

BRUNA FELÍCIO MILAZZOTTO MALDONADO PORCHIA

**Construção e análise das propriedades profiláticas e terapêuticas
de uma vacina contra tumores associados ao
HPV-16**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

SÃO PAULO

2009

RESUMO

PORCHIA, B.F.M.M. **Construção e análise das propriedades profiláticas e terapêuticas de uma vacina contra tumores associados ao HPV-16.** 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Cerca de 500.000 novos casos de câncer cervical são detectados a cada ano, causando a morte de aproximadamente 270.000 mulheres em todo mundo. O desenvolvimento de vacinas contra o vírus do papiloma humano (HPV) representa uma importante alternativa para o controle da infecção sexualmente transmissível e do câncer cervical. O HPV-16 é o tipo mais prevalente e expressa as oncoproteínas (E6, e E7) responsáveis pelo processo de malignização de queratinócitos. Neste trabalho exploramos uma estratégia vacinal inédita contra tumores induzidos pelo HPV-16 empregando uma forma recombinante da proteína E7 obtida após fusão genética com a glicoproteína D (gD) do vírus herpes tipo 1 (HSV-1), uma proteína de membrana com propriedades adjuvantes endógenas particularmente para linfócitos T. A proteína híbrida recombinante foi obtida em sistema de expressão bacteriano (*E. coli* com vetor da série pET) bem como em sistema de expressão baculovírus/células de inseto e purificada por cromatografia de afinidade. A proteína expressa em sistema pET concentrou-se totalmente no extrato insolúvel bacteriano mas a solubilidade foi obtida após desnaturação e *refolding*. A proteína gDE7 gerada em sistema bacteriano foi testada nas formas insolúvel e solúvel como vacina de subunidades de administração parenteral em camundongos machos C57BL/6. A proteína gDE7 insolúvel, administrada em quatro doses com uma semana de intervalo entre as doses, conferiu 80% de proteção profilática para o crescimento tumoral em camundongos desafiados com células TC-1. Já a proteína gDE7 que passou pelo processo de *refolding*, e permaneceu na forma solúvel, foi capaz de proteger 100% dos animais quando administrada de modo profilático para o crescimento tumoral. A gDE7 solúvel foi capaz de proteger 30% dos animais desafiados quando testada de forma terapêutica. A eficácia da formulação vacinal observada nos ensaios de proteção foi confirmada na avaliação de respostas imunológicas específicas mediadas por linfócitos T CD8+ através de ensaios de ELISPOT, citotoxicidade *in vivo*, ICS (*Intracellular Cytokine Staining*) e Elisa de citocinas. Adicionalmente, realizamos ensaios para dosagem de anticorpos anti-gD

específicos e anti-E7 específicos. Além disso, testamos também o potencial neutralizante dos soros gerados frente ao HSV-1. As condições de expressão das proteínas expressas em células de inseto infectadas com baculovírus foram estabelecidas. Os resultados obtidos durante a execução deste projeto de mestrado podem contribuir para o desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal para o controle de tumores induzidos pelo HPV-16.

Palavras-chave: Vacinas. Neoplasias. HPV-16. Glicoproteína D. E7. Purificação de proteínas. HSV-1.

ABSTRACT

PORCHIA, B.F.M.M. **Construction and analysis of the prophylactic and therapeutic proprieties of a vaccine against HPV-16 associated tumors.** 114 p. Dissertation (Master in Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

About 500,000 new cases of cervical cancer are detected each year, killing approximately 270,000 women around the world. The development of vaccines against human papillomavirus (HPV) represents an important alternative to control this sexually transmitted infection and cervical cancer. HPV-16 is the most prevalent virus type associated with cervical cancer and infected cells expresses oncoproteins (E6 and E7) responsible for the malignization process. In this paper we explored a new vaccine strategy against HPV-16 induced tumors using a recombinant form of E7 protein obtained after genetic fusion with glycoprotein D (gD) of type 1 human herpes virus (HSV-1), a membrane protein with endogenous adjuvant properties particularly for T lymphocytes. The recombinant hybrid protein was obtained in bacterial expression system (*E. coli* vector pET series) as well as in baculovirus-infected insect cells and subsequently purified by affinity chromatography. The proteins expressed in pET vectors accumulated in the insoluble bacterial extract but soluble protein was obtained after denaturation and refolding. The gDE7 protein generated in bacterial cells was tested in the insoluble and soluble forms as a subunit vaccine administered subcutaneously in C57BL/6 mice. The gDE7 insoluble protein, administered in four doses at weekly intervals, resulted in 80% prophylactic protection to tumor growth in mice challenged with TC-1 cells. The gDE7 protein, submitted to the refolding process, conferred 100% of prophylactic protection in vaccinated mice. The soluble gDE7 conferred 30% protection to mice when tested therapeutically in mice challenged with TC-1 cells. The protection conferred by the vaccine was supported by results regarding evaluation of E7-specific CD8 + T cell response through ELISPOT, *in vivo* cytotoxicity, ICS (Intracellular Cytokine Staining) and cytokine ELISA. Additionally, gD-specific and E7-specific antibody responses were measured in vaccinated mice but the anti-HSV-1 sera did not inactivate HSV-1 virus particules. The conditions allowing expression of the recombinant proteins in baculovirus-infected cells were established. The results obtained during the present

study contribute to the development of a new vaccine strategy for the control of HPV-16-induced tumors.

Keywords: Vaccines. Neoplasia. HPV-16. Glycoprotein D. E7. Protein purification.HSV-1.

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 500.000 novos casos de câncer de colo de útero são detectados todos os anos, sendo este o segundo tipo de câncer mais comum (depois do câncer de mama) entre as mulheres em todo o mundo (RODEN, LING e WU, 2004), causando em torno de 270.000 mortes por ano (PISANI et al., 1999; ZUR HAUSEN, 2006; WU, 2007). Em certos países, a prevalência da infecção alcança 80% das mulheres sexualmente ativas. Dados comprovam que o vírus do papiloma humano (HPV) é o agente presente em mais de 99% dos casos de câncer cervical (WALBOOMERS et al., 1999), sendo que dos mais de 200 tipos, o HPV do tipo 16 é o mais freqüentemente associado com o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) e de tumor cervical (CHU et al., 2000). Alguns autores acreditam que o HPV é responsável por um terço dos casos de câncer em humanos (ZHENG et al., 2004). De acordo com zur Hausen (1996), alguns tipos de HPV também podem ser encontrados na cavidade bucal, laringe, pulmões, cavidade respiratória, esôfago e na pele, e alguns autores acreditam que este vírus é responsável por dois terços dos cânceres que acometem os humanos.

O aumento do uso do exame papanicolau nos Estados Unidos durante as últimas cinco décadas gerou um declínio de 70% no número de óbitos por câncer cervical, demonstrando a importância da prevenção no controle da doença. Porém, tal exame não é aplicado de forma ampla nos países em desenvolvimento devido ao seu alto custo, e tal fato contribui para que a doença alcance um número mais elevado de vítimas. Estima-se que os Estados Unidos gastam anualmente seis bilhões de dólares com essa prática. Conforme dados estimados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de novos casos ultrapassou 18.680 em 2008 no Brasil, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres. A Organização Mundial de Saúde prevê um aumento para aproximadamente 36.800 novos casos no ano de 2030 no país (GOLDIE et al., 2007).

O papilomavírus pertence à família *Papovaviridae*, é um vírus não envelopado, possui DNA de dupla fita circular de aproximadamente 8000 pares de bases e tem simetria icosaédrica. Além disso, o papilomavírus possui especificidade ao seu hospedeiro, assim, o CRPV (*Cottontail rabbit papillomavirus*) infecta apenas coelhos, o BPV (*Bovine Papillomavirus*) infecta bovinos, o COPV (*Canine Oral*

Papillomavirus) infecta os cães e o HPV (*Human Papillomavirus*) infecta os humanos (BREITBURD e COURSAGET, 1999). Atualmente mais de 200 tipos de HPV estão descritos (PAAVONEN, 2007; MATSUKURA e SUGASE, 2008), e podem ser definidos como de alto risco os tipos capazes de imortalizar os queratinócitos e levar ao quadro clínico de câncer (tipos 16, 18, 33, 45, entre outros), e de baixo risco os tipos que dificilmente causarão tumores (tipos 11, 29, 63, 65, entre outros) (ZUR HAUSEN, 1996).

A infecção e o crescimento vegetativo do vírus são absolutamente dependentes do processo de diferenciação dos queratinócitos. A infecção ocorre nas camadas basais do epitélio, mas a expressão das oncoproteínas ocorre nas camadas superiores onde os queratinócitos estão em um estágio mais avançado de diferenciação (STANLEY, 2006). O fato de o rearranjo viral e sua liberação ocorrer em queratinócitos maduros que logo entrarão em apoptose, e também a falta de processos inflamatórios na infecção, explicam o “escape” da vigilância do sistema imunológico à infecção.

O HPV possui dois genes de expressão tardia (*Late*) que codificam as proteínas do capsídeo. Essas proteínas, L1 e L2, são expressas nas camadas mais superficiais do epitélio e promovem o rearranjo viral e a liberação do vírus, que assim completa seu ciclo. A proteína L1 é o alvo das vacinas profiláticas contra o HPV, como a Gardasil (Merck Sharpe & Domme) e a Cervarix (Glaxo Smith Kline), licenciadas recentemente para uso em humanos. O objetivo das vacinas profiláticas é produzir anticorpos neutralizantes que previnam as infecções pelo vírus HPV. A produção desta vacina consiste em expressar os monômeros de L1 *in vitro* que se agregam em VLPs (*Virus Like Particles*), porém, não contêm a informação genética do vírus (OAKNIN e BARRETINA, 2008; SENGER et al., 2009). No entanto existem algumas dificuldades, como a ausência de proteção cruzada entre as diferentes L1 existentes nos mais de 200 tipos de HPV descritos.

Os genes de expressão imediata (*Early*) do HPV codificam seis proteínas com variadas funções: E1, E2, E4, E5, E6 e E7. A proteína E1 está relacionada à replicação do DNA viral e funciona como uma helicase (STANLEY et al., 2007). O gene E2 codifica uma proteína que é responsável pelo controle da transcrição dos genes virais. De acordo com sua concentração no interior da célula, a expressão dos demais genes virais é controlada, estimulando ou inibindo a transcrição destes (ZUR HAUSEN, 1999; LASARO et al., 2004). A proteína E4 é expressa nos extratos

superiores do epitélio infectado onde promove modificações no citoesqueleto que facilitam a montagem e liberação das partículas virais. A proteína E5 estimula a proliferação celular através da interação com várias proteínas celulares, entre elas, o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) reduzindo sua degradação e estimulando a divisão celular. Possui importância crucial nos estágios precoces da transformação celular, mas não é mais expresso em estágios tardios no ciclo viral. (CRUSIUS et al., 1997; ZUR HAUSEN, 2002; STANLEY et al., 2007). A transformação e malignização das células infectadas pelo HPV ocorrem quando as proteínas de expressão imediata E6 e E7 inativam respectivamente os produtos dos genes supressores de tumores, p53 e pRB, levando ao descontrole do crescimento celular.

A proteína p53 é responsável por monitorar danos ocorridos na molécula de DNA a cada ciclo celular, e desta forma, a progressão do ciclo é impedida até que o dano seja reparado (LEWIN, 2000). A expressão da proteína E6 do HPV pelas células infectadas resulta na degradação da p53 e o ciclo celular passa a ocorrer sem reparos. Estudos recentes elucidaram novas funções da proteína E6, como por exemplo, a ativação da telomerase (YUGAWA e KIYONO, 2009). A subunidade catalítica da transcriptase reversa da telomerase (hTERT), expressa somente em um pequeno grupo de células como as células-tronco, é um componente limitante da atividade da telomerase. Descobriu-se que a proteína E6 do HPV-16 é capaz de promover a degradação do repressor de hTERT, o NFX1-91 promovendo assim a ativação da telomerase em queratinócitos infectados.

A proteína pRB promove a regulação negativa do ciclo celular na transição das fases G1 e S através da atividade de E2F, o fator responsável pela transcrição de genes que atuam na replicação dos cromossomos. Estudos recentes demonstraram o mecanismo pelo qual a proteína E7 perturba o ciclo celular (YUGAWA e KIYONO, 2009). Em um primeiro passo, a proteína E7 recruta uma protease dependente de cálcio, a calpaina, que promove a clivagem da porção C' terminal de pRB resultando na liberação de E2F. A clivagem parece ser pré-requisito para a degradação de pRB via proteossomo. A liberação de E2F e a degradação de pRB causa uma perturbação do ciclo celular através de um estímulo excessivo para a proliferação dos queratinócitos infectados.

As proteínas E6 e E7 são expressas continuamente em tumores e são essenciais para a manutenção do ciclo viral. Além de controlar o ciclo celular das

células infectadas, as oncoproteínas E6 e E7 modulam o sistema imune de forma que as células tumorais tornam-se pouco imunogênicas. Tal processo pode acarretar até na tolerância imunológica ao tumor (TINDLE, 2002).

A maioria das infecções por HPV é transiente, sendo que o tempo necessário para a sua eliminação varia entre 8-14 meses para os HPVs de alto risco e 5-6 meses para os HPVs de baixo risco. Porém, se o sistema imune falhar na eliminação do vírus ou no controle da infecção, existe grandes chances de se desenvolver uma neoplasia intra-epitelial cervical ou até mesmo um carcinoma invasivo (STANLEY, 2005). A progressão de lesões benignas para carcinomas invasivos está relacionada com a persistência da infecção, a integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro, ao aumento da expressão de E6 e E7 e a conseqüente tolerização dos antígenos tumorais.

A concepção de que células neoplásicas adaptam-se e podem evadir-se de respostas imunológicas antitumorais é convidativa para o desenvolvimento de imunoterapias que contornem tais mecanismos de escape. A imunoterapia contra o câncer surge como uma estratégia promissora no controle de tumores, capaz de desenvolver imunidade específica contra células malignas sem atacar as células saudáveis, e para tal, é preciso que se estimulem adequadamente células apresentadoras de antígeno (APCs) e linfócitos T específicos contra antígenos tumorais (WANG et al., 1998). Existem muitas vantagens em utilizar imunoterapia no controle de tumores, e a mais importante delas é a baixa toxicidade quando comparada a terapias tradicionais como a quimioterapia e a radioterapia. Diversos grupos têm gerado resultados promissores nesta área de pesquisa (HALLIN et al., 1997; BARBUTO et al., 2004; AVIGAN et al., 2004; LU et al., 2004) e demonstram que os linfócitos T citotóxicos têm grande importância na eliminação de células neoplásicas e por isso despertam interesse para estratégias imunoterápicas para o controle de câncer em humanos. Ensaio com imunossuprimidos ilustram a importância da resposta imune mediada por células na resolução ou controle da infecção do HPV. Pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam ocorrências múltiplas de neoplasia intra-epitelial cervical e alta incidência de verrugas genitais (STANLEY, 2005). Além disso, alguns estudos sugerem que o HIV pode aumentar a oncogenicidade dos tipos de alto risco assim como ativar os tipos de baixo risco (NICOL et al., 2005).

Diferentes estratégias vacinais com enfoque terapêutico vêm sendo testadas nos últimos anos com o objetivo de induzir resposta citotóxica contra as células neoplásicas que expressam as oncoproteínas do HPV16. São elas: vacinas de proteína purificada, fusionada ou não a adjuvantes, vacinas de DNA, vacinas virais ou de bactérias recombinantes, vacinas de células dendríticas e vacinas que utilizam peptídeos (RODEN; LING e WU, 2004). Testes com proteínas purificadas utilizadas como formulação vacinal contra o HPV vêm sendo realizados e revelam duas vantagens: não apresentam restrição de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) e são menos dependentes do HLA (Antígeno Leucocitário Humano) do paciente (RODEN; LING e WU, 2004).

Jong e colaboradores (2002) desenvolveram uma vacina que compreendia as oncoproteínas do HPV16 E6 e E7 fusionadas à L2, proteína do capsídeo viral, denominada TA-CIN. A vacina foi administrada sem adjuvantes pela via intramuscular e desencadeou resposta de células T citotóxicas contra as oncoproteínas E6 e E7 e de anticorpos neutralizantes (IgG) contra proteínas do capsídeo do HPV em modelo murino mas os resultados não foram tão animadores em humanos. Karanam et al. (2009) utilizaram a mesma formulação co-administrada ao adjuvante GPI-0100, um análogo semi-sintético da saponina quillaja, conhecida por promover respostas humoral e celular. Este grupo alcançou resultados muito promissores em modelo murino e em macacos. Outro estudo mostrou que a proteína E7 fusionada à proteína D de *Haemophilus influenzae* administrada com o adjuvante AS02B da Glaxo-SmithKline foi bem tolerada e melhorou a atividade das células T citotóxicas levando à regressão de lesões em alguns pacientes (HALLEZ et al., 2004). Chu et al. (2000) demonstrou uma imunoterapia eficiente baseada na administração de uma proteína de fusão compreendida pela HSP65 (*heat shock protein 65*) do *Mycobacterium bovis* e a E7 do HPV16. A vacina causou a regressão de tumores palpáveis por volta do 28º dia após a implantação do tumor, e protegeu frente a um segundo desafio com uma carga maior de células tumorais. A sobrevivência dos animais foi maior devido à ativação de linfócitos T CD8+ específicos contra a proteína E7 do HPV. Fernando e colaboradores (1999) testaram uma vacina baseada na fusão da E7 à glutathione-S-transferase (GST). Camundongos imunizados com a E7GST e com o adjuvante Quil-A apresentaram ativação de resposta imune celular contra a proteína E7 do HPV16 e ficaram protegidos a desafios com células tumorais. Em outra abordagem, uma vacina baseada na fusão

da E7 com as proteínas do capsídeo do HPV16 L1/L2 na forma de VLPs foi capaz de proteger camundongos C57BL/6 contra o desafio de células tumorais TC-1, através da ativação da resposta de linfócitos T CD8+. A vacina indica que VLPs quiméricas podem ser usadas como excelentes veículos na geração de resposta imune celular.

As vacinas de DNA compreendem vetores plasmidiais que codificam o antígeno sob o controle de um promotor eucarioto forte tornando as células capazes de expressar e apresentar o antígeno como durante a infecção viral, e assim, desencadear respostas imunológicas específicas (ALVES et al., 2001). Essa imunoterapia tem sido empregada devido à sua simplicidade de produção, administração e estabilidade. Para o HPV, a proteção induzida por vacinas de DNA requer a expressão conjunta da E7 fusionada a diferentes proteínas, o que pode resultar em proteção profilática e terapêutica a desafios com células tumorais (CHEN et al., 2000; CHENG et al., 2001; HUNG et al., 2001; TRIMBLE et al., 2003; HSIEH et al., 2004).

Em trabalho desenvolvido no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE) da Universidade de São Paulo produziu-se uma vacina de DNA baseada na expressão de uma proteína híbrida, resultado da fusão da oncoproteína E7 do HPV com a glicoproteína D do Herpes simplex vírus 1 (HSV-1) (LASARO et al., 2005). A estratégia empregada consistiu na clonagem do gene da E7 em sítio próximo à extremidade C-terminal da gD. Animais imunizados apresentaram proteção profilática de 100% quando desafiados com a linhagem tumoral TC-1, enquanto a abordagem terapêutica alcançou 40% de eficácia após quatro doses das vacinas. A proteção alcançada foi relacionada à capacidade da vacina desencadear respostas dependentes de linfócitos T CD8+ específicos contra a oncoproteína E7 (LASARO et al., 2005). Tais resultados foram atribuídos às propriedades adjuvantes da proteína gD codificada pelas vacinas de DNA. Embora o mecanismo preciso do efeito adjuvante associado à proteína gD ainda não seja conhecido, os resultados relativos à ativação de linfócitos T citotóxicos são muito promissores e mereciam ser explorados, particularmente na forma de proteína purificada.

Os adjuvantes são componentes importantes nas formulações vacinais. A palavra adjuvante tem origem no latim *adjuvare* e quer dizer ajudar. Os adjuvantes aumentam a imunogenicidade do antígeno, atuando como imunomoduladores ou como sistemas de entrega (O'HAGAN e VALIANTE, 2003). Três sinais são

necessários para desencadear uma resposta imune adequada. O primeiro sinal ou sinal 0, refere-se à ativação do sistema imune através da transmissão de “sinais de perigo” desencadeados pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). O segundo sinal ou sinal 1, diz respeito ao antígeno propriamente dito, seu processamento e apresentação via molécula de MHC nos órgãos linfóides. Já o terceiro sinal ou sinal 2, refere-se à interação de receptores e ligantes que disparam sinais co-estimulatórios para linfócitos, por exemplo (REED et al., 2008).

Os adjuvantes podem atuar sobre os três sinais. Ao interagir com Toll-like receptors (flagelinas de *Salmonella* e toxinas bacterianas) o adjuvante atua sobre o sinal 0 (REED et al., 2008). Ao facilitar a entrega dos antígenos aos órgãos linfóides (lipossomas e microesferas) o adjuvante atua sobre o sinal 1. E, por fim, ao interagir com receptores celulares responsáveis por enviar sinais co-estimulatórios ou co-inibitórios ao sistema imune (HVEM, herpes virus entry mediator), o adjuvante atua sobre o sinal 2. A formulação vacinal ideal deve atuar em um ou mais sinais para gerar uma resposta imune eficiente (PERRIE et al., 2008).

Existem alguns adjuvantes já aprovados para uso em vacinas para humanos: **1)** os sais de alumínio – Alum – utilizado em vacinas contra o vírus da pólio inativado e *Haemophilus influenzae B*, entre outras; **2)** Emulsões óleo em água – MF59™ – utilizado em formulações vacinais contra influenza; **3)** Derivados não tóxicos do lipopolissacarídeo de *Salmonella minnesota* (LPS) – MPL® - utilizado na vacina licenciada contra a hepatite B; **4)** as VLPs ou *virus like particles* – formulação da vacina profilática contra o HPV e **5)** subunidade B da toxina colérica – utilizada para melhorar a resposta imune da vacina contra o cólera que utiliza o próprio microorganismo inativado (REED et al., 2008; PERRIE et al., 2008). A pesquisa que envolve a descoberta de novos adjuvantes vacinais cresce a cada ano e alguns já estão em processo de desenvolvimento.

As glicoproteínas do HSV são componentes estruturais do envelope do vírion e são expressas na membrana plasmática de células infectadas, agindo como principal estímulo antigênico para a resposta imune celular e humoral contra o vírus (NORRILD et al., 1980; AURELIAN, 2004). A gD do HSV-1 e do HSV-2 têm alto nível de similaridade e podem gerar proteção contra ambos tipos virais (LONG et al., 1984), além de ser o principal alvo para ativação de linfócitos TCD4+ em estratégias vacinais contra o HSV-1 (MIKLOSKA e CUNNINGHAM, 1998). A glicosilação da

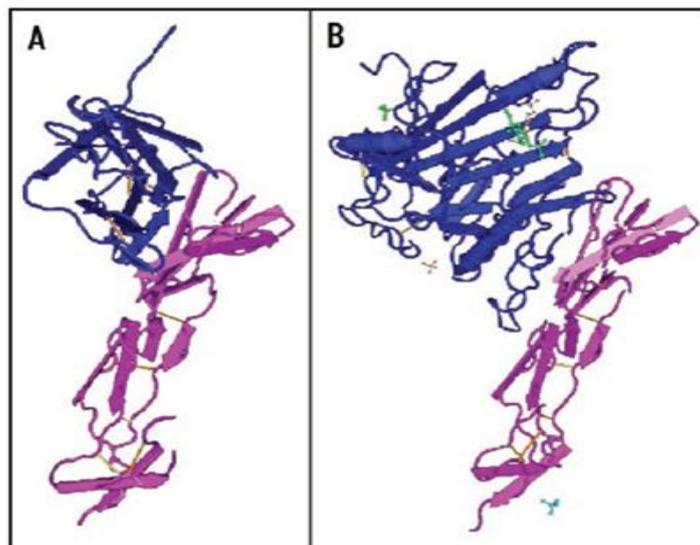
proteína gD é essencial para a ativação de linfócitos e de células dendríticas, com papel crucial na geração de uma imunidade protetora (AURELIAN et al., 1991). Pollara e colaboradores (2004) sugeriram que a gD do HSV causa ativação de células do sistema imune e induz produção de IFN- γ através da ativação de NF- κ B.

Além disso, a porção N-terminal da gD possui um domínio de ligação ao receptor HVEM compreendido pelos aminoácidos 7-15 e 24-32 desta proteína (CONNOLLY et al., 2002). O HVEM faz parte da família de receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR) e está expresso em diversos tipos celulares (linfócitos T e B, monócitos e células dendríticas) e tecidos. A função desse receptor é transmitir sinais co-estimulatórios ou co-inibitórios ao sistema imune através da interação com moléculas como LIGHT, as linfotoxinas α , BTLA e CD160 (GONZALEZ et al., 2005; CAI e FREEMAN, 2009).

O papel da proteína LIGHT já foi bem descrito. Linfócitos T ativados e co-estimulados pela via HVEM-LIGHT produzem citocinas que direcionam a resposta para o tipo Th1 (T-helper 1) como, por exemplo, o IFN- γ e o GM-CSF. Quando o gene que codifica para a proteína LIGHT é deletado em modelo murino são observados níveis mais baixos de secreção de IFN- γ . Por outro lado, a expressão constitutiva de LIGHT em camundongos transgênicos resultou em profundas alterações inflamatórias e um aumento da atividade de citocinas do tipo Th-1 em linfócitos T (GRANGER e RICKERT, 2003). O papel dessa proteína na estimulação de processos inflamatórios e na estimulação de células T também foi recentemente elucidado através de um estudo com tumores transfectados com LIGHT. Os tumores estimularam a inflamação do tecido adjacente e a proliferação de células T via HVEM (MURPHY et al., 2006). Portanto, a expressão da proteína LIGHT e sua interação com receptores HVEM aumentam a ativação de linfócitos T citotóxicos resultando em um combate preciso a tumores.

Além de moléculas estimuladoras, moléculas inibidoras, como o BTLA (B and T lymphocyte attenuator) e o CD160 também interagem com o receptor HVEM e suprimem a ativação de células T (CROFT, 2005). O papel inibitório de BTLA em células T é bem conhecido através de estudos de transplantes. Normalmente, camundongos C57BL/6 toleram aloenxertos cardíacos por mais de 100 dias. Entretanto, camundongos deficientes na expressão de BTLA rejeitam rapidamente o enxerto, o que indica que o BTLA é predominantemente um inibidor de respostas imunológicas (MURPHY et al., 2006).

O HVEM contém três domínios ricos em cisteína (CRD's) comuns aos membros da família TNFR. A estrutura cristalina do complexo gD e HVEM e experimentos de mutagênese mostram que o sítio de ligação da glicoproteína D está presente no CRD1, enquanto o CRD2 apresenta um domínio estrutural de suporte para que a ligação ocorra no CRD1 (CONNOLLY et al., 2002). Gonzalez e colaboradores (2005) demonstraram que os sítios de ligação da gD e das moléculas estimulatórias linfotóxicas α e LIGHT estão posicionados em lados opostos no receptor e não se sobrepõem. Porém, mostraram que BTLA parece competir pelo mesmo sítio de ligação da gD. A hipótese foi comprovada com a utilização de um peptídeo (BP-2) capaz de bloquear a ligação gD-HVEM. A mesma concentração de BP-2 que inibiu a ligação da gD ao HVEM também foi capaz de inibir a ligação de BTLA ao HVEM. E mais diretamente, utilizando uma forma recombinante da gD (Δ 290-299), os autores conseguiram demonstrar o bloqueio da ligação de BTLA ao receptor HVEM pela proteína.



LASARO (2008)

Figura 1 - Modelo estrutural do HVEM humano ligado ao BTLA **(A)** e à gD do HSV-1 **(B)**. O HVEM está representado em vermelho e o BTLA e a gD estão representados em azul.

O uso da proteína quimérica gD/antígeno tem a vantagem de não interromper de modo sistêmico os sinais inibitórios mediados por BTLA ao sistema imune. Lasaro e colaboradores (2008) analisaram o efeito localizado de uma vacina de DNA que codifica para uma proteína híbrida (gD/antígeno) através da inoculação de dois

vetores adenovirais que expressavam a gD e o antígeno, em sítios anatômicos distantes. Os autores não observaram um aumento de respostas de linfócitos T CD8+ antígeno-específico, sugerindo que a inibição é restrita ao local da apresentação do antígeno.

Esses dados são de extrema importância quando se tem uma estratégia vacinal que emprega a glicoproteína D de HSV como potencial adjuvante. Espera-se que a gD, inoculada na forma de proteína híbrida gDE7, compita com o BTLA pelo receptor HVEM e conseqüentemente, promova um aumento de respostas inflamatórias e ativação de células T CD8+ nas imediações do tumor, através da sinalização favorecida de LIGHT. Vale lembrar que a proteína E7 do HPV foi fusionada ao aminoácido 244 da gD, distante do sítio de ligação ao receptor HVEM.

Para se testar as propriedades profiláticas e terapêuticas de vacinas contra o câncer induzido pelo HPV, o modelo tumoral para experimentação animal desenvolvido pelo grupo do Professor T.C. Wu do Instituto Johns Hopkins (EUA) é amplamente utilizado. Esse modelo consiste de células primárias de pulmão de camundongos C57BL/6 imortalizadas pela oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 e transformadas com uma cópia do oncogene *ras* mutado e ativado. Essa linhagem celular mimetiza a progressão natural de tumores cervicais nos quais as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 imortalizam as células e mutações adicionais conferem a elas um potencial metastático. (LIN et al., 1996). Portanto, esta linhagem tumoral é concebida como um excelente modelo para análise das propriedades de vacinas contra tumores cervicais e é utilizado por grandes grupos de pesquisa da área.

Tendo em vista essas informações, investigamos o poder profilático e terapêutico da proteína E7 fusionada à gD em modelo murino de crescimento tumoral. Para isto, utilizamos a proteína recombinante purificada a partir de sistema procariótico. A proteína foi testada na forma de vacina de subunidade para avaliação dos efeitos profiláticos e terapêuticos contra tumores induzidos pelo HPV-16.

2 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Baseando-se nos resultados obtidos durante a execução do presente estudo podemos chegar às seguintes conclusões:

1) Foi possível clonar e expressar o gene que codifica para as proteínas gD e gDE7 em vetor de expressão em *E. coli*. As seqüências clonadas possuem uma cauda de seis resíduos de histidina e foram confirmadas pela técnica de seqüenciamento. As proteínas expressas neste sistema permaneceram no extrato insolúvel de *E. coli*, mesmo após várias tentativas de solubilização e otimização das condições de cultivo;

2) Conseguimos purificar as proteínas a partir do extrato insolúvel de *E. coli* quando tampões contendo 8M de uréia foram utilizados para solubilizar os corpúsculos de inclusão. O rendimento de produção após purificação alcançou 0,055 g/L para a proteína gD e 0,05 g/L para a proteína gDE7;

3) As proteínas insolúveis provenientes das diálises foram administradas na forma desnaturada por via subcutânea em camundongos C57BL/6 para a análise da resposta imunológica e de proteção contra desafio com TC-1. Camundongos imunizados de forma profilática com a formulação vacinal gDE7 insolúvel e desnaturada ficaram protegidos em 80% após desafio com a linhagem tumoral TC-1. Já o grupo imunizado com as proteínas co-administradas gD+E7 apresentaram valores de proteção de 20% após o desafio com as células tumorais. Provavelmente o efeito adjuvante da proteína gD na formulação vacinal não é dependente da interação com o receptor HVEM e deve refletir uma melhor entrega do antígeno E7 às células apresentadoras de antígeno e o aumento da sua persistência intracelular;

4) Ensaios de ELISPOT confirmaram a secreção de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais imunizados com a gDE7 em relação ao grupo imunizado somente com a proteína E7;

5) Proteínas solúveis provenientes do extrato insolúvel bacteriano foram obtidas a partir do *refolding* realizado em aparelho de filtração tangencial no qual a

uréia foi retirada. Utilizando esse sistema de purificação conseguimos que aproximadamente 20% das proteínas purificadas permanecessem a forma solúvel após a completa retirada da uréia;

6) A proteção profilática antitumoral da formulação vacinal compreendida pela proteína de fusão gDE7 solúvel atingiu 100% dos animais após quatro doses e permaneceu protetora perante segundo desafio com a mesma carga de células TC-1. A capacidade adjuvante da proteína gD quando fusionada ao antígeno E7 também foi confirmada pelo aumento das respostas celular e humoral E7-específica induzidas:

- a) detecção de linfócitos TCD8⁺ IFN- γ ⁺ por ICS foi mais elevada no grupo tratado com a proteína gDE7 em comparação com aquele tratado com o antígeno isolado;
- b) a porcentagem de lise E7-específica de células alvo in vivo por linfócitos TCD8⁺ citotóxicos do grupo tratado com gDE7 foi maior em relação aos grupos tratado com o antígeno E7 isolado e tratado com a gD co-administrada à E7;
- c) citocinas do tipo Th1 (IFN- γ) foram detectadas em níveis significativamente maiores no grupo imunizado com a formulação gDE7 do que no grupo imunizado com o antígeno E7 isolado;
- d) a detecção de anticorpos da subclasse IgG2c no soro dos animais imunizados com a proteína gDE7 mostrou que a proteína de fusão tende a mudar o padrão de resposta imunológica induzida para um padrão Th1 em relação aos grupos imunizados somente com o antígeno E7, corroborando com o resultado obtido na dosagem de citocinas.

7) Testes de neutralização viral contra o HSV-1 foram realizados para investigação do potencial bivalente da formulação vacinal gDE7 mediado pela proteína gD. Os resultados obtidos neste ensaio revelaram que o soro gerado com a proteína gDE7 não foi capaz de neutralizar o vírus HSV-1. Os soros considerados neutralizantes nos ensaios foram aqueles em que a proteína gD foi administrada nos animais de forma isolada.

8) A proteção terapêutica antitumoral da formulação vacinal da gDE7 solúvel alcançou 30% dos animais previamente inoculados com células tumorais quando administrada próxima ao sítio do tumor e 20% quando administrada em um sítio distante do tumor;

9) Detectamos através de citometria de fluxo a interação das proteínas solúveis produzidas durante a execução deste trabalho com monócitos U937, células que expressam o HVEM em sua superfície. Ensaio complementares ainda são necessários para confirmar se a interação detectada ocorre com o receptor celular HVEM;

10) Os genes da proteína gD e da gDE7 foram clonados e expressos em sistema baculovírus/células de inseto e as proteínas solúveis puderam ser coletadas e purificadas a partir do sobrenadante das culturas. Após a purificação, alcançamos rendimentos de 1mg/L da proteína gD e 1,2 mg/L da proteína gDE7. Infelizmente as quantidades obtidas não foram suficientes para a realização de ensaios *in vivo*, e por esse motivo, se tornam perspectivas para um trabalho futuro visto o potencial antitumoral promissor alcançado pela proteína gDE7 solúvel gerada em sistema bacteriano de expressão.

REFERÊNCIAS*

ALVES, A.M.B et al. DNA immunization against CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Vaccine**, v. 19, p. 788-795, 2001.

AURELIAN, L. et al. Immune responses to herpes simplex virus in guinea pigs (footpad model) and mice immunized with vaccinia virus recombinants containing herpes simplex virus glycoprotein D. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. 924–934, 1991.

AURELIAN, L. Herpes simplex virus type 2 vaccines: new ground for optimism? **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.11, n. 3, p. 437-445, 2004.

AVIGAN, D. Dendritic cell/tumour fusions vaccine. **Dev Biol.**, v. 116, p. 179-86, 2004.

BARBUTO, J.A. et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 12, p. 1111-8, 2004.

BREITBURD, F.; COURSAGET, P. Human papillomavirus vaccines. **Semin. Cancer Biol.**, v. 9, n. 6, p. 431-44, 1999.

CAI, G.; FREEMAN, G.J. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. **Immunol. Rev.**, v. 229, n. 1, p. 244-58, 2009.

CHEN, C.H. et al. Boosting with recombinant vaccinia increases HPV16 E7-specific T cell precursor frequencies of HPV16 E7-expressing DNA vaccines. **Vaccine**, v.18, p. 2015-2022, 2000.

CHENG, W.F. et al. Tumor-specific immunity antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 5, p. 669-678, 2001.

CHU, N.R. et al. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumor by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 121, p. 216-225, 2000.

CONNOLLY, S.A. et al. Structure-Based Analysis of the Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Binding Site Present on Herpesvirus Entry Mediator HveA (HVEM), **J. Virol.**, v. 76, n. 21, p. 10894-10904, 2002.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CROFT, M. The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA **TRENDS Immunol.**, v. 26, n. 6, p. 292-294, 2005.

CRUSIUS, K.; AUVINEN, E.; ALONSO, A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. **Oncogene**, v. 15, n. 12, p. 1437-44, 1997.

FERNANDO, G.J.P. et al. Expression, purification and immunological characterization of the transforming protein E7, from cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 115, p. 397-403, 1999.

GOLDIE, S.J. et al. Cost-effectiveness of HPV 16, 18 vaccination in Brazil. **Vaccine**, v. 25, p. 6257-6270, 2007.

GONZALEZ, L.C. et al. A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 102, n. 4, p. 1116-1121, 2005.

GRANGER, S.W.; RICKERT, S. LIGHT – HVEM signaling and the regulation of T-cell mediated immunity, **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 14, p. 289-296, 2003.

HALLIN, P.A.; ADAMS, V.R. Cancer vaccines. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 37, n. 5, p. 598-9, 1997.

HALLEZ, S. et al. Phase I/II trial of immunogenicity of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein-based vaccine in women with oncogenic HPV-positive cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 7, p. 642-650, 2004.

HSIEH, C.J. et al. Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. **Vaccine**, v. 22, p. 3993-4001, 2004.

HUNG, C.F. et al. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. **Cancer Res.**, v. 61, p. 3698-3703, 2001.

JONG, A. et al. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16L2E7E6 fusion protein vaccine. **Vaccine**, v. 20, p. 3456-3464, 2002.

KARANAM, B. et al., Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. **Vaccine**, v. 27, p. 1040-1049, 2009.

LASARO, M.O.; ERTL, H.C. Human papillomavirus-associated cervical cancer: Prophylactic and therapeutic vaccines. **Gene Ther. Mol. Biol.**, v. 8, p. 291-306, 2004.

LASARO, M.O. et al. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes Infect.**, v. 15, p. 1541-50, 2005.

LASARO, M.O. et al. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. **Nat. Med.**, v.2, p. 205-12, 2008.

LEWIN, M. et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 18, n. 4, p. 410-414, 2000.

LIN, K.Y. et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Res.**, v.56, p.21-26, 1996.

LU, S. et al. Vaccines in leukemia. **Adv. Pharmacol.**, v. 51, p. 255-70, 2004.

MATSUKURA, T.; SUGASE, M. Pitfalls in the epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer using polymerase chain reaction: driver and passenger. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v.18, n. 5, p. 1042-50, 2008.

MIKLOSKA, Z.; CUNNINGHAM, A. L. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC, and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. **J. Gen.Virol.**, v. 79, p. 353–361, 1998.

MURPHY, K.M.; NELSON, C.A.; SEDY, J.R. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, p. 671-681, 2006.

NICOL, A.F.; FERNANDES, A.T.G.; BONECINI-ALMEIDA, M.G. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2005.

NORRILD, B. et al. Preparation of three major glycoprotein antigens of herpes simplex virus type 1 early in the infection cycle as determined by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. **Infect. Immun.**, v. 28, n. 1, p. 38-44, 1980.

OAKNIN, A.; BARRETINA, M.P. Human papillomavirus vaccine and cervical cancer prevention. **Clin. Transl. Oncol.**, v. 10, n.12, p. 804-11, 2008.

O'HAGAN, D.T.; VALIANTE, N.M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 9, p. 727-35, 2003.

PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **Int. J. Infect Dis.**, v.11, p. 3-9, 2007.

- PERRIE, Y. et al. Vaccine adjuvants systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. **Int. J. Pharm.**, v. 364, p. 272-280, 2008.
- PISANI, P. et al. Estimate of worldwide mortality from 25 cancers in 1990. **Int. J. Cancer**, v. 83, p. 18-29, 1999.
- REED, S.G. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol.**, v. 30, n. 1, p. 23-32, 2008.
- RODEN, R. B. S.; MORRIS LING, B.S.; WU, T.C. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. **Hum. Pathol.**, v. 35, n. 8, p. 971-982, 2004.
- SENGER, T. et al. Enhanced papillomavirus-like particle production in insect cells. **Virology**, v. 388, n. 2, p. 344-53, 2009.
- STANLEY, M. Immune response to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, p. 16-22, 2006.
- STANLEY, M. Prophylactic HPV vaccines. **Drugs Today**, v. 10, p. 737-44, 2007.
- TINDLE, R.W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 59-65, 2002.
- TRIMBLE, C. et al. Comparison of the CD8+ cell responses and anti-tumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. **Vaccine**, v. 21, p. 4036-4042, 2003.
- WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, v. 189, p. 12-19, 1999.
- WANG, J.; SAFFOLD, S.; CAO, X. Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. **J. Immunol.**, v. 161, n. 10, p. 5516-5524, 1998.
- WU, Y.C.; DEYRIEUX, A.F.; WILSON, V.G. Papillomaviruses and the host sumoylation system. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 1433-5, 2007.
- YUGAWA, T.; KIYONO, T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. **Rev. Med. Virol.**, v. 19, n. 2, p. 97-113, 2009.
- ZHENG, J. et al. Highly efficient and economical baculovirus expression system for preparing human papillomavirus type 16 virus-like particles. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 36, n. 8, p. 548-552, 2004.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1288, p. 55-78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. **Semin. Cancer Biol.**, v. 9, n. 6, p. 405-11, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-50, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Perspectives of contemporary papillomavirus research. **Vaccine**, v. 24, 2006. Suppl. 3.