**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

MIRIAN GALLIOTE MORALE

**Desenvolvimento de vacina terapêutica
contra HPV16**

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
26/11/2009

MIRIAN GALLIOTE MORALE

**Desenvolvimento de vacina terapêutica
contra HPV16**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

São Paulo
2009

Mirian Galliote Morale

Desenvolvimento de vacina terapêutica contra HPV16

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em

.....

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Dedico à minha família.
Cujo apoio e amor
tornam tudo possível*

AGRADECIMENTO(S)

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em bioquímica, pela oportunidade em realizar o curso de mestrado.

À FAPESP, pela bolsa concedida e à Fundação Butantan e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Dr. Paulo Lee Ho, pelos ensinamentos e conselhos, pela confiança em meu trabalho e pela compreensão.

Ao professor Luis Carlos De Souza Ferreira (ICB-USP), pelo apoio e conselhos.

Ao Prof. Sjoerd van der Burg, pelos ensinamentos e oportunidades de aprendizado.

À Dr. Maria Leonor Sarno de Oliveira, pela disposição e ajuda.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, pelo apoio.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular I, que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável, pelo carinho, amizade, preocupação e pela ótima convivência durante esse período.

À minha família e amigos, pelo apoio, compreensão, dedicação, carinho e amor.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão, carinho e respeito.

RESUMO

Morale, M.G. **Desenvolvimento de vacina terapêutica contra HPV16. 2009.** 78p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O câncer cervical é o segundo câncer mais comum entre mulheres no mundo. A maioria dos casos (83%) ocorre em países em desenvolvimento, onde são encontrados em estágios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é de cerca de 49% após cinco anos. Portanto, uma vacina eficaz contra as infecções pelo HPV pode levar ao controle do câncer do colo do útero. Apesar de prevenir, a vacina profilática não é acessível em função do alto custo, além de não eliminar o vírus em mulheres já infectadas pelo HPV.

Assim, propusemos o desenvolvimento de uma vacina terapêutica eficaz utilizando duas abordagens: VLPs (*virus-like particles*) quiméricas, que poderiam apresentar propriedades profiláticas e terapêuticas, obtidas da fusão das proteínas L1 e E7; proteínas quiméricas obtidas a partir da fusão de epítomos das proteínas E6 e E7 do HPV16, com e sem ubiquitina.

Após subclonagens, com a obtenção dos vetores pPICHOLI-L1 Δ CE7₁₋₅₀ e pPICHOLI-L1 Δ CE7₄₃₋₇₇, partiu-se para a indução da expressão das VLPs quiméricas em *Pichia pastoris*, das quais não foram detectadas expressão protéica. Realizaram-se inúmeras modificações no protocolo de indução. Mesmo após essas alterações não foi detectada nenhuma expressão das fusões L1 Δ CE7₁₋₅₀ ou L1 Δ CE7₄₃₋₇₇.

Como alternativa de uma vacina terapêutica, nos propusemos a expressar em *E. coli* proteínas sintéticas originadas da fusão entre epítomos das proteínas E6 e

E7 do HPV16, com ou sem Ubiquitina, visando aumentar a apresentação de peptídeos via MHC de classe I de modo a estimular a eliminação de células infectadas com HPV16, evitando e regredindo o desenvolvimento dessas células cancerosas.

Com a proteína E6E7 solúvel e purificada, realizou-se um ensaio de imunização. Nesse experimento, 20% dos animais imunizados com a proteína E6E7 não apresentaram desenvolvimento de tumor após a inoculação de células TC1. Assim isso nos leva a crer que com o aumento da concentração de proteína e utilização de adjuvantes seria possível aumentar o número de animais resistentes ao desenvolvimento do tumor.

Em um segundo experimento de imunização, comparamos as proteínas E6E7 e E6E7Ub, em duas concentrações, 15 e 40 µg, e também com ou sem o adjuvante *whole cell pertussis* (WCP). Independentemente da concentração e presença ou ausência de WCP, os grupos imunizados com E6E7Ub apresentaram proteção contra o tumor entre 80% e 100% dos camundongos, enquanto os grupos imunizados com E6E7 apresentaram proteção entre 0% e 25%.

Esses resultados são promissores, ainda que preliminares, indicando um potencial de uso da proteína E6E7Ub como imunógeno para vacina terapêutica contra o câncer cervical induzido por HPV16.

Palavras-chave: HPV16, oncoproteínas, ubiquitina, L1, E6 e E7.

ABSTRACT

Morale, M.G. **Development of a therapeutic vaccine against HPV16. 2009.** 78p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide. Most cases (83%) occur in developing countries, where they are found in relatively advanced stages and, consequently, the median survival is about 49% after five years. Therefore, an effective vaccine against HPV infections can lead to control of cancer of the cervix. Although preventable, the prophylactic HPV vaccine is not accessible to all due to their high cost and in addition the vaccine does not eliminate the HPV in infected women.

We have therefore proposed the development of effective therapeutic vaccines using two approaches: chimeric VLPs (virus-like particles), endowed with prophylactic and therapeutic properties, obtained from the fusion protein L1 and E7; chimeric proteins derived from the fusion of epitopes of proteins E6 and E7 of HPV16 with and without ubiquitin.

After subcloning, we obtained the vectors pPICHOLI-L1 Δ CE7₁₋₅₀ and L1 pPICHOLI- L1 Δ CE7₄₃₋₇₇. After transformation of yeast *Pichia pastoris* with these constructions, the cells were induced, but it was not possible to detect any recombinant protein expression.

As an alternative, we proposed the expression of synthetic proteins in *E. coli* derived from the fusion between epitopes of E6 and E7 proteins of HPV16 with or without Ubiquitin, in order to enhance the presentation of peptides through MHC

class I to stimulate the elimination of HPV16-infected cells, preventing and regressing the development of cancer cells.

Soluble E6E7 protein was purified and, 20% of the animals immunized with this protein did not develop tumor after inoculation of TC1 cells.

In a second immunization experiment we compared the proteins E6E7 and E6E7Ub, in two concentrations, 15 and 40µg, with or without the adjuvant *whole cell pertussis* (WCP). Regardless of concentration and presence or absence of WCP, all the groups immunized with E6E7Ub showed protection against tumor between 80% and 100%, while the groups immunized with E6E7 showed protection from 0% to 25%.

These results are promising and although preliminary, indicate the potential of E6E7Ub protein as an immunogen, for a therapeutic vaccine against cervical cancer induced by HPV16.

Keywords: HPV16, oncoproteins, ubiquitin, L1

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1: Esquema do genoma e do ciclo de infecção viral do HPV16.	16
Figura 2: Modelo de progressão da carcinogênese cervical.	18
Figura 3: Representação esquemática da integração do DNA de HPV16 durante a oncogênese..	18
Figura 4: Micrografia eletrônica de VLPs de papillomavírus humano (HPV16)..	21
Figura 5: Modelos de apresentação cruzada.....	25
Figura 6: Esquema das etapas realizadas para síntese de fragmentos E7 e fusões com L1ΔC..	32
Figura 7: Mapa do vetor pPICHOLI da MoBiTec com a indicação dos sítios de restrição no sítio múltiplo de clonagem e do vetor pAE.....	38
Figura 8: Amplificação da L1ΔC.....	48
Figura 9: Amplificações para síntese das L1 quiméricas.....	49
Figura 10: Cromatogramas de um clone pGEMT-L1ΔCE7 ₁₋₅₀ comparados com a sequência esperada.	50
Figura 11: Western Blot de induções de L1ΔCE7 ₁₋₅₀ em <i>Pichia pastoris</i> (membrana corada sobreposta ao filme revelado).....	51
Figura 12: Western Blot de induções de L1 em <i>Pichia pastoris</i> (membrana corada sobreposta ao filme revelado).....	52
Figura 13: Esquema da fusão entre regiões da proteína E6 e E7 do HPV16 com Ubiquitina..	54
Figura 14: Digestão <i>screening</i> de clones da ligação entre pAE e E6E7Ub com as enzimas de restrição <i>BamHI</i> e <i>PvuII</i>	55
Figura 15: Alíquotas da indução de E6E7.	56
Figura 16: Alíquotas da indução de E6E7Ub.	57
Figura 17: Alíquotas da purificação de E6E7Ub em 8M Uréia em coluna de níquel.	57
Figura 18: Alíquotas da purificação de E6E7 em coluna de níquel.	58
Figura 19: Purificação de E6E7Ub.....	59
Figura 20: Alíquotas da purificação de E6E7 solúvel em coluna de níquel.	59
Figura 21: Gráfico referente ao desenvolvimento do tumor para três grupos imunizados. 1.	61
Figura 22: Alíquota purificada de E6E7 para quantificação.	61
Figura 23: Gráfico da distribuição da concentração de IgG no soro por camundongo por grupo.,.....	64
Figura 24: Gráfico referente a média de produção de IgG total por grupo e desvio padrão.	64
Figura 25: Gráfico referente ao desenvolvimento do tumor para dez grupos imunizados..	65
Tabela 1: Proteínas do papillomavirus, (Frazer, 2004).....	15
Tabela 2: Epítomos da proteína E7 do HPV16.	53
Tabela 3: Epítomos da proteína E6 do HPV16.....	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Histórico: Câncer Cervical X HPV	13
1.2	Papillomavirus Humano (HPV)	14
1.3	Progressão do câncer do colo de útero	17
1.4	Vacinas Profiláticas	20
1.5	Vacinas Terapêuticas	21
1.5.1	VLPs quiméricas	21
1.5.2	Outras abordagens para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas	22
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Ferramentas de bioinformática	27
3.2	Linhagens celulares	27
3.3	Oligonucleotídeos	28
3.4	Plasmídeos	29
3.5	Meios de cultura	30
3.6	Técnicas de biologia molecular	31
3.7	Síntese de regiões do gene E7 de HPV16 e fusão com L1ΔC	31
3.8	Reação de PCR	33
3.9	Clonagem utilizando kit “pGEM-T easy” (Promega)	33
3.10	Quimiotransformação de bactérias competentes	34
3.11	Extração de plasmídeo em pequena escala. (Mini-prep por lise alcalina)	34
3.12	Seqüenciamento	35
3.13	Eletroforese em gel de agarose	36
3.14	Extração de DNA de géis de agarose.	37
3.15	Digestão por enzimas de restrição	37
3.16	Subclonagens para vetor de expressão (pAE e pPICHOLI)	37
3.17	Expressão com os vetores bacterianos em BL21(DE3)pLysS	38
3.18	Expressão e lise com os vetores eucarióticos em Pichia pastoris	39
3.19	Extração e retirada de uréia das proteínas expressas em E. coli	40
3.20	Purificação por Cromatografia de afinidade por níquel	41
3.21	Purificação por Cromatografia de afinidade por níquel – protocolo modificado	42
3.22	Monitoramento da expressão e purificação das proteínas:	42
3.23	Quantificação das proteínas	43
3.24	Cultura Celular	44
3.25	Congelamento de células eucariotas	44
3.26	Preparação de células TC-1 para inoculação	45
3.27	Ensaio de imunização com as proteínas purificadas e desafio	45
3.28	Segundo ensaio de imunização e desafio	46
3.29	ELISA	47
4	RESULTADOS	48

4.1	Desenvolvimento das VLPs quiméricas L1E7	48
4.2	Desenvolvimento das proteínas de fusão E6E7Ub e E6E7	52
4.2.1	Determinação dos epítomos e desenho da fusão.....	52
4.2.2	Subclonagem em pAE	55
4.2.3	Expressão protéica e Purificação	56
4.2.4	Ensaio de imunização.....	60
5	DISCUSSÃO	66
5.1	Desenvolvimento das VLPs quiméricas L1E7	66
5.2	Desenvolvimento das proteínas de fusão E6E7Ub e E6E7	70
5.2.1	Determinação dos epítomos e desenho da fusão.....	70
5.2.2	Purificação e Imunizações	72
6	CONCLUSÃO	77
6.1	Desenvolvimento das VLPs quiméricas L1E7	77
6.2	Desenvolvimento das proteínas de fusão E6E7Ub e E6E7	77
6.2.1	Determinação dos epítomos e desenho da fusão.....	77
6.2.2	Purificação e Imunizações	77
7	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico: Câncer Cervical X HPV

O câncer cervical é o segundo câncer mais comum entre mulheres no mundo; 493000 mulheres foram diagnosticadas com câncer cervical e foram registradas 274000 mortes em 2002 (Parkin *et al.*, 2005). A maioria dos casos (83%) ocorre em países em desenvolvimento, onde programas como o teste Papanicolaou não foram implementados com sucesso (Wright *et al.*, 2006).

Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 59 a 69%. Nos países em desenvolvimento, os casos são encontrados em estágios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é de cerca de 49% após cinco anos (INCA, 2005).

Os esforços para identificar e eliminar o câncer do colo do útero foram iniciados na década de vinte, quando introduziu-se o conceito de utilização de testes citológicos para identificar mulheres com câncer cervical invasivo; subseqüentemente com o refinamento da técnica, pôde-se também identificar lesões cervicais pré-cancerosas. Posteriormente, em meados de 1960, a citologia cervical passou a ser amplamente utilizada em países desenvolvidos como uma técnica para a prevenção do câncer (IARC, 2005).

Nos países que estabeleceram eficientes programas de utilização do então chamado teste Papanicolaou, a incidência de câncer do colo do útero chegou a diminuir em aproximadamente 75% (IARC, 2005).

Outro avanço significativo ocorreu na década de 80 com a descoberta da associação entre o papillomavirus humano (HPV) e o câncer cervical (Zur Hausen,

1991). Os vinte anos seguintes foram marcados por estudos epidemiológicos que demonstraram que a infecção por tipos específicos de HPV, conhecidos como de alto risco ou carcinogênicos, são responsáveis por levar ao desenvolvimento do câncer cervical. Esse foi o primeiro câncer a ser 100% atribuído a uma infecção (Bosch e De Sanjose, 2003).

Os oito tipos mais comuns de HPV detectados são, em ordem decrescente de frequência: HPV 16,18,45,31,33,52,58. Esses oito tipos são responsáveis por cerca de 90% de todos os cânceres cervicais do mundo (Wright *et al.*, 2006).

1.2 *Papillomavirus Humano (HPV)*

O papillomavirus (PV) é responsável por uma gama muito diversa de lesões epiteliais, infectando epitélios cutâneos e mucosos, e causando desde lesões benignas à carcinomas. Considerando o homem como o hospedeiro mais bem estudado, foram descritos aproximadamente cem tipos de HPV baseado no isolamento do genoma completo, e presume-se a existência de um número ainda maior, baseado na detecção de amplificações subgenômicas (De Villiers *et al.*, 2004).

Os PVs são classificados como pertencentes à família *Papillomaviridae*, e divididos em basicamente dezesseis gêneros, sendo o mais diverso deles o gênero *Alpha-papillomavirus*. Nesse gênero encontram-se os HPVs que infectam a mucosa genital, desses mais de trinta são conhecidos por infectar o epitélio cervical e parte está associado a lesões que podem progredir a câncer (Doorbar, 2006).

Os HPVs associados ao câncer são classificados como tipos de alto-risco, sendo o mais prevalente na população o HPV 16, que sozinho é responsável por aproximadamente 50% de todos os cânceres cervicais (Doorbar, 2006).

Todos os papillomavirus compartilham um número de características e possuem genoma composto por DNA circular dupla-fita de aproximadamente 8000 pb contido num capsídeo icosaédrico (De Villiers *et al.*, 2004).

O genoma do HPV apresenta oito ORFs, que codificam por sua vez as proteínas apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Proteínas do papillomavirus, (Frazer, 2004).

Proteína	Localização Celular	Função
L1	Nuclear	Majoritária proteína do capsídeo / Atua na Infectividade
L2	Nuclear	Minoritária proteína do capsídeo / Ajuda no empacotamento do DNA
E1	Nuclear	Participa na replicação episomal / DNA helicase
E2	Nuclear	Fator de Transcrição
E4	Citoplasmática	Participa no empacotamento do vírus
E5	Citoplasmática	Previne a diferenciação celular / Contribui na amplificação do genoma viral
E6	Nuclear	Previne a diferenciação celular / Promove a degradação de p53 / Impede a apoptose
E7	Nuclear	Previne a diferenciação / inibe os inibidores do fator de transcrição E2F aumentando a proliferação celular

O ciclo de infecção viral do papillomavirus (Fig. 1) inicia-se após a introdução do HPV nas células-tronco epiteliais presentes na camada basal, onde a expressão das proteínas virais não estruturais inicia-se. Sob a regulação dessas proteínas, a população de células se dividindo expande verticalmente e a diferenciação celular é inibida. As proteínas virais são expressas seqüencialmente e os virions maduros são produzidos somente na camada mais superficial do epitélio. (Frazer, 2004).

A expressão das proteínas oncogênicas E6 e E7, na presença de baixos níveis das proteínas de regulação e replicação E1, E2, E4 e E5, permite a manutenção do genoma viral (manutenção do genoma e proliferação celular). Quando há a elevação nos níveis destas proteínas de replicação, ocorre o estímulo para a amplificação do genoma viral. A expressão dos genes tardios, com a expressão inicialmente de L2 permite por fim o empacotamento do genoma, com a expressão de L1 permitindo a formação dos vírions infecciosos (montagem do vírus) (Doorbar, 2006).

1.3 Progressão do câncer do colo de útero

A apresentação de lesões cervicais reflete mudanças moleculares no programa normal de diferenciação das células epiteliais, podendo progredir de neoplasias de menor grau até câncer, caracterizado principalmente pela capacidade das células infectadas invadirem outros tecidos (Fig. 2) (Wentzensen & Klug, 2009).

Normalmente o genoma viral, durante o ciclo de vida natural do vírus, permanece na forma epissomal no núcleo da célula infectada. Já no caso de células transformadas, observou-se que o genoma viral apresenta-se integrado ao genoma da célula infectada e que freqüentemente apresenta a perda ou interrupção do gene E2 (Fig. 3). Tanto o local da integração quanto a perda de E2 podem levar ao desenvolvimento do câncer, principalmente devido a desregulação da expressão de E6 e E7, que passam a ser altamente expressas (Von Knebel Doeberitz, 2002).

Figura 2: Modelo de progressão da carcinogênese cervical. Alterações morfológicas (linha de cima) e funcionais (linha do meio). Abaixo são indicados biomarcadores representativos das transições entre as fases da doença. CIN: Neoplasia Intraepitelial Cervical, graus de desenvolvimento 1, 2 e 3. (Wentzensen & Klug, 2009).

Figura 3: Representação esquemática da integração do DNA de HPV16 durante a oncogênese. Adaptação de Vinther et al, 2005.

Esse evento é crítico para as características de maior crescimento das células de câncer cervical já que E6 e E7 atuam de modo pleiotrópico, interferindo com a repressão natural do ciclo de divisão celular em diferentes níveis, estimulando a proliferação celular independentemente de *check points*. Este quadro favorece o aumento da frequência com que mutações são acumuladas no genoma, além de

impedir que a célula entre em apoptose apesar do acúmulo de aberrações genômicas, o que, por fim, pode levar ao estabelecimento de células cancerosas (Munger e Howley, 2002; Duensing e Munger, 2004).

Embora a integração do DNA do HPV seja encontrada na maioria dos cânceres cervicais, outros fatores influenciam o desenvolvimento das mudanças premalignas. Estes incluem a exposição a glicocorticóides e progesterona, que podem afetar a expressão dos oncogenes virais e a regulação da expressão gênica viral por metilação do DNA e organização da cromatina (Doorbar, 2006).

Embora muitos tipos de HPV possam infectar o colo do útero, apenas os tipos de HPV de alto risco estão associados com câncer do colo do útero, devido à atividade específica de suas oncoproteínas, como no caso do HPV16 onde a expressão desses genes facilita a integração de seu DNA no cromossomo da célula hospedeira (Doorbar, 2006).

Apesar da expressão aberrante de oncogenes dos tipos de HPV de alto risco predispor ao desenvolvimento de câncer cervical, sua expressão em si não é considerada suficiente. É geralmente aceito que a oncogênese mediada pelo papilomavírus requer o acúmulo adicional de alterações genéticas que ocorrem ao longo do tempo após a infecção inicial (Doorbar, 2006).

Isso é consistente com a observação da associação entre idade de pacientes e gravidade das lesões cervicais (Fernandes et al., 2009), já que a persistência da infecção pelo HPV durante muitos anos, permite o acúmulo de mutações necessárias para o desenvolvimento do câncer (Doorbar, 2006).

1.4 Vacinas Profiláticas

As vacinas contra HPV que atualmente são licenciadas para a aplicação em humanos possuem propriedade profilática contra futuros contatos com o vírus. Acredita-se que o funcionamento das vacinas profiláticas esteja relacionado com a produção de anticorpos neutralizantes, atuando de forma a impedir o vírus de infectar as células-alvo e assim, prevenindo o desenvolvimento da doença associada à infecção (Fraser, 2004).

Os primeiros estudos usaram como vacina virions de papillomavirus bovino inativados por formol, e mostraram-se bem sucedidos, já que essa vacinação induzia anticorpos específicos e prevenia infecções com o vírus. Mas, a reprodução do ciclo de vida do vírus *in vitro* exige a diferenciação de células epiteliais, o que dificulta o cultivo e até o momento, não é possível produzir quantidades suficientes de vírus para gerar uma vacina em larga escala (Jarrett *et al.*, 1990; Frazer, 2006).

A alternativa para a produção de vacina surgiu com a obtenção de partículas similares ao vírus (*virus-like particles*, VLPs) de HPV (Fig. 4), que previnem infecções pois induzem a formação de anticorpos neutralizantes, tornando-se assim o candidato mais viável da vacina profilática (Greenstone *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998).

Atualmente, foram licenciadas duas vacinas profiláticas contra HPV: Gardasil® (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ USA), vacina quadrivalente composta por VLPs dos HPVs dos tipos 6, 11, 16, e 18; e Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium), vacina bivalente contendo VLPs dos tipos 16 and 18. A eficácia de ambas as vacinas foi comprovada, contudo nenhuma delas demonstrou propriedade terapêutica contra infecções e lesões associadas ao HPV (Schiller *et al.*, 2008).

Figura 4: Micrografia eletrônica de VLPs de papillomavírus humano (HPV16). Barra representa 100 nm (Xu, Zhang et al., 2006).

1.5 Vacinas Terapêuticas

1.5.1 VLPs quiméricas

Pode-se também, desenvolver vacinas com o intuito de erradicar células já infectadas. Tais vacinas, conhecidas como terapêuticas, funcionam de modo a ativar linfócitos T antígeno-específicos que atuam em mecanismos usados pelo sistema imune do hospedeiro para controlar e erradicar infecções virais. Assim, a eliminação de células infectadas através de uma vacina terapêutica é o objetivo quando o patógeno viral já está presente (Frazer, 2004).

Quando regressões em lesões em humanos e animais associadas ao papillomavirus foram observadas, notou-se que essas estavam associadas a infiltrados celulares de linfócitos T (Frazer, 2004). Evidências de resposta celular específica contra algumas proteínas não-estruturais indicaram que respostas contra a proteína E7 estavam correlacionadas com a erradicação da doença. (Kadish *et al.*, 2002; Zwaveling

et al., 2002). Assim, E6 e E7 são as proteínas mais interessantes para a produção de vacinas terapêuticas e L1, para vacinas profiláticas, devido principalmente a suas funções no início e na progressão da doença. Assim, com o intuito de agregar a característica terapêutica à vacina profilática desenvolvida com VLPs, o passo seguinte foi o desenvolvimento de VLPs quimérica.

As partículas virais do HPV foram empregadas por diversos grupos como veículos de entrega de epítomos. (Muller *et al.*, 1997), ao constatarem que a região C-terminal de L1 do HPV16, correspondente aos últimos 34 aminoácidos, era desnecessária para a formação da partícula, realizaram substituições dessa região por partes da proteína E7 do HPV16. Obtendo com isso excelentes resultados, passou-se a explorar as partículas quiméricas para entrega de epítomos, viabilizando-se assim o desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas.

1.5.2 Outras abordagens para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas

O estudo realizado por Woo *et al.*, 2009, mostrou que a maioria das lesões de menor grau persiste ou progride no primeiro ano. Sendo isso acompanhado por falha do sistema imune, já que a maioria dos pacientes HPV16 + e lesões de menor grau não apresentaram reação quando suas células T foram expostas a peptídeos de E2, E6 e E7 do HPV16.

Portanto, para haver o controle do câncer de colo de útero, uma vacina eficaz contra as infecções pelo HPV deve estimular o sistema imune dos pacientes contra peptídeos das proteínas E6 e E7, principalmente. Assim, diversas estratégias de desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra câncer de colo de útero têm sido pesquisadas.

A perda de epitopos imunogênicos por tumores tem estimulado o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra múltiplos epitopos. Tecnologias de DNA recombinante têm aberto a possibilidade de desenvolver vacinas multiepítotos em uma forma relativamente rápida.

Um exemplo é o estudo utilizando-se vacina de DNA contra o HPV16 usando calreticulina humana (CRT), ligado às proteínas precoces E6 e E7 do HPV16 e à proteína tardia L2. Descobriu-se que a vacinação com essa vacina de DNA induz uma potente resposta imune celular T CD8⁺ E6/E7-específica, resultando em um significativo efeito terapêutico contra células tumorais expressando E6/E7 (Kim *et al.*, 2008).

Outra estratégia utiliza vacinas derivadas de plantas que representam uma estratégia alternativa imunoterápica para o câncer. Nesse caso, avaliaram a atividade anti-tumoral de uma vacina baseada na proteína E7 do HPV-16 fusionada ao β -1,3-1,4-glucanase de *Clostridium thermocellum*, produzida em *Nicotiana benthamiana*. Observou-se inibição do crescimento tumoral e aumento da sobrevida nos grupos tratados com a vacina (Venuti *et al.*, 2009).

Foi testada em camundongos uma vacina de DNA contendo epítotos CTL, Th e de células B da proteína E7 do papilomavírus humano tipo 16. Neste caso a adição de separadores entre os epitopos foi crucial para a indução de proteção e somente após a associação com ubiquitina houve erradicação de 100% dos tumores de 7 dias estabelecidos em camundongos (Velders *et al.*, 2001).

A rápida degradação de proteínas específicas pelo percurso ubiquitina-proteassomo-dependente é um componente de muitos mecanismos reguladores

celulares. A complexidade do sistema ubiquitina reflete-se no amplo leque de processos que regula; estas incluem as medidas essenciais na progressão do ciclo celular, transformação de proteínas para a apresentação por moléculas MHC de classe I, e o controle da proliferação celular (Hochstrasser, 1995).

Apesar da ampla utilização da ubiquitina em vacinas de DNA, devido a essas apresentarem uma via clássica de apresentação para MHC de classe I, é possível a utilização da ubiquitina em proteínas de fusão. A possibilidade surge devido a apresentação cruzada, apresentada na Figura 5 via D, onde antígenos exógenos podem ser internalizados e direcionados para a degradação via proteassoma dependente de ubiquitina (Groothuis e Neefjes, 2005).

Também foi avaliado o efeito de uma vacina contra peptídeos longos sintéticos das proteínas E6 e E7 do papilomavírus humano tipo 16 (HPV16) em pacientes com câncer do colo do útero. Foram detectadas respostas dependentes de células T contra o HPV16 E6 e E7 em seis de seis e cinco dos seis pacientes, respectivamente. Essas respostas podem ser detectadas até 12 meses após a última vacinação (Kenter *et al.*, 2008).

Os longos peptídeos sintéticos E6 e E7 do HPV16 são altamente imunogênicos, na medida em que aumentam o número e a atividade de células T CD4⁺ e CD8⁺ HPV16-específicas. A expansão de células T tumor-específicas CD4⁺ e CD8⁺, ambas consideradas importantes na resposta imunoterapêutica antitumor, indica o potencial desta vacina (Van Den Hende *et al.*, 2008).

Figura 5: Modelos de apresentação cruzada. Na via clássica de apresentação de antígeno, os antígenos intracelulares são degradados pelo proteossoma e peptidases. Uma fração resultante dos peptídeos associam-se com o transportador associado ao processamento de antígenos (TAP) na membrana do retículo endoplasmático no qual moléculas de MHC de classe I recém-sintetizadas são presas até serem carregadas com peptídeos. O complexo MHC classe I-peptídeo, em seguida, deixa o ER e é transportado para a membrana plasmática. Antígenos extracelulares podem entrar neste caminho de várias maneiras. (A) Gap junction permite a transferência direta de peptídeos de células infectadas no citosol das DCs. (B) moléculas de MHC de classe I podem entrar na via de reciclagem e peptídeos. (C) componentes do RE tornam-se parte integrante da via fagossomal. O caminho ERAD, em seguida, exporta antígenos exógenos do fagossomo para o citosol e TAP permite retro-transporte de peptídeos de volta para o fagossomo. (D) antígenos exógenos podem ser transportados através da membrana endossomal (E) Exossomos secretados por células infectadas podem se ligar a DCs para a apresentação cruzada. (Groothuis e Neefjes, 2005).

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Produção de vacina terapêutica contra o HPV16.

Para tanto propomos duas abordagens:

- Desenvolvimento de VLPs quiméricas, contendo propriedades profiláticas e terapêuticas, originadas da fusão entre as seqüências otimizadas dos epítomos da E7 do HPV16 equivalentes aos aminoácidos 1 a 50 ($E7_{1-50}$) e 43 a 77 ($E7_{43-77}$) com a L1 truncada (sem os 35 últimos aminoácidos) do HPV16 obtendo duas quimeras: $L1\Delta C-E7_{1-50}$ e $L1\Delta C-E7_{43-77}$;
- Desenvolvimento de proteínas quiméricas obtidas a partir do fusionamento de epítomos das proteínas E6 e E7 do HPV16 com e sem ubiquitina, obtendo as proteínas denominadas E6E7 e E6E7Ub.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ferramentas de bioinformática

Para desenho de oligonucleotídeos, estudo de sequências nucleotídicas e de características protéicas, foram utilizados os programas contidos no “Lasergene sequence analysis software” da DNASTar Inc, e as ferramentas encontradas nos servidores IDT DNA (www.idtdna.com), ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>) e Mobyle portal (<http://mobyle.pasteur.fr/>). Para desenhar os plasmídeos disponíveis e construídos foi utilizado o programa VectorNTI (Invitrogen).

3.2 Linhagens celulares

DH5 α : *supE44 Δ alcU169(ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyra96 thi-1 relA1*
(Sambrook *et al.*, 1989).

BL21(DE3)pLysS: *F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻) gal dcm λ (DE3) [pLysS Cam^r]*
(Novagen)

KM71: *Pichia pastoris aox1 Δ ::SARG4 his4 arg4* (Invitrogen),

TC1: Células epiteliais primárias de camundongos C57/Black imortalizadas pelas proteínas E6 e E7 do HPV-16 e transformadas com o oncogene c-Ha-ras. A co-transformação resulta numa linhagem celular oncogênica expressando E6 e E7. Esta linhagem celular mimetiza a progressão natural do tumor de colo do útero, proporcionando assim um modelo para comparar o potencial de vacinas terapêuticas contra o câncer cervical. (Lin *et al.*, 1996)

3.3 Oligonucleotídeos

Para obtenção do gene L1 do HPV16:

L1 cod_opt FW: 5' ACC **ATG** TCT TTG TGG TTG CCA 3' (*start codon*)

Temperatura de anelamento: 58°C.

Para a síntese de E7₁₋₅₀:

E7-1 FW: 5' ACT CCA ACT TTG CAC GAA TAC ATG TTG GAC TTG CAG CCA
GAG ACT ACT 3'

E7-2 FW: 5' TAC GAA CAG TTG AAC GAC TCT TCT GAG GAA GAG GAC GAA
ATC GAC GGT 3'

E7-3 RV: 5' TTC GTG CAA AGT TGG AGT GTC ACC GTG CAT CTG CAA CAA
GAA CTT TCT 3'

E7-4 RV: 5' GTC GTT CAA CTG TTC GTA ACA GTA CAA GTC AGT AGT CTC
TGG CTG CAA 3'

E7-5 RV: 5' **TTA** AGC TCT GTC TGG CTC AGC CTG ACC AGC TGG ACC GTC
GAT TTC GTC CTC 3' (*stop codon*) Temperatura de anelamento: 65°C.

Para a síntese de E7₄₃₋₇₇:

E7-9 FW: 5' AGA GCT CAC TAC AAC ATC GTT ACT TTC TGT TGT AAG TGT
GAC TCT ACT TTG AGA 3'

E7-10 RV: 5' GAT GTT GTA GTG AGC TCT GTC TGG CTC AGC CTG ACC CTG
CAA CAA GAA CTT TCT 3'

E7-11 RV: 5' **TTA** TCT GAT GTC AAC GTG AGT AGA CTG AAC ACA CAA TCT
CAA AGT AGA GTC ACA 3' (*stop codon*) Temperatura de anelamento: 60°C.

Oligonucleotídeos usados para sequenciamento:

Foram utilizados os oligonucleotídeos **M13f** e **M13r**, **T7f** e **pRESETr** obtidos através da Invitrogen™.

3.4 Plasmídeos

- pGEM-T easy: plasmídeo do kit pGEM®-T easy Vector System da Promega, usado para a clonagem de genes amplificados por PCR, apresenta no sítio de clonagem alguns sítios de restrição para posterior subclonagem.
- pPICHOLI: plasmídeo do kit da MoBiTec., desenvolvido para expressão tanto em *Pichia pastoris* quanto em *E. Coli*. Possui o promotor de levedura AOX, fortemente induzido por metanol e o promotor bacteriano T7.
- pAE: vetor bacteriano para expressão sob influência do promotor T7, construído neste laboratório (Ramos, Abreu *et al.*, 2004).
- pUC 57: vetor comercial da Invitrogen™, utilizado pela GenScript para clonagem de genes sintéticos.
- pPICHOLI - L1: vetor de expressão da proteína L1 do HPV16 (Bazan *et al.*, 2009)
- pGEM-T - L1ΔC-E7₁₋₅₀: vetor bacteriano contendo a sequência do gene da proteína L1 sem a região C-terminal (últimos 34 aminoácidos) fusionada à sequência do gene da proteína E7 equivalente aos aminoácidos de 1 a 50.
- pGEM-T - L1ΔC-E7₄₃₋₇₇: vetor bacteriano contendo a sequência do gene da proteína L1 sem a região C-terminal (últimos 34 aminoácidos) fusionada à sequência do gene da proteína E7 equivalente aos aminoácidos de 43 a 77.

- pPICHOLI - L1 Δ C -E7₁₋₅₀: vetor para expressão em *Pichia pastoris* contendo a sequência do gene da proteína L1 sem a região C-terminal (últimos 34 aminoácidos) fusionada a sequência do gene da proteína E7 equivalente aos aminoácidos de 1 a 50.
- pPICHOLI - L1 Δ C -E7₄₃₋₇₇: vetor para expressão em *Pichia pastoris* contendo a sequência do gene da proteína L1 sem a região C-terminal (últimos 34 aminoácidos) fusionada a sequência do gene da proteína E7 equivalente aos aminoácidos de 43 a 77.
- pUC 57 – E6E7Ub: vetor contendo a sequência gênica da fusão entre epítomos da proteína E6 e E7 do HPV16 e da ubiquitina, sintetizado pela GenScript.
- pAE-E6E7Ub: vetor de expressão bacteriana, com a fusão das sequências gênicas de epítomos da proteína E6, da proteína E7 e da sequência da proteína ubiquitina.
- pAE-E6E7: vetor de expressão bacteriana, com a fusão das sequências gênicas de epítomos da proteína E6, da proteína E7.

3.5 Meios de cultura

Meio BMMY: extrato de levedura 1,0%; triptona 1,0%; tampão fosfato 100mM (K₂HPO₄, KH₂PO₄) 10%; 0,4 mg biotina; YNB 10%.

Meio BMMY com antibiótico: meio BMMY estéril acrescido com o antibiótico zeocina a uma concentração de 100 µg/mL.

Meio Luria Bertani (LB): triptona 1,0%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,5%; Tris (pH 7,4) 10 mM; MgSO₄ 1mM.

Meio LB com antibióticos: meio LB estéril acrescido com o antibiótico ampicilina a uma concentração final de 100 mg/mL, ou zeocina a 25 µg/mL.

Meio LB agar com antibióticos: meio LB acrescido com agar bacteriológico 3% antes da esterilização. Adicionaram-se os antibióticos ampicilina na concentração 100 mg/mL ou zeocina a 25 µg/mL antes do meio solidificar em placas de cultura bacteriana.

Meio YPD: extrato de levedura 1,0%; triptona 1,0%; glicose 2,0%.

Meio YPD com antibiótico: meio YPD estéril acrescido com o antibiótico zeocina a uma concentração de 100 µg/mL.

Meio YPD agar com antibiótico: meio YPD acrescido com agar antes da esterilização e após, adicionou-se zeocina a uma concentração final de 100 µg/ml.

Meio DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Médium com 4500 mg/L de glicose, L-glutamina, piruvato de sódio e bicarbonato de sódio.

Meio DMEM 10% SFB: meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino.

Meio de congelamento: meio DMEM acrescido de 35% de soro fetal bovino e 10% de Dimetilsulfóxido.

3.6 Técnicas de biologia molecular

As técnicas de biologia molecular seguem os protocolos descritos em Sambrook *et al.*, 1989.

3.7 Síntese de regiões do gene E7 de HPV16 e fusão com L1ΔC

Para as sínteses (Fig. 6), realizaram-se reações contendo: 2,5 µL de cada oligonucleotídeo (25 µM), 1 µL de DNA-polimerase *Taq* (InvitrogenTM), 1 µL de dNTP *mix* (10 mM), 5 µL de tampão de reação 10x, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM). As reações

foram colocadas em termociclador pTC-100™ Programable Thermal Controller da MY Research, Inc .

O programa utilizado era composto de uma fase de desnaturação de 94 °C por 2 minutos após o qual se iniciavam 30 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 30 °C por um minuto e meio e 72 °C por 30 segundos. A seguir o programa era encerrado por uma fase de 72 °C por 5 minutos. Similar ao descrito em Withers-Martinez *et al.* 1999.

O fragmento correspondente a L1ΔC foi amplificado por PCR (item 1.8) e em seguida fusionado aos fragmentos sintetizados de E7 através de um novo ciclo de montagem, similar ao utilizado para a síntese. Após o ciclo de montagem o fragmento correspondente a fusão dos genes foi amplificado por PCR para posterior clonagem em pGEM-T easy.

Figura 6: Esquema das etapas realizadas para síntese de fragmentos E7 e fusões com L1ΔC. Linhas com setas indicam oligonucleotídeos, linhas contínuas indicam fitas de DNA, linhas tracejadas indicam fitas que serão sintetizadas.

3.8 Reação de PCR

As amplificações foram efetuadas a partir de pUC57-E6E7Ub utilizando-se a polimerase Platinum® *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen™).

As reações foram feitas em volume final de 50 µL, contendo: 5 µL de tampão de reação 10X, 1,5 µL de MgSO₄ 50 mM, 1 µL de dNTP *mix* 10 mM, 1 µL de cada oligonucleotídeo 20 mM, uma unidade de polimerase, de 10 a 100 ng de DNA plasmidial, e água destilada e deionizada.

Os programas de amplificação constaram de uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 68 °C por 30s; e uma etapa final de 68 °C por 5 minutos.

As reações a seguir passaram por eletroforese em gel de agarose 2%, sendo as bandas resultantes purificadas para a realização posterior de clonagem em pGEM-T easy.

3.9 Clonagem utilizando kit “pGEM-T easy” (Promega)

Após a quantificação, procedeu-se à clonagem no vetor pGEM-T easy utilizando os produtos de PCR purificados.

Para a clonagem em pGEM T-easy, o gene amplificado foi tratado com deoxiadenina trifosfato (dATP) na presença de Taq DNA Polimerase, tampão específico para a enzima, e cloreto de magnésio. Isso gera um fragmento cujas extremidades 3' possuem deoxiadenina ancorada, o que possibilita sua ligação no vetor.

O protocolo adotado foi o especificado pelo manual do *kit* da Promega. Em tubo de 200 µL colocou-se 3 µL do produto de PCR, 1 µL do vetor, 1 µL de T4 DNA ligase e 5

μL de tampão. A reação foi incubada durante a noite à 4°C e 5 μL da reação foram utilizados na quimiotransformação de bactérias DH5 α .

O vetor pGEM T-easy facilita a clonagem de produtos de PCR, além de possibilitar o sequenciamento do fragmento antes de esse ser subclonado no vetor de expressão final.

3.10 Quimiotransformação de bactérias competentes.

Uma alíquota de DH5 α quimiocompetentes foi descongelada em gelo por 15 minutos após os quais se adicionou 1 μL de DNA plasmidial. Deixou-se a alíquota em repouso no gelo por 30 minutos e em seguida aplicou-se um choque térmico por 2 minutos a 42 °C. Repetiu-se o repouso em gelo por 5 minutos e adicionou-se então 350 μL de meio LB. As células foram incubadas a 37°C por uma hora sob agitação depois dos quais 100 μL foram semeados em placas de meio LB Agar com antibiótico.

3.11 Extração de plasmídeo em pequena escala. (Mini-prep por lise alcalina)

Uma colônia isolada, que cresceu em uma placa com meio seletivo, foi inoculada em tubo de cultura contendo 2 mL de meio LB suplementado com o antibiótico correspondente e incubada durante a noite a 37 °C sob agitação. Após esse período, 1,5 mL da cultura foi centrifugado a 12.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado celular foi ressuspensionado em 100 μL de solução I (50 mM de glicose; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM de EDTA contendo 4 mg/mL de lisozima) e incubadas a

temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir adicionou-se 200 μ L de solução II (0,2 M NaOH: 1% SDS). A solução foi misturada por inversão e incubada em gelo por 5 minutos. Adicionou-se a ela 150 μ L de solução III (5M KOAc, pH 4,8), seguido de agitação no vortex e incubação no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente a solução foi centrifugada a 12.000 rpm a 4 °C por 5 minutos, e o sobrenadante transferido a um tubo novo, desprezando-se o precipitado.

Ao sobrenadante resultante foram acrescentados 2 volumes de etanol 100%. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por dois minutos e então centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado seco a temperatura ambiente. Quando seco, o DNA plasmidial foi ressuspensionado em 30 μ L de água miliQ autoclavada.

3.12 Seqüenciamento

As regiões referentes aos genes de interesse foram seqüenciadas utilizando o *kit* “ABI Prism[®]” Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1” (Applied Biosystems). As reações continham 150 ng de DNA e foram feitas em volume final de 10 μ L. Nas reações feitas em 10 μ L, ao DNA foi adicionado 3 μ L de tampão *Save Money* (Tris-HCl 0,2 M pH 9,0; MgCl₂ 5 mM), 1 μ L de oligonucleotídeos, 1 μ L de *Big Dye* e água tratada com DEPC q.s.p.

A reação foi colocada em termociclador pTC-100TM Programable Thermal Controller da MY Research, Inc, em programa de 40 ciclos de 96 °C por 10 s, 52 °C por 20 s e 60 °C por 4 min, com rampagem de temperatura de 1 °C por segundo.

Terminada a reação, os tubos foram mantidos a 4 °C até a precipitação dos produtos obtidos.

Adicionou-se água destilada e deionizada tratada com DEPC para cada amostra de sequenciamento e a mistura foi transferida para um tubo de 1,5 mL. Posteriormente adicionou-se 60 µL de isopropanol, misturou-se com vortex e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. As amostras foram centrifugadas a 14.000 RPM por 25 minutos a 4 °C. Após desprezar o sobrenadante com micropipeta, adicionaram-se 150 µL de etanol 70 %, agitou-se com vortex e centrifugou-se a 14.000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado com micropipeta e o precipitado deixou-se secando a 37 °C por 20 minutos, protegido da luz. As amostras foram guardadas a -20 °C.

Às amostras foram adicionados 20 µL de “Hi-Di™ Formamide” da Applied Biosystems e agitadas no vortex. Posteriormente foram denaturadas a 96°C por 4 minutos e imediatamente depois colocadas no gelo. O conteúdo das mesmas foi aplicado no seqüenciador “ABI PRISM 3100 Genetic Analyser” da Applied Biosystems.

A análise das sequências foi realizada através do programa SeqMan II expert sequence analysis software® (DNASTar Inc.).

3.13 Eletroforese em gel de agarose

A análise das amostras de DNA foi feita através de eletroforese em gel de agarose adicionando-se às amostras 1:10 do volume de tampão de amostra para eletroforese (0,25 % azul de bromofenol; 0,25 % xileno cianol; 30 % glicerol em água). Os géis foram preparados utilizando-se agarose (Biotools) em concentrações de 1 % ou 2 % em

tampão TAE 1x e brometo de etídeo (1 µg/mL). O DNA presente no gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

3.14 Extração de DNA de géis de agarose.

Utilizou-se o *kit* “GFX™ PCR and Gel Band Purification” (GE Healthcare), e seguiram-se as instruções do fabricante.

3.15 Digestão por enzimas de restrição

Para fins de análise das colônias foram utilizadas alíquotas de DNA das *mini-preps* (500 ng a 1 µg), 2 unidades de enzima de restrição, 2 µL do tampão 10x adequado para a enzima, adição de 2 µL de BSA 10x quando necessário, e água deionizada q.s.p. 20 µL.

3.16 Subclonagens para vetor de expressão (pAE e pPICHOLI)

As subclonagens nos vetores indicados na Figura 7 foram realizadas seguindo-se a metodologia descrita a seguir.

Os DNAs plasmidiais referentes ao gene e ao vetor no qual se pretende inserir o gene de interesse foram digeridos por 24 horas com as enzimas apropriadas, e então os fragmentos de interesse foram separados, através de eletroforese em gel de agarose 1 ou 2 %. As bandas referentes ao vetor linearizado e ao gene de interesse foram cortadas do gel e purificadas.

Após quantificação foi realizado ensaio de ligação com o vetor em concentração cerca de 5 vezes maior (variando conforme o tamanho do gene e vetor) que o do gene

(quantidade final de DNA em torno de 100 ng), 2 μ L de tampão de ligação 10x, 2 unidades de enzima T4 DNA-ligase (Fermentas) e água destilada e deionizada q.s.p 20 μ L e deixados durante uma noite a 16 °C. A ligase foi inativada a 65°C por 10 minutos e a ligação foi utilizada para transformar células DH5 α .

Figura 7: Mapa do vetor pPICHOLI da MoBiTec com a indicação dos sítios de restrição no sítio múltiplo de clonagem e do vetor pAE (Ramos *et al.* 2004).

3.17 Expressão com os vetores bacterianos em BL21(DE3)pLysS

Bactérias BL21(DE3)pLysS foram quimiotransformadas com o plasmídeo pAE-E6E6Ub e pAE-E6E7 e cultivadas durante uma noite em 100 mL de meio LB suplementado com ampicilina. A seguir, esse cultivo foi transferido para 1L de meio LB com ampicilina e incubado a 37 °C sob agitação até que o meio atingisse uma DO₆₀₀ de 0,6. Após atingir a DO determinada, iniciou-se a indução da expressão acrescentando-se ao meio IPTG a uma concentração final de 1 mM. Incubou-se durante 3 horas a 30°C sob agitação.

Antes e ao final do tempo de indução, amostras de 1 mL das bactérias foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em tampão de *SDS-PAGE*. A solução foi então aquecida a 100 °C por 5 min, e guardada a -20 °C. O restante do meio foi centrifugado e o precipitado armazenado a -80 °C até o uso. A análise da expressão foi feita em *SDS-PAGE*.

3.18 Expressão e lise com os vetores eucarióticos em Pichia pastoris

Uma alíquota de células KM71 foi descongelada a temperatura ambiente e colocada no gelo juntamente com cubetas de eletroporação e o DNA de interesse. No tubo das células foi adicionado o DNA e incubou-se por 1 min em gelo. O aparelho “Gene pulser” (Bio Rad) foi calibrado para 25 μ F, 200 Ω e 1,5 V. A mistura foi então transferida para a cubeta de eletroporação e homogeneizada, sendo esta a seguir conectada ao aparelho, aplicou-se o pulso. Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 mL de meio Sorbitol e as células foram ressuspensionadas. A suspensão foi transferida para tubo de cultura e incubada a 30 °C com agitação de 200 rpm durante uma hora. Terminada a incubação, 100 μ L das células foram plaqueados em meio YPD agar suplementado com zeocina e incubado a 30 °C durante 2 dias em estufa.

Após crescimento das colônias em meio líquido YPD com zeocina a 30 °C sob agitação, as células transformadas foram analisadas por PCR, para a confirmação da presença do gene de interesse. Após essa análise, as células positivas foram crescidas em meio BMMY com Zeocina, suplementado com metanol (agente indutor) a uma concentração final de 0,5 % após atingir DO_{600} de 0,6 e a cada 24 horas.

Seguindo-se a indução de 2 a 3 dias, o meio foi centrifugado a 6000 rpm a 4 °C por 15 minutos e o precipitado celular ressuspendido em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0, 5 mM imidazol, 1 mM PMSF). Realizou-se a lise das células colocando-se *beads* de vidro de 0,5 mm e agitando-se em vórtex durante 30 segundos, seguindo-se incubação por 30 segundos no gelo durante 8 ciclos. O lisado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante analisado por SDS-PAGE e Western Blot.

3.19 Extração e retirada de uréia das proteínas expressas em E. coli

Após a indução, o meio foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min para obtenção do precipitado bacteriano, e então ressuspendido em solução de lise pH 8 contendo 100 mM de Tris HCL, 500 mM de NaCl e 5 mM de Imidazol.

Essa suspensão bacteriana foi lisada em *French Press* e novamente centrifugada a 10.000 rpm para a separação das frações solúvel e insolúvel.

Após a lise bacteriana e a separação de proteínas solúveis e insolúveis, o precipitado contendo as proteínas insolúveis é lavado com 20 mL de solução 2M de Uréia e posteriormente solubilizado em 20 mL de solução 8M de Uréia.

As tentativas de retirada de uréia foram realizadas de 2 maneiras:

➤ *por diluição*: a solução com 8M de Uréia é gotejada em 2 L de solução para renaturação, finda esta etapa a solução de 2L é filtrada e passada por coluna de níquel previamente equilibrada. A seguir, a coluna passa por processos de lavagens após os quais a proteína é eluída e depois analisada em SDS-PAGE.

➤ *por diálise*: neste caso a purificação é feita em 8M de Uréia, a solução com a proteína já purificada em coluna de níquel é mantida em membrana de diálise imersa em 2 L de solução inicial com 4M de Uréia. Após período de 2 horas de incubação, a solução inicial é substituída por solução semelhante, mas com metade da concentração de Uréia. Sendo esse procedimento repetido sucessivamente, tendo sempre períodos de incubação entre as substituições. Finalizado esse procedimento, a solução é retirada da membrana de diálise e analisada por SDS-PAGE.

3.20 Purificação por Cromatografia de afinidade por níquel

Após a lise, a fração com a proteína de interesse foi adsorvida em coluna com 5 mL de resina *Chelating Sepharose* carregada com níquel e previamente equilibrada com a mesma solução utilizada na solubilização da proteína, em fluxo de 1 mL/min.

Em seguida, realizou-se 4 lavagens de 50 mL com concentrações de 5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM de Imidazol. Eluiu-se a proteína com 25 mL de uma solução 1 M de Imidazol, recolhida em frações de 1 mL, em fluxo de 0,5 mL/min.

As soluções de equilíbrio, lavagens e eluições foram preparadas com as mesmas concentrações de Tris HCl e NaCl utilizadas na lise e nas soluções de Uréia (ver 3.19). O pH utilizado para todas as soluções foi determinado de modo a ser pelo menos uma unidade maior que o pI (ponto isoelétrico) das proteínas. As frações obtidas na purificação foram analisadas por SDS-PAGE.

3.21 Purificação por Cromatografia de afinidade por níquel – protocolo modificado

Protocolo otimizado: 3 lavagens de 50 mL com concentrações de 20 mM, 40 mM e 60 mM e uma lavagem de 25mL com 100 mM de Imidazol. Eluiu-se a proteína com 25 mL de uma solução 1 M de Imidazol, recolhida em frações de 1 mL, em fluxo de 0,5 mL/min.

3.22 Monitoramento da expressão e purificação das proteínas:

SDS-PAGE

A análise da expressão e purificação protéica foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em concentrações de 12 a 15 %, sob condições desnaturantes, que garantem a completa dissociação das proteínas. Para tanto é utilizado o detergente SDS em combinação com β -mercaptoetanol.

Western Blot

Após as amostras percorrerem o gel de poliacrilamida, as proteínas fracionadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, durante 1,5 hs no máximo, em uma voltagem de 0,8 V por cm² de membrana.

Após a transferência para a membrana de nitrocelulose procedeu-se ao bloqueio durante uma noite em PBS/Twen (0,1 %) / Leite (5 %). Ao término desse período, essa membrana foi lavada em PBS/Tween (0,1 %) por quatro vezes de 15 minutos. Foi então, incubada com anticorpo primário monoclonal contra a proteína de interesse em diluição específica, durante duas horas.

Anticorpo primário:

- anti-L1 do HPV16 (Camvir): monoclonal obtido em camundongo. Diluições: primário 1:10000, secundário (Anti-IgG total de camundongo) 1:5000.

A membrana foi novamente lavada e incubada com anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase. A reatividade específica do anticorpo à proteína foi analisada utilizando o kit ECL (Amersham Biosciences), através de uma reação de quimioluminescência entre a peroxidase e o seu substrato. O filme foi recortado e em condição de ausência de luz foi exposto à membrana durante um período de 1 a 30 minutos e revelado.

3.23 Quantificação das proteínas

Para a quantificação utilizaram-se dois métodos:

➤ *Método Bradford*: Inicialmente prepara-se uma curva padrão e a amostra a ser quantificada em placas. A partir de uma solução de BSA estoque a 2 mg/mL realiza-se diluições seriadas em água destilada para a obtenção das demais concentrações, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL, possibilitando assim a construção de uma curva. A seguir prepara-se as amostras e as diluições, adicionando-se 10 µL dessas à 200 µL do reagente de Bradford. Incubam-se as reações a temperatura ambiente por 5 minutos e mede-se a absorbância a 595 nm. Os dados obtidos são dispostos em um gráfico no programa Excel do Pacote Office, permitindo assim o cálculo da concentração da amostra.

➤ *SDS-PAGE*: Em gel de poliacrilamida 15 % aplicam-se amostras correspondentes às diluições de BSA descritas anteriormente e a amostra da proteína a ser quantificada. Após a eletroforese, as bandas são quantificadas digitalizando a

imagem do gel em sistema equipado com câmera, Eagle Eye (Stratagene), e analisadas com o programa de análise de imagem do próprio equipamento.

3.24 Cultura Celular

A linhagem celular TC1 foi mantida em cultura em meio DMEM acrescido de 10 % de SFB, antibiótico e antimicótico, e geneticina em estufa de CO₂ a 37 °C. Para o repique, o tapete celular foi lavado três vezes com PBS estéril e submetido a ação de 1 mL de tripsina. A seguir foi acrescido 5 mL do meio mencionado para inibir a ação da tripsina e propiciar a desagregação das células. Realizou-se uma diluição de 1:12 das células em suspensão e essas foram então novamente recolocadas em garrafas de cultura. Sendo esse procedimento realizado a cada três dias.

3.25 Congelamento de células eucariotas

Para o congelamento, foram utilizadas garrafas médias (75 cm²) confluentes. Após a retirada do meio, o tapete celular foi lavado com PBS por três vezes, e tripsinizado para desagregação das células. A seguir acrescentou-se 10 mL de meio DMEM 10 % SFB. O meio com as células em suspensão foi passado para um tubo falcon estéril e centrifugado a 1.500 rpm por 5 min.

O meio foi retirado após a centrifugação e o *pellet* foi ressuspendido em 3 mL meio de congelamento para cada garrafa de cultura inicialmente utilizada. Alíquotas de 1 mL contendo 10⁷ células foram armazenadas em tubos criogênicos em nitrogênio líquido.

3.26 Preparação de células TC-1 para inoculação

Para inoculação das células TC1 em camundongos, foram utilizadas garrafas médias (75 cm²) confluentes. Após a retirada do meio, o tapete celular foi lavado com PBS por três vezes, e tripsinizado para desagregação das células. A seguir, acrescentou-se 4 mL de meio DMEM 10 % SFB. O meio com as células em suspensão foi passado para um tubo falcon estéril e centrifugado a 1.500 rpm por 5 min.

O meio foi retirado após a centrifugação e o *pellet* foi ressuspendido em 10 mL de meio DMEM sem soro e novamente centrifugado, sendo esse passo repetido duas vezes. Por fim, o *pellet* foi ressuspendido em 3 mL de meio DMEM sem soro, uma pequena amostra foi diluída para contagem de células em câmara de Neubauer e o material restante foi ajustado à concentração desejada para uso, sendo o volume final para inoculação de 100 µL por camundongo.

3.27 Ensaio de imunização com as proteínas purificadas e desafio

Após verificação e quantificação em SDS-PAGE das amostras obtidas na purificação, foi iniciado o protocolo de imunização com a proteína E6E7. Camundongos C57/BL, obtidos do biotério de camundongos isogênicos do Instituto Butantan, foram mantidos no biotério de experimentação. Foram utilizadas fêmeas de 8 a 10 semanas, divididas em grupos de cinco animais.

O experimento inicial foi realizado em colaboração com o laboratório de desenvolvimento de vacinas do Dr. Luis Carlos De Souza Ferreira (ICB-USP). Nesse experimento, um grupo foi imunizado com 15 µg de E6E7, um com a vacina de DNA produzida pelo laboratório citado e o terceiro grupo com PBS. A via de administração foi

subcutânea para a proteína e muscular para a vacina de DNA, sendo administradas 3 doses. O calendário de imunização é de 14 dias entre as doses.

Após duas semanas do término das imunizações foram inoculadas $7,5 \times 10^4$ células de TC1, e o crescimento tumoral foi observado durante 2 meses.

Ao fim do experimento os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

3.28 Segundo ensaio de imunização e desafio

Camundongos C57/BL, obtidos do biotério de camundongos isogênicos do Instituto Butantan, foram mantidos no biotério de experimentação. Foram utilizadas fêmeas de 4 a 6 semanas, divididas em grupos de cinco animais. Os animais foram tratados com vermífugo durante uma semana, e deixados em repouso na semana seguinte.

Nesse experimento, os grupos foram imunizados com PBS; adjuvante WCP (*whole cell pertussis*); 15 µg de E6E7 com adjuvante WCP; 15 µg de E6E7Ub com adjuvante WCP; 40 µg de E6E7 com adjuvante WCP; 40 µg de E6E7Ub com adjuvante WCP; 15 µg de E6E7 sem adjuvante; 15 µg de E6E7Ub sem adjuvante; 40 µg de E6E7 sem adjuvante; ou 40 µg de E6E7Ub sem adjuvante.

A via de administração foi subcutânea sendo administradas 2 doses com intervalo de 14 dias. Foi coletado sangue via retro-orbital antes do desafio, a fim de se testar o soro quanto à produção dos anticorpos desejados.

Após duas semanas do término das imunizações foram inoculadas $7,5 \times 10^4$ células de TC1, e o crescimento tumoral foi observado durante 2 meses.

Ao atingir 1000 m³ de tumor os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

3.29 ELISA

O soro foi separado do sangue dos animais após a formação do coágulo e centrifugação. Este soro foi testado através de ELISA quanto à existência de anticorpos dirigidos contra as proteínas utilizadas na imunização.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com a proteína E6E7 purificada e testada frente ao soro dos animais coletados antes do desafio com células tumorais. Foram usados como curva para quantificação o anticorpo Mouse IgG-UNLB (Southern Biotech).

Cada soro foi diluído 1:200, 1:400, 1:800, assim por diante. O anticorpo secundário usado na reação foi o Goat anti-mouse IgG(H+L)-UNLB em diluição 1:10000. O anticorpo terciário conjugado com peroxidase utilizado foi Rabbit Anti-Goat IgG(H+L)-HRP em diluição 1:20000. A seguir, foi adicionado peróxido de hidrogênio e o-Phenylenediamine (OPD) em tampão citrato-fosfato. A reação foi interrompida com H_2SO_4 (2M), seguindo-se leitura das amostras a 492nm.

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento das VLPs quiméricas L1E7

Inicialmente realizou-se a amplificação da L1 sem os últimos 34 aminoácidos (L1 Δ C) utilizando-se os oligonucleotídeos L1 cod_opt FW e E7-3 RV, que possui uma parte da seqüência da L1 e uma parte de E7₁₋₅₀ permitindo que o fragmento formado funcione como base para a fusão entre E7₁₋₅₀ com a L1 Δ C. O mesmo foi realizado para a fusão L1 Δ CE7₄₃₋₇₇ com os oligonucleotídeos L1 cod_opt FW e E7-10 RV. Analisando-se os produtos em gel de agarose 1% obtêm-se os fragmentos apresentados na Figura 8, com o tamanho esperado de aproximadamente 1500 pares de bases.

Figura 8: Amplificação da L1 Δ C. Gel de agarose 1%. Amostra 1 e 2 L1 Δ C amplificado; Amostra 3: Marcador molecular λ HindIII.

Sintetizou-se a seguir $E7_{1-50}$, como representado na Figura 6, a partir dos oligonucleotídeos E7-1 FW, E7-2 FW, E7-4 RV e E7-5 RV, seguido de amplificação com E7-1 FW e E7-5 RV (Fig 9A). Fusionou-se $L1\Delta C$ (Fig. 6) com $E7_{1-50}$ utilizando-se o mesmo protocolo da síntese, seguido de PCR, obtendo-se os fragmentos apresentados na Figura 9B.

Por ser um fragmento menor, para sintetizar $E7_{43-77}$ utilizaram-se os oligonucleotídeos E7-9 FW e E7-11 RV, e o fragmento $L1\Delta C$ concomitantemente, obtendo-se diretamente a fusão $L1\Delta CE7_{43-77}$ que foi a seguir amplificada com $L1$ cod_opt FW e E7-11 RV (Fig. 9B). Como se pode notar na Figura 9B, obteve-se várias bandas após as amplificações das fusões, o que ocorreu mesmo alterando-se as condições da PCR. Sendo assim clonou-se em pGEM T easy os fragmentos mais próximos do tamanho esperado.

Figura 9: Amplificações para síntese das L1 quiméricas. (A) Síntese de $E7_{1-50}$. Amostra 1: $E7_{1-50}$; Amostra 2: Marcador molecular $\lambda HindIII$. (B) Fusão $L1E7$. Amostra 1: $L1\Delta C$ com $E7_{1-50}$; Amostra 2: $L1\Delta C$ com $E7_{43-77}$; Amostra 3: Marcador molecular $\lambda HindIII$

Os clones que se mostraram positivos para essas clonagens foram seqüenciados para confirmação da integridade da seqüência das fusões como exemplificado na Figura 10.

Figura 10: Cromatogramas de um clone pGEMT-L1ΔCE7₁₋₅₀ comparados com a seqüência esperada. Acima o início da seqüência e abaixo a porção final da seqüência.

Realizou-se a digestão dos vetores, pGEMT-L1ΔCE7₁₋₅₀ e pGEMT-L1ΔCE7₄₃₋₇₇ com as enzimas *Sal I* (Fermentas) e *Aat II* (Biolabs), sendo que a extremidade coesiva de *Aat II* foi digerida pela enzima *Klenow*, formando uma extremidade *blunt*, liberando os fragmentos correspondentes às seqüências de L1ΔCE7₁₋₅₀ e L1ΔCE7₄₃₋₇₇.

Já o vetor pPICHOLI foi digerido com as enzimas *Sal I* e *EcoRI* (Fermentas), e a extremidade digerida por *EcoRI* submetida a tratamento para formar extremidade *blunt*, permitindo assim a ligação dos fragmentos liberados na digestão anterior no vetor pPICHOLI.

Purificaram-se as bandas correspondentes às digestões e após a quantificação foi feita reação de ligação. Dessa reação obteve-se um grande número de colônias

isoladas, e selecionaram-se alguns dos clones obtidos. Após a extração do DNA plasmidial, realizou-se análise por digestão e confirmou-se a subclonagem por seqüenciamento.

Com a obtenção dos vetores pPICHOLI-L1 Δ CE7₁₋₅₀ e pPICHOLI-L1 Δ CE7₄₃₋₇₇, partiu-se para a indução da expressão das VLPs quiméricas em *Pichia pastoris*, sendo que inicialmente não houve detecção de expressão das VLPs (Fig. 11).

Figura 11: Western Blot de induções de L1 Δ CE7₁₋₅₀ em *Pichia pastoris* (membrana corada sobreposta ao filme revelado). Amostra 1 a 9: colônias com pPICHOLI-L1 Δ CE7₁₋₅₀; Amostra 10: controle positivo com L1 purificada; Amostra 11: marcador; A seta indica a localização da proteína L1.

A seguir, foi testado o protocolo de indução em *Pichia pastoris* com o vetor pPICHOLI original contendo a L1 íntegra concomitantemente com a expressão dos vetores construídos neste projeto e outros vetores de expressão em levedura (pINT). Analisando-se o resultado por *Western Blot*, nota-se que ambas as colônias com os vetores contendo a L1 íntegra apresentaram expressão da proteína L1 enquanto que as com os vetores contendo as fusões construídas nesse projeto não (Fig. 12).

Devido ao vazamento durante a aplicação no poço 6, houve o aparecimento da banda correspondente a L1 no poço vazio. Além disso, nos extratos correspondentes aos clones transformados com pPICHOLI-L1 e pINT-L1, houve o aparecimento de outras bandas maiores e menores do que o tamanho esperado para L1, isso ocorrendo principalmente pela fácil degradação de L1 e forte tendência de agregação que esta apresenta nos extratos.

Figura 12: Western Blot de induções de L1 em *Pichia pastoris* (membrana corada sobreposta ao filme revelado). Amostra 1 a 4: colônias com pPICHOLI-L1 Δ CE7₁₋₅₀; Amostra 5: poço vazio; Amostra 6: controle positivo com L1 purificada; Amostra 7: marcador; Amostra 8 a 11: colônias com pINT-L1; Amostra 12 a 15: colônias com pPICOLI-L1. A seta indica a localização da proteína L1.

4.2 Desenvolvimento das proteínas de fusão E6E7Ub e E6E7

4.2.1 **Determinação dos epítomos e desenho da fusão**

Após levantamento bibliográfico sobre determinação de epítomos nas proteínas E6 e E7 do HPV16 *in vivo* e *in vitro* (Tabelas 2 e 3), foram escolhidas as regiões dessas proteínas que apresentavam maior número de epítomos de interesse: E6 29-38, E6 49-67, E6 127-141, E7 7-20, E7 43-77, E7 79-93.

A seguir, desenhou-se a seqüência (Fig. 13) com a fusão das regiões de interesse e a seqüência da proteína Ubiquitina (E6E7Ub).

A seqüência foi enviada para a empresa GenScript onde foi sintetizada.

Tabela 2: Epítomos da proteína E7 do HPV16.

Epítomos	Restrição (HLA)	Aminoácidos	Citação
7-15	A2,1; B48	TLHEYMLDL	(Kast <i>et al.</i> 1994; Nakagawa <i>et al.</i> 2004)
11-20	A2,1	YMLDLQPETT	(Kast <i>et al.</i> 1994; Rensing <i>et al.</i> 1995; Rensing <i>et al.</i> 1999; Schreurs <i>et al.</i> 2005; Piersma <i>et al.</i> 2008)
79-87	B60	LEDLLMGTL	(Nakagawa <i>et al.</i> 2004)
82-90	A2,1	LLMGTLGIV	(Kast <i>et al.</i> 1994; Rensing <i>et al.</i> 1995)
86-93	A2	TLGIVCPI	(Kast <i>et al.</i> 1994; Rensing <i>et al.</i> 1995; Rensing <i>et al.</i> 1999)
35-50	DQ2	EDEIDGPAGQAEPDR A	(van der Burg <i>et al.</i> 2001)
43-77	DR3	GQAEPDRAHYNIVTF CCKCDSTLRRCVQST HVDIR	(van der Burg <i>et al.</i> 2001)
50-62	DR15	AHYNIVTFCKCD	(van der Burg <i>et al.</i> 2001)
71-85	DQB1 0201	STHVDIRTLEDLLMG T L	(Peng <i>et al.</i> 2007)
49-57	A24, H-2Db	RAHYNIVTF	(Kast <i>et al.</i> 1994; Zwaveling <i>et al.</i> 2002)
21-30	Kb	DLYCYEQLND	(Comerford <i>et al.</i> 1991; Stauss <i>et al.</i> 1992)

Tabela 3: Epítomos da proteína E6 do HPV16.

Posição	Restrição (HLA)	Aminoácidos	Citação
29-38	A0201	TIHDIILECV	(Stauss <i>et al.</i> 1992; Nakagawa <i>et al.</i> 2007)
29-37	B48	TIHDIILEC	(Nakagawa <i>et al.</i> 2007)
31-38	B4002	HDIILECV	(Nakagawa <i>et al.</i> 2007)
49-57	A2402	FAFRDLCIVY	(Morishima <i>et al.</i> 2007)
52-61	B35; B57; DP0201; DP4001	DKKQRFHNIRG RWTG	(Nakagawa <i>et al.</i> 2004; Nakagawa <i>et al.</i> 2007; Piersma <i>et al.</i> 2008)
127-141	DRB101	HLDKKQRFHNI RGRWTG	(Gallagher <i>et al.</i> 2007)
52-60	A2,1	FAFRDLCIV	(Kast <i>et al.</i> 1994)
59-67	A3	IVYRDGNPY	(Kast <i>et al.</i> 1994)
129-138	DR7	KQRFHNIRGR	(Piersma <i>et al.</i> , 2008)

Figura 13: Esquema da fusão entre regiões da proteína E6 e E7 do HPV16 com Ubiquitina. As setas indicam os epítomos apresentados nas Tabelas 1 e 2, e os retângulos em preto representam os espaçadores.

4.2.2 Subclonagem em pAE

A sequência sintética E6E7Ub foi recebida no vetor pUC53 e utilizada para a subclonagem em pAE. Para tanto se realizou as digestões dos vetores pAE e pUC53-E6E7Ub com as enzimas *Bam*HI (Fermentas) e *Pvu*II (Biolabs)

As bandas correspondentes às digestões foram purificadas e submetidas a reação de ligação. Alguns dos clones obtidos dessa reação foram selecionados e analisados por digestão, tendo sido obtido 7 clones positivos entre os 10 analisados (Fig. 14) e depois confirmados por seqüenciamento.

Figura 14: Digestão *screening* de clones da ligação entre pAE e E6E7Ub com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Pvu*II. Amostra 1 a 10: clones pAE-E6E7Ub 1 a 10; Amostra 11: Marcador λ *Hind*III. Clones 1 e 3 a 8 são positivos.

O vetor pAE-E6E7Ub foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*, e a seguir religado para a formação do vetor pAE-E6E7. Novamente analisaram-se os clones por digestão e seqüenciamento.

4.2.3 Expressão protéica e Purificação

Induziu-se bactérias BL21(DE3)pLys transformadas com os vetores pAE-E6E7Ub e pAE-E6E7 com 1mM de Imidazol. A proteína E6E7Ub apresentou-se em corpúsculo de inclusão enquanto a E6E7 encontra-se presente tanto na fração solúvel quanto no corpúsculo de inclusão (Figs. 15 e 16). As proteínas foram purificadas em coluna de níquel (Figs. 17 e 18).

Figura 15: Alíquotas da indução de E6E7. SDS-PAGE 15%. Amostra 1: Marcador de massa molecular; Amostras 2: fração insolúvel; Amostra 3: fração solúvel; Amostra 4: fração total. A seta vermelha indica a localização da proteína de interesse.

Figura 16: Alíquotas da indução de E6E7Ub. SDS-PAGE 15%. Amostra 1: Marcador de massa molecular; Amostras 2: fração solúvel; Amostra 3: fração insolúvel; Amostra 4: fração total. A seta vermelha indica a localização da proteína de interesse.

Figura 17: Alíquotas da purificação de E6E7Ub em 8M Uréia em coluna de níquel. SDS-PAGE 15%. (A) Amostra 1: Marcador de massa molecular; Amostra 2: antes da passagem pela coluna; Amostra 3: fração não adsorvida; Amostras 4 a 7: Lavagens com 5, 20, 40 e 60 mM de Imidazol; Amostras 9 e 10: eluições da coluna. (B) Amostra 1: Marcador de massa molecular; Amostras 2 a 10: eluições da coluna. A seta vermelha indica a localização da proteína de interesse.

Figura 18: Alíquotas da purificação de E6E7 em coluna de níquel. SDS-PAGE 15%. (A) Amostra 1: Marcador de massa molecular; Amostra 2: fração solúvel; Amostra 3: Lavagem com 1M de Uréia; Amostras 4: fração insolúvel; Amostra 5: fração não adsorvida; Amostra 6 a 8: Lavagens com 20, 40 e 60 mM de Imidazol. (B) Amostra 1: Marcador de massa molecular; Amostras 2 a 10: eluições da coluna. A seta vermelha indica a localização da proteína de interesse.

A seguir, realizou-se a otimização da purificação já que como visto nas Figuras 17 e 18, haviam muitos contaminantes sendo co-purificados.

As melhores concentrações determinadas para as lavagens foram de 20 mM, 40 mM, 60 mM e 100 mM de Imidazol. Nessas concentrações, as alíquotas referentes as eluições apresentaram-se significativamente mais puras (Figs. 19 e 20).

Figura 19: Purificação de E6E7Ub. SDS-PAGE 15%. Amostra 1: Marcador de massa molecular; Amostras 2 a 10: eluições da proteína E6E7Ub purificada. A seta vermelha indica a localização da proteína de interesse.

Figura 20: Alíquotas da purificação de E6E7 solúvel em coluna de níquel. SDS-PAGE 15%. Amostra 1: Marcador de massa molecular; Amostras 2 a 10: eluições da coluna. A seta vermelha indica a localização da proteína de interesse.

4.2.4 Ensaios de imunização

Para iniciar os ensaios de imunização, as alíquotas referentes a purificação de E6E7 foram dialisadas em PBS. Após a diálise, a proteína foi quantificada por Bradford, apresentando-se numa concentração de 15 µg a cada 100 µL.

Com a proteína purificada, realizou-se um ensaio de imunização em colaboração com o Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Dr. Luis Carlos De Souza Ferreira (ICB-USP).

Assim, utilizaram-se três grupos de animais, imunizados com três doses com intervalos de 2 semanas entre as doses, e após 2 semanas da última dose os animais foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células TC1. Um grupo controle negativo foi injetado com PBS, que não impediria o aparecimento do tumor após desafio com inoculação de células tumorais TC1, um grupo controle positivo imunizado com a vacina de DNA desenvolvida no laboratório do Dr Luis Carlos, que impede o desenvolvimento do tumor e o terceiro grupo imunizado com 15 µg da proteína E6E7. Como apresentado na Figura 21, 20 % dos animais imunizados com a proteína E6E7 não desenvolveram o tumor.

Para a obtenção de uma maior concentração de proteína E6E7, utilizamos para a purificação a fração insolúvel resultante da indução, já que essa possui uma maior concentração da proteína (Fig. 15). A proteína foi purificada em uréia 8M e quantificada por SDS-PAGE utilizando-se a metodologia descrita. Obtivemos 2,6 mg/mL da proteína E6E7 (Fig. 22). Após a diálise dessa purificação realizou-se um novo ensaio de imunização.

Figura 21: Gráfico referente ao desenvolvimento do tumor para três grupos imunizados. Os animais receberam três doses de PBS, vacina de DNA ou E6E7, e após duas semanas da última dose foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC1.

Figura 22: Alíquota purificada de E6E7. SDS-PAGE 15%. Amostra 1: Marcador de massa molecular; Amostras 2: E6E7 purificada.

Já para a utilização da proteína E6E7Ub nos ensaios, essa foi purificada com Uréia 8M, e a seguir foram utilizados protocolos para retirada de Uréia. Tanto realizando diálise gradual quanto protocolos de diluição, houve a precipitação total da proteína.

Para tanto, decidimos testar um protocolo de imunização com a proteína E6E7Ub purificada e mantida em baixa concentração de uréia para minimizar sua precipitação.

Inicialmente, a proteína E6E7Ub foi induzida e purificada em 8M uréia (Fig. 19). A seguir as alíquotas contendo a proteína foram submetidas à diálise para redução da quantidade de uréia até 2M. Finalmente, a partir de sua quantificação, iniciamos os testes de imunização em camundongos.

Utilizaram-se dez grupos com 5 animais cada, imunizados com duas doses separadas por duas semanas, e a seguir desafiados com as células TC1 duas semanas após a última dose. Os grupos foram separados segundo o imunógeno utilizado do seguinte modo:

- grupo 1, controle imunizado somente com PBS;
- grupo 2, controle imunizado somente com o adjuvante utilizado no experimento WCP (*whole cell pertussis*);
- grupo 3, 15 µg de E6E7 com adjuvante WCP;
- grupo 4, 15 µg de E6E7Ub com adjuvante WCP;
- grupo 5, 40 µg de E6E7 com adjuvante WCP;
- grupo 6, 40 µg de E6E7Ub com adjuvante WCP;
- grupo 7, 15 µg de E6E7 sem adjuvante;
- grupo 8, 15 µg de E6E7Ub sem adjuvante;
- grupo 9, 40 µg de E6E7 sem adjuvante;

- grupo 10, 40 µg de E6E7Ub sem adjuvante.

Um animal do grupo 7 morreu espontaneamente e um do grupo 8 foi sacrificado devido a problemas não relacionados com o experimento. Os demais animais foram sacrificados quando o tumor atingiu 1000 mm³.

No dia anterior à inoculação das células tumorais, retirou-se sangue para a realização de medidas de anticorpos.

Inicialmente mediu-se a quantidade de IgG total no soro dos animais, obtendo-se o resultado apresentado nas Figuras 23 e 24. Houve aumento de produção de anticorpos nos grupos imunizados com E6E7. Não houve diferença significativa entre os grupos com adjuvante WCP em relação aos sem adjuvante, nem entre os grupos com 15 µg comparados com os de 40 µg. Por fim, comparando-se a inoculação de E6E7 e E6E7Ub, os grupos imunizados com E6E7 mostraram produção de IgG significativamente maior ($p < 0,001$) do que os grupos imunizados com E6E7Ub.

Figura 23: Gráfico da distribuição da concentração de IgG no soro por camundongo por grupo. Os grupos E6E7 15 mg e E6E7Ub 15 mg são representados por 4 animais, e o restante dos grupos por 5 animais. Cada ponto representa um animal e a barra azul a média obtida dos animais,

Figura 24: Gráfico referente a média de produção de IgG total por grupo e desvio padrão.

Nesse experimento, após o desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC1, o desenvolvimento do tumor foi acompanhado por 1 mês. Como observado na Figura 25, independentemente da concentração das proteínas e presença ou ausência de WCP, os grupos imunizados com E6E7Ub apresentaram proteção contra o tumor entre 80% e 100% dos camundongos, enquanto os grupos imunizados com E6E7 apresentaram proteção entre 0% e 25%.

Figura 25: Gráfico referente ao desenvolvimento do tumor para dez grupos imunizados. Os animais receberam 2 doses de PBS, WCP, 15 µg E6E7 + WCP, 15 µg E6E7Ub + WCP, 40 µg E6E7 + WCP, 40 µg E6E7Ub + WCP, 15 µg E6E7, 15 µg E6E7Ub, 40 µg E6E7, 40 µg E6E7Ub. Após duas semanas da última dose foram desafiados com $7,5 \times 10^4$ células tumorais TC1.

5 DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento das VLPs quiméricas L1E7

A primeira estratégia adotada no início do desenvolvimento deste projeto incluía a obtenção de VLPs (partículas similares a vírus) quiméricas contendo a proteína viral de superfície L1, essencial para a formação das partículas virais e a proteína E7, uma das proteínas oncogênicas do HPV.

Em relação a proteína L1, optou-se por realizar a sua amplificação sem os últimos 34 aminoácidos (L1 Δ C), já que segundo Müller *et. al*, 1997, a retirada desses melhora a estabilidade do RNAm, aumentando a expressão, além de facilitar a extração e purificação da partícula (VLP), e não interfere na resposta imune de neutralização produzida contra a L1. A escolha das regiões correspondentes aos aminoácidos 1-50 e 43-77 da proteína E7, deve-se ao fato de ambas terem-se mostrado suficientemente imunogênicas para proteger, em modelo murino, contra o desenvolvimento tumoral de células transformadas com a proteína E7 (Müller *et. al*, 1997; Zwaveling *et al.* 2002). Construiu-se então as fusões L1 Δ CE7₁₋₅₀ e L1 Δ CE7₄₃₋₇₇.

Durante a obtenção das fusões, obteve-se várias bandas após a amplificação das fusões sintetizadas (Fig. 9), o que ocorreu mesmo alterando-se as condições de temperatura e tempo de anelamento dos oligonucleotídeos durante a PCR. Sendo assim clonou-se em pGEM T easy os fragmentos mais próximos do tamanho esperado e esses foram confirmados por sequenciamento antes do prosseguimento das

subclonagens no vetor de expressão eucariótica pPICHOLI, para expressão em *P. pastoris*.

Após as subclonagens, com a obtenção dos vetores pPICHOLI-L1 Δ CE7₁₋₅₀ e pPICHOLI-L1 Δ CE7₄₃₋₇₇, partiu-se para a indução da expressão das VLPs quiméricas em *Pichia pastoris*, das quais não foram detectadas expressão protéica. Realizaram-se inúmeras modificações no protocolo de indução, tais como: aumento nos tempos de indução de 2 dias até 5 dias; diferentes tempos de incubação em meio com e sem glicose antes da indução; aumento do número de clones induzidos, já que clones diferentes podem ter níveis de expressão diferentes. Mesmo após essas alterações não foi detectada expressão (Fig. 11).

As seqüências das fusões L1 Δ CE7₁₋₅₀ e L1 Δ CE7₄₃₋₇₇ foram novamente verificadas por sequenciamento, mostrando-se integras. Realizou-se análise da presença de instabilidades, códons raros ou presença de íntrons que poderiam eventualmente ter se formado devido à retirada da região C terminal e fusão com E7. Novamente as seqüências apresentaram-se sem problemas.

Devido a dificuldade de se observar a formação das VLPs quiméricas, foi realizado o acompanhamento de todas as etapas da indução e expressão comparativamente com os vetores de expressão cuja expressão e formação de VLPs já haviam sido confirmadas e obtidas neste laboratório. Assim, desde a transformação das leveduras até a indução e análise por Western Blot, os vetores de expressão eucarióticos pPICHOLI-L1 e pINT-L1 que contém a L1 integral, foram expressos concomitantemente.

Dessa maneira foi verificado que ambos os vetores contendo a L1 íntegra apresentaram expressão positiva, enquanto os vetores contendo as fusões com epitopos de E7 não (Fig. 12).

A fusão desses epitopos selecionados da proteína E7 pode ter alterado a estabilidade da proteína L1, assim essa proteína quimérica não era funcionalmente estável o suficiente para a obtenção de VLPs no modelo de expressão de *Pichia pastoris*. De modo que apesar de utilizar-se estratégia semelhante à reportada na literatura (Müller *et. al*, 1997), que já havia funcionado para a obtenção de VLPs com a proteína L1 íntegra ou sem a porção C-terminal, não foi possível obter VLPs quiméricas de L1 com os epitopos de E7 selecionados. Possivelmente, essa diferença com relação ao descrito na literatura deve-se ao sistema de expressão empregado, já que em Müller *et. al*, 1997 foi empregado o sistema de expressão em baculovírus e neste trabalho, a produção de VLPs quiméricas foi adaptada para expressão em *Pichia pastoris*.

Durante as tentativas de indução, houve a publicação de um artigo relacionado com utilização de VLPs quiméricas em ensaios clínico. Segundo Kaufmann *et al*. 2007, em um ensaio clínico de imunização com VLPs quiméricas (L1 Δ CE7) realizado em 39 pacientes HPV16 mono-infectados com elevado grau de neoplasia intra-cervical (CIN 2 / 3), foram produzidos altos títulos de anticorpos contra a L1 do HPV16 e baixos títulos contra a E7. Apesar de demonstrar a segurança da vacina, a eficácia clínica não foi significativa entre o grupo vacinado com HPV16 L1E7 CVLP e o grupo placebo, já que não houve redução das neoplasias significativamente diferente entre os dois grupos.

Nesse caso, apesar de normalmente não se usar como parâmetro a produção de anticorpos para determinar a eficácia de uma imunização com foco anti-tumoral, esse

resultado em conjunto com a observação da ausência de diferença entre o grupo placebo e o vacinado, pode indicar que devido a imunodominância da proteína L1 o sistema imune fique impossibilitado de responder eficientemente contra as regiões da proteína E7 fusionada a essa. Estes dados sugerem que as fusões planejadas neste projeto não seriam eficientes para uma vacina terapêutica.

Em função da dificuldade de expressão em conjunto com os dados de Kaufmann *et al.* 2007, procurou-se alternativas visando à construção de uma vacina terapêutica mais eficaz.

Baseado nos artigos de Kenter *et al.* 2008 e van den Hende *et al.* 2008, que demonstraram boa imunogenicidade de peptídeos longos das proteínas E6 e E7 do HPV16 em pacientes com neoplasia cervical e em Velders *et al.* 2001 que demonstra um aumento da apresentação de antígenos quando há a fusão com Ubiquitina em vacinas de DNA, optou-se por uma nova estratégia.

Reformulou-se o projeto com o objetivo de expressar em *E. coli* proteínas sintéticas originadas da fusão entre epítomos das proteínas E6 e E7 do HPV16 e Ubiquitina, visando aumentar a apresentação de peptídeos ao sistema imune de modo a estimular a eliminação de células infectadas com HPV16, evitando e regredindo o desenvolvimento dessas células cancerosas.

5.2 Desenvolvimento das proteínas de fusão E6E7Ub e E6E7

5.2.1 Determinação dos epítomos e desenho da fusão

Inicialmente realizou-se um levantamento de artigos que determinaram epítomos das proteínas E6 e E7 por diferentes metodologias. Para tanto, células T de diferentes origens foram submetidas a estímulo com peptídeos sintéticos para determinação de epítomos imunogênicos, e restrição a tipos de Antígenos Humanos Leucocitários (HLA): em modelo murino, células do baço de camundongos previamente imunizados com peptídeos sintéticos (Comerford *et al.* 1991; Rensing *et al.* 1995; Schreurs *et al.* 2005; Stauss *et al.* 1992; Zwaveling *et al.* 2002); células provenientes de mulheres jovens com alta prevalência de infecção e *clearance* do HPV (Gallagher *et al.* 2007; Nakagawa *et al.* 2004; Nakagawa *et al.* 2007; Peng *et al.* 2007; Rensing *et al.* 1995; van der Burg *et al.* 2001); e células infiltradas no cervix e linfonodos de pacientes com malignidades (Piersma *et al.*, 2008). Outro método muito utilizado mede a interação entre moléculas purificadas de MCH classe I com peptídeos sintéticos do HPV16 para determinação de promiscuidade de epítomos previamente identificados (Kast *et al.* 1994; Rensing *et al.* 1999; Stauss *et al.* 1992).

Sabendo-se que é importante para a eliminação das células tumorais o estímulo de linfócitos T citotóxicos, cuja proliferação é estimulada via MHC de classe I (constituído por alelos dos tipos HLA A, HLA B e HLA C), o trabalho focou-se na busca de epítomos que seriam apresentados por essa via e métodos que estimulariam essa apresentação.

Apesar disso, também foi considerada a adição de epítomos apresentados por MHC de classe II (HLA DR, HLA DQ, HLA DP), já que em modelo pré-clínico de câncer

cervical causado pela infecção de HPV-16, mostrou-se que a vacinação com peptídeo contendo tanto um epítopo CTL quanto um epítopo Th, resultou na indução de uma resposta específica de células T CD8 muito mais robusta do que da vacinação com somente o epítopo CTL (Zwaveling *et al.* 2002).

A seguir, sabendo-se que os genes dos HLAs são altamente polimórficos na população, procurou-se escolher as regiões das proteínas E6 e E7 que apresentassem o maior número de epítopos determinados e com maior variedade de tipos de HLA. Foram escolhidas as regiões: E6 29-38, E6 49-67, E6 127-141, E7 7-20, E7 43-77, E7 79-93.

A seguir, desenhou-se a sequência (Fig. 13) com a fusão das regiões de interesse e a sequência da proteína Ubiquitina (E6E7Ub), esta última conhecida por aumentar a apresentação de antígenos ao sistema imune direcionando as proteínas as quais está fusionada ao proteossomo, melhorando assim o processamento e apresentação dos epítopos e conseqüentemente estimulando uma resposta citotóxica mais robusta (Velders *et al.* 2001).

Utilizou-se códon otimizado para *E. coli*, espaçadores para evitar formação de epítopos entre as fusões e facilitar o processamento pelo proteossomo (Velders *et al.* 2001). Por fim, adicionaram-se sítios de restrição que permitiam o remanejamento da sequência para formar E6E7 fusionada sem ubiquitina e outras combinações, caso fosse necessário durante o andamento do projeto.

5.2.2 Purificação e Imunizações

Após indução dos vetores pAE-E6E7 e pAE-E6E7Ub, verificou-se que a proteína E6E7Ub apresentava-se em corpúsculo de inclusão enquanto a E6E7 mostrava-se solúvel.

Após a purificação, verificou-se que havia diversos contaminantes sendo co-purificados (Fig 17 e 18). Para melhorar o grau de pureza, o protocolo de purificação foi otimizado até a obtenção de um resultado satisfatório (Fig 18 e 19).

Para tanto, testamos diferentes concentrações de imidazol durante as lavagens da purificação para determinar as melhores lavagens que eliminariam os contaminantes sem significativas perdas da proteína E6E7. As concentrações determinadas para as lavagens foram de 20 mM, 40 mM, 60 mM e 100 mM de Imidazol. Nessas concentrações, as alíquotas referentes as eluições apresentaram-se significativamente mais puras (Figs. 19 e 20).

Com a proteína E6E7 solúvel e purificada, realizou-se um ensaio de imunização em colaboração com o Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Dr. Luis Carlos De Souza Ferreira (ICB-USP). Por ser um experimento piloto optou-se por utilizar um modelo profilático para teste das vacinas, assim poderia-se determinar a eficiência da resposta imune produzida por essas e avançar para um modelo terapêutico tendo determinado a melhor condição para a imunização.

Como apresentado na Figura 21, 20 % dos animais imunizados com a proteína E6E7 não desenvolveram o tumor, resultado esse condizente com a literatura (Karanam, Gambhira *et al.*, 2009). Assim isso nos levou a crer que com o aumento da concentração de proteína e utilização de adjuvantes seria possível aumentar o número

de animais resistentes ao desenvolvimento do tumor (Zwaveling, Ferreira Mota *et al.*, 2002; Karanam, Gambhira *et al.*, 2009).

Para a obtenção de uma maior concentração de proteína E6E7, utilizamos para a purificação a fração insolúvel resultante da indução, já que essa possui uma maior concentração da proteína (Fig. 15).

Como a proteína E6E7Ub apresentava-se em corpúsculo de inclusão, foi purificada em Uréia 8M, e a seguir foram utilizados protocolos de renaturação para obtê-la solúvel sem Uréia. Tanto realizando diálise gradual quanto renaturação por diluição, houve a precipitação total da proteína, mesmo adicionando-se agentes estabilizadores como glicina e Tween80 e trabalhando-se em baixas concentrações da proteína. Assim, optou-se por manter a proteína na menor concentração de Uréia possível para evitar a precipitação, sendo essa concentração a de 2M Uréia.

Devido às dificuldades descritas para a obtenção solúvel de E6E7Ub, procuramos utilizar diferentes protocolos. Para tanto, decidimos testar um protocolo de imunização com a proteína E6E7Ub purificada e mantida em baixa concentração de uréia para evitar a sua precipitação, e mantendo-se a proteína E6E7 nas mesmas condições para melhor comparação dos resultados.

Para a realização desse segundo protocolo de imunização, as células TC-1 foram cedidas pelo Dr. Luis Carlos e trazidas para o nosso laboratório. Como o cultivo e armazenamento dessa linhagem foram então estabelecidas, testou-se a viabilidade das células e determinou-se a concentração ideal para utilização em desafios. Sendo a concentração ideal para uso a de $7,5 \times 10^4$.

Com as proteínas E6E7 e E6E7Ub purificadas em baixa concentração de Uréia, realizou-se um segundo ensaio de imunização.

Utilizaram-se dez grupos com 5 animais cada, imunizados com duas doses separadas por duas semanas, e a seguir desafiados com as células TC1 duas semanas após a última dose. Utilizaram-se as proteínas E6E7 e E6E7Ub com 15µg e 40µg, na presença e ausência do adjuvante *whole cell pertussis* (WCP).

Optou-se pela utilização de WCP devido na literatura indicar uma forte resposta citotóxica em ensaios imunoterápicos com peptídeos contra tumores ao se adicionar a WCP como adjuvante, melhorando assim a resposta imune celular anti-tumoral (Yano A. *et al.*, 2007).

No dia anterior à inoculação das células tumorais, retirou-se sangue para a realização de medidas de anticorpos para utilização como parâmetro indireto do tipo de resposta desenvolvida pelo esquema de imunização.

Inicialmente mediu-se a quantidade de IgG total no soro dos animais (Fig. 23 e 24). Os grupos imunizados com E6E7 mostraram uma quantidade de IgG muito maior do que a produzida pela imunização com E6E7Ub, o que pode ser um indicativo de uma maior resposta celular produzida pela proteína E6E7Ub. Já o aumento de concentração de 15 para 40 µg e a utilização de WCP, não alteraram significativamente a produção de anticorpos dos diferentes grupos.

Com relação ao desenvolvimento tumoral nesses grupos, após o desafio com $7,5 \times 10^4$ células TC1, pôde-se observar que os grupos imunizados com E6E7Ub mostraram um grau de proteção muito maior do que os grupos imunizados com E6E7.

Como observado na Figura 25, independentemente da utilização de 15 ou 40 µg de proteína e presença ou ausência de WCP, os grupos imunizados com E6E7Ub

apresentaram proteção contra o tumor entre 80% e 100% dos camundongos, enquanto os grupos imunizados com E6E7 apresentaram proteção entre 0% e 25%.

Tomado em conjunto com os dados obtidos pela quantificação dos anticorpos, esse resultado reforça a idéia de que a resposta responsável pela resistência ao desenvolvimento do tumor quando os camundongos foram imunizados com E6E7Ub se deve a uma resposta celular, já que para a eliminação das células tumorais injetadas no desafio, é necessário o desenvolvimento de uma resposta citotóxica eficaz, evitando assim o crescimento do tumor.

Assim como o obtido por Velders *et al.* 2001, a presença de ubiquitina melhorou a proteção contra as células tumorais injetadas, principalmente devido à melhora do estímulo da resposta citotóxica. Apesar dessa estratégia ter sido usada em vacinas de DNA que representam uma via de inoculação que por si só já melhora a apresentação via MHC de classe I, somente com o fusionamento com a ubiquitina foi possível obter uma proteção que chegava a 100%.

Já no caso de proteínas, há a desvantagem de não estimularem tão eficientemente respostas citotóxicas, mas como demonstrado, ao se fundir com ubiquitina consegue-se considerável melhora na proteção contra o tumor. Além do que a utilização de proteínas como vacina apresenta uma grande vantagem sobre vacinas de DNA, por serem mais seguras para aplicação em humanos e mais fáceis de serem aprovadas pelos órgãos de saúde.

Outra vantagem de nossa estratégia em relação à da vacina de DNA utilizada por Velders *et al.* 2001, é a maior variedade de epítomos com diferentes tipos de restrição a HLA, o que propiciaria uma cobertura muito maior ao ser utilizada em imunização na população.

Apesar dos dados ainda serem preliminares, são bastante sugestivos de que a abordagem utilizada é potencialmente factível. Os ensaios de imunização e desafio com as células tumorais TC1 deverão ser repetidos para confirmação dos resultados e para investigação do tipo de resposta imunológica e envolvimento dos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ na proteção contra o desenvolvimento do tumor, principalmente quando utilizada a proteína E6E7Ub.

Outros ensaios ainda são necessários, para a avaliação da eficácia da vacina em modelo terapêutico. Por exemplo, utilizando um modelo mais próximo do que é encontrado na população, o tumor é induzido com células TC1 até formar um tumor palpável e a seguir é realizada a imunização. Com esse ensaio, seria então checada a possibilidade de utilização e eficácia das proteínas como vacina terapêutica.

6 CONCLUSÃO

6.1 Desenvolvimento das VLPs quiméricas L1E7

- Amplificou-se a proteína L1 sem os últimos 34 aminoácidos (L1 Δ C)
- Construíram-se as fusões L1 Δ CE7₁₋₅₀ e L1 Δ CE7₄₃₋₇₇.
- Após indução da expressão das VLPs quiméricas em *Pichia pastoris*, não foram detectadas expressão das proteínas recombinantes.

6.2 Desenvolvimento das proteínas de fusão E6E7Ub e E6E7

6.2.1 Determinação dos epítomos e desenho da fusão

- Realizou-se um levantamento de artigos que determinaram os epítomos das proteínas E6 e E7 por diferentes metodologias.
- Foram escolhidas as regiões: E6 29-38, E6 49-67, E6 127-141, E7 7-20, E7 43-77, E7 79-93.
- Desenhou-se a sequência com a fusão das regiões de interesse e a sequência da proteína Ubiquitina (E6E7Ub), utilizando-se códon otimizado para *E. coli* e espaçadores para evitar formação de epítomos entre as fusões e facilitar o processamento pelo proteossomo.

6.2.2 Purificação e Imunizações

- Indução dos vetores pAE-E6E7 e pAE-E6E7Ub, verificou-se que a proteína E6E7Ub apresentava-se em corpúsculo de inclusão enquanto a E6E7 mostrava-se solúvel.

- Para melhorar o grau de pureza, o protocolo de purificação foi otimizado até a obtenção de um resultado satisfatório. As concentrações determinadas para as lavagens foram de 20 mM, 40 mM, 60 mM e 100 mM de Imidazol.
- Com a proteína E6E7 solúvel e purificada, realizou-se um ensaio de imunização, 20 % dos animais imunizados com a proteína E6E7 não desenvolveram o tumor.
- Com as proteínas E6E7 e E6E7Ub purificadas em baixa concentração de Uréia, realizou-se um segundo ensaio de imunização. Independentemente da utilização de 15 ou 40 µg de proteína e presença ou ausência de WCP, os grupos imunizados com E6E7Ub apresentaram proteção contra o tumor entre 80% e 100% dos camundongos, enquanto os grupos imunizados com E6E7 apresentaram proteção entre 0% e 25%.
- Mediu-se a quantidade de IgG total no soro dos animais. Os grupos imunizados com E6E7 mostraram uma quantidade de IgG muito maior do que a produzida pela imunização com E6E7Ub, o que pode ser um indicativo de uma maior resposta celular produzida pela proteína E6E7Ub.
- Tomado em conjunto com os dados obtidos pela quantificação dos anticorpos, esse resultado reforça a idéia de que a resposta responsável pela resistência ao desenvolvimento do tumor quando os camundongos foram imunizados com E6E7Ub se deve a uma resposta celular.

7 REFERÊNCIAS

- Bazan SB, de Alencar Muniz Chaves A, Aires KA, Cianciarullo AM, Garcea RL, Ho PL. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Arch Virol*, Sep 10. 2009.
- Bosch, F. X. e S. De Sanjose. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*, n.31, p.3-13. 2003.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v.324, n.1, Jun 20, p.17-27. 2004.
- Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, v.110, n.5, May, p.525-41. 2006.
- Duensing, S. e K. Munger. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*, v.109, n.2, Mar 20, p.157-62. 2004.
- Frazer, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol*, v.4, n.1, Jan, p.46-54. 2004.
- Frazer, I. H. CHAPTER 8 HPV vaccines. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v.94 n.Supplement 1, p.S81-S88. 2006.
- Gallagher KM and Man S (2007). "Identification of HLA-DR1- and HLA-DR15-restricted human papillomavirus type 16 (HPV16) and HPV18 E6 epitopes recognized by CD4+ T cells from healthy young women." *J Gen Virol* 88(Pt 5): 1470-8.
- Greenstone HL, Nieland JD, de Visser KE, De Bruijn ML, Kirnbauer R, Roden RB, Lowy DR, Kast WM, Schiller JT Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.95, n.4, Feb 17, p.1800-5. 1998.
- Groothuis TA, Neefjes J. The many roads to cross-presentation. *J Exp Med*. Nov 21;202(10):1313-8. 2005
- Hochstrasser, M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*, v.7, n.2, Apr, p.215-23. 1995.
- IARC. Cervix Cancer Screening. Lyons: International Agency for Research on Cancer 2005.
- INCA. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. 2005
- Jarrett WF, O'Neil BW, Gaukroger JM, Smith KT, Laird HM, Campo MS. Studies on vaccination against papillomaviruses: the immunity after infection and vaccination with bovine papillomaviruses of different types. *Vet Rec*, v.126, n.19, May 12, p.473-5. 1990.

Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J, He W, Romney SL, Johnson A, Angeletti R, Abadi M; Albert Einstein Cervix Dysplasia Clinical Consortium. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.11, n.5, May, p.483-8. 2002.

Karanam B, Gambhira R, Peng S, Jagu S, Kim DJ, Ketner GW, Stern PL, Adams RJ, Roden RB. Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*, v.27, n.7, Feb 11, p.1040-9. 2009.

Kast WM, Brandt RM, Sidney J, Drijfhout JW, Kubo RT, Grey HM, Melief CJ and Sette A (1994). "Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins." *J Immunol* 152(8): 3904-12.

Kaufmann AM, Nieland JD, Jochmus I, Baur S, Friese K, Gabelsberger J, Gieseeking F, Gissmann L, Glasschroder B, Grubert T, Hillemanns P, Hopfl R, Ikenberg H, Schwarz J, Karrasch M, Knoll A, Kuppers V, Lechmann M, Lelle RJ, Meissner H, Muller RT, Pawlita M, Petry KU, Pilch H, Walek E and Schneider A (2007). "Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3)." *Int J Cancer* 121(12): 2794-800.

Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, Drijfhout JW, Wafelman AR, Oostendorp J, Fleuren GJ, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ. Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. *Clin Cancer Res*, v.14, n.1, Jan 1, p.169-77. 2008.

Kim D, Gambhira R, Karanam B, Monie A, Hung CF, Roden R, Wu TC. Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. *Vaccine*, v.26, n.3, Jan 17, p.351-60. 2008.

Liu XS, Abdul-Jabbar I, Qi YM, Frazer IH, Zhou J. Mucosal immunisation with papillomavirus virus-like particles elicits systemic and mucosal immunity in mice. *Virology*, v.252, n.1, Dec 5, p.39-45. 1998.

Morishima S, Akatsuka Y, Nawa A, Kondo E, Kiyono T, Torikai H, Nakanishi T, Ito Y, Tsujimura K, Iwata K, Ito K, Kodera Y, Morishima Y, Kuzushima K and Takahashi T (2007). "Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: the combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope." *Int J Cancer* 120(3): 594-604.

Müller M, Zhou J, Reed TD, Rittmüller C, Burger A, Gabelsberger J, Braspenning J, Gissmann L. Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology*, v.234, n.1, Jul 21, p.93-111. 1997.

Munger, K. e P. M. Howley. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, v.89, n.2, Nov, p.213-28. 2002.

Nakagawa M, Kim KH, Gillam TM and Moscicki AB (2007). "HLA class I binding promiscuity of the CD8 T-cell epitopes of human papillomavirus type 16 E6 protein." *J Virol* 81(3): 1412-23.

Nakagawa M, Kim KH and Moscicki AB (2004). "Different methods of identifying new antigenic epitopes of human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins." *Clin Diagn Lab Immunol* 11(5): 889-96.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, v.55, n.2, Mar-Apr, p.74-108. 2005.

Peng S, Trimble C, Wu L, Pardoll D, Roden R, Hung CF and Wu TC (2007). "HLA-DQB1*02-restricted HPV-16 E7 peptide-specific CD4+ T-cell immune responses correlate with regression of HPV-16-associated high-grade squamous intraepithelial lesions." *Clin Cancer Res* 13(8): 2479-87.

Piersma SJ, Welters MJ, van der Hulst JM, Kloth JN, Kwappenberg KM, Trimbos BJ, Melief CJ, Hellebrekers BW, Fleuren GJ, Kenter GG, Offringa R and van der Burg SH (2008). "Human papilloma virus specific T cells infiltrating cervical cancer and draining lymph nodes show remarkably frequent use of HLA-DQ and -DP as a restriction element." *Int J Cancer* 122(3): 486-94.

Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*, v.37, n.8, Aug, p.1103-9. 2004.

Ressing ME, de Jong JH, Brandt RM, Drijfhout JW, Benckhuijsen WE, Schreuder GM, Offringa R, Kast WM and Melief CJ (1999). "Differential binding of viral peptides to HLA-A2 alleles. Implications for human papillomavirus type 16 E7 peptide-based vaccination against cervical carcinoma." *Eur J Immunol* 29(4): 1292-303.

Ressing ME, Sette A, Brandt RM, Ruppert J, Wentworth PA, Hartman M, Oseroff C, Grey HM, Melief CJ and Kast WM (1995). "Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides." *J Immunol* 154(11): 5934-43.

Schiller JT, Castellsagué X, Villa LL, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*, v.26 Suppl 10, Aug 19, p.K53-61. 2008.

Schreurs MW, Kueter EW, Scholten KB, Lemonnier FA, Meijer CJ and Hooijberg E (2005). "A single amino acid substitution improves the in vivo immunogenicity of the HPV16 oncoprotein E7(11-20) cytotoxic T lymphocyte epitope." *Vaccine* 23(31): 4005-10.

Stauss HJ, Davies H, Sadovnikova E, Chain B, Horowitz N and Sinclair C (1992). "Induction of cytotoxic T lymphocytes with peptides in vitro: identification of candidate T-cell epitopes in human papilloma virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17): 7871-5.

van den Hende M, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, de Jong J, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Valentijn AR, Wafelman AR, Slappendel GM, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH, Kenter GG. Skin reactions to human papillomavirus (HPV) 16 specific antigens intradermally injected in healthy subjects and patients with cervical neoplasia. *Int J Cancer*, v.123, n.1, Jul 1, p.146-52. 2008.

van der Burg SH, Rensing ME, Kwappenberg KM, de Jong A, Straathof K, de Jong J, Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL, Ottenhoff TH, Fleuren GJ, Kenter G, Melief CJ and Offringa R (2001). "Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes." *Int J Cancer* 91(5): 612-8.

Velders MP, Weijzen S, Eiben GL, Elmishad AG, Kloetzel PM, Higgins T, Ciccarelli RB, Evans M, Man S, Smith L, Kast WM Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol*, v.166, n.9, May 1, p.5366-73. 2001.

Venuti A, Massa S, Mett V, Vedova LD, Paolini F, Franconi R, Yusibov V. An E7-based therapeutic vaccine protects mice against HPV16 associated cancer. *Vaccine*, v.27, n.25-26, May 26, p.3395-7. 2009.

Von Knebel Doeberitz, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*, v.38, n.17, Nov, p.2229-42. 2002.

Withers-Martinez C, Carpenter EP, Hackett F, Ely B, Sajid M, Grainger M and Blackman MJ (1999). "PCR-based gene synthesis as an efficient approach for expression of the A+T-rich malaria genome." *Protein Eng* 12(12): 1113-20.

Woo YL, van den Hende M, Sterling JC, Coleman N, Crawford RA, Kwappenberg KM, Stanley MA, van der Burg SH. A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. *Int J Cancer*, Jul 30. 2009.

Wright TC, Bosch FX, Franco EL, Cuzick J, Schiller JT, Garnett GP, Meheus A. Chapter 30: HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts. *Vaccine*, v.24 Suppl 3, Aug 21, p.S251-61. 2006.

Yano A, Komatsu T, Ishibashi M, Udaka K Potent CTL induction by a whole cell pertussis vaccine in anti-tumor peptide immunotherapy. *Microbiol Immunol.*;51(7):685-99. 2007

Zur Hausen, H. Viruses in human cancers. *Science*, v.254, n.5035, Nov 22, p.1167-73. 1991.

Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol*, v.169, n.1, Jul 1, p.350-8. 2002.