY-ESO-1/His(+)**TK**  
**B2** – lisado de CL-14 transfectado com pRockNY-ESO-1/gp63**TK**  
**B2-2** – sobrenadante de cultura de CL-14 transfectados com pRockNY-ESO-1/gp63**TK** ((10 vezes concentrado)

Figura 10





A2- CL-14 NYESO-1/gp63 transfectados com pRockTK

B1- CL-14 transfectados com pRockNYESO-1/His-TK

B2- CL-14 transfectados com pRockNYESO-1/gp63-TK

C1- CL-14 transfectados com pRockNYESO-1/His e pRockTK

C2- CL-14 transfectados com pRockNYESO-1/gp63 e pRockTK

**Figura 11**

**RESUMO****CEPA TRANSGÊNICA ATENUADA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* COMO VETOR VACINAL**

A presente invenção descreve uma cepa transgênica atenuada de *Trypanosoma cruzi* e sua utilização como vetor vacinal. Além disto, descreve-se um método de transformação de cepa atenuada de *Trypanosoma cruzi* com genes exógenos para obtenção deste vetor vacinal. Esta estratégia de vacinação pode ser usada no tratamento de doenças que necessitam de indução de uma resposta imune mediada por células, como o câncer e doenças causadas por microrganismos intracelulares, como a toxoplasmose, a malária, a tuberculose entre outras.