



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

(21) BR 102017004730-0 A2

(22) Data do Depósito: 09/03/2017

(43) Data da Publicação: 30/10/2018



* B R 1 0 2 0 1 7 0 0 4 7 3 0 A

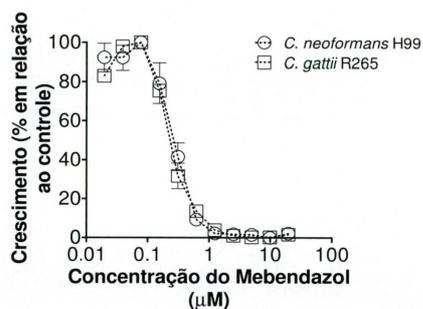
(54) Título: GENES ESSENCIAIS DE CRYPTOCOCCUS.

(51) Int. Cl.: C12Q 1/18; C12N 15/52; C12N 1/19; C12R 1/645

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

(72) Inventor(es): MARCIO L. RODRIGUES; LUNA SOBRINO JOFFE; MARILENE HENNING VAINSTEIN; AUGUSTO SCHRANK; LIVIA KMETZSCH ROSA E SILVA; CHARLEY CHRISTIAN STAATS; RAFAEL SCHNEIDER; MÁRCIO L. RODRIGUES; LUNA SOBRINO JOFFE; MARILENE HENNING VAINSTEIN; AUGUSTO SCHRANK; LÍVIA KMETZSCH ROSA E SILVA; RAFAEL SCHNEIDER; CHARLEY CHRISTIAN STAATS

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/03/2017



“GENES ESSENCIAIS DE *CRYPTOCOCCUS*”

[001] A presente invenção se refere a métodos para identificação e validação de genes essenciais do fungo *Cryptococcus* como alvos efetivos para intervenção terapêutica em indivíduos acometidos por criptococose.

[002] A presente invenção também provê polinucleotídeos essenciais do fungo *Cryptococcus* e seus polipeptídeos codificados, homólogos destes e seus usos. Adicionalmente, a invenção ainda provê métodos para identificação de polinucleotídeos e polipeptídeos essenciais os quais podem ser utilizados para a triagem de compostos com atividade antifúngica.

[003] Ainda, a presente invenção também se dirige a métodos para identificação de cepas de *Cryptococcus*, selvagens ou mutantes, as quais são úteis para a triagem de compostos com atividade antifúngica.

[004] Especificamente, a presente invenção se refere a métodos para identificação e validação de dois genes, e seus produtos nucleotídicos e proteicos, identificados em *Cryptococcus*, quais sejam, CNBG_3695 e CNBG_3981, responsáveis pela produção da proteína nucleolar 16 (NOP16) e de uma escramblase, respectivamente, como alvos efetivos para intervenção terapêutica contra a infecção fúngica.

[005] Mais especificamente, a presente invenção se refere a métodos laboratoriais, insumos, microrganismos e kits para a triagem de novas drogas antifúngicas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[006] O gênero atualmente conhecido como *Cryptococcus* foi primeiramente descrito em 1894. Diferentes nomenclaturas foram adotadas a partir desse e de outros achados no gênero *Cryptococcus*, até que a classificação como *Cryptococcus neoformans*, filo Basidiomycota, classe Tremellomycetes e ordem Tremelales foi adotada nos anos 50. Hoje, mais de 30 espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* são conhecidas, sendo *C. neoformans* e *C. gattii* mais comumente descritas como causadoras de doença

em homens e animais. As espécies de *C. neoformans* possuem distribuição global, ao contrário da distribuição em regiões tropicais e subtropicais de *C. gattii*. Foram identificados reservatórios ambientais de *C. gattii* no norte dos EUA, Canadá e norte da Europa, sugerindo que essa espécie pode ter nichos ambientais diversos [1].

[007] Com base na reação de aglutinação capsular por anticorpos, as espécies patogênicas pertencentes ao gênero *Cryptococcus* são classificadas em 5 sorotipos diferentes: A, B, C, D e o híbrido AD. Inicialmente, as espécies de *C. neoformans* foram divididas em duas variedades: *neoformans* (sorotipos A, D e o híbrido AD) e *gattii* (sorotipos B e C). Posteriormente, estudos moleculares e de genômica revelaram variações genéticas significativas entre os sorotipos A e D, levando a uma divisão da espécie *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e var. *neoformans* (sorotipo D). Propriedades genéticas únicas levaram à classificação dos sorotipos B e C como a espécie *C. gattii* [2].

[008] A criptococose é adquirida por inalação de basidiósporos ou leveduras dessecadas ambientais. As partículas inaladas são depositadas no espaço alveolar, com posterior colonização do interstício pulmonar. No hospedeiro saudável, a criptococose é geralmente assintomática ou subclínica e restrita a tecidos pulmonares. Em hospedeiros imunocomprometidos, *C. neoformans* pode se disseminar para outros tecidos, com tropismo pelo sistema nervoso central. Nesse sítio de infecção, o fungo causa uma meningoencefalite que é fatal na ausência de tratamento.

[009] Estudos no Brasil demonstraram que *C. neoformans* se destaca como o principal causador de micoses letais em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O padrão patogênico de sua espécie irmã, *C. gattii*, é alarmante, uma vez que, ao contrário do *C. neoformans*, essa espécie atinge preferencialmente pacientes imunocompetentes [3]. Dentre os pacientes portadores de AIDS, espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus*

laterais de α -1,3 e α -1,4 manose, além de xilose β -1,2 e β -1,3 ligadas e ácido glucurônico β -1,3 ligado. A organização da superfície celular em *C. neoformans* requer interações entre componentes da parede celular e da cápsula. Algumas moléculas já foram caracterizadas como participantes nessas interações, incluindo GXM, α -1, 3-glucana e oligômeros de quitina [6]. Os polissacarídeos capsulares em *C. neoformans* são sintetizados em sítios citoplasmáticos, ao contrário do que ocorre com a maioria dos polissacarídeos microbianos. A liberação da GXM para o meio extracelular através de vesículas secretórias tornaria então o polissacarídeo disponível para o crescimento capsular [7].

[0013] A GXM está consistentemente associada a uma variedade de efeitos imunomodulatórios. Foi descrito que esse polissacarídeo causa inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos humanos, indução de produção de IL-10, inibição da maturação e ativação de células dendríticas e supressão da proliferação de células T na presença de células apresentadoras de antígenos. Além disso, a GXM é capaz de atenuar mecanismos de imunidade Th1-dependentes, de limitar a expressão de moléculas de MHC classe II, e de reduzir a atividade quimiotática sobre células efectoras de imunidade. Estes efeitos contribuem para a patogênese das infecções por *C. neoformans*, que são notoriamente persistentes e de difícil erradicação através de mecanismos de imunidade [8].

[0014] Além disso, a GXM é capaz de ativar diferentes receptores durante o processo infeccioso, provocando respostas diversas em células de imunidade. O polissacarídeo pode interagir com CD18, além de se ligar a CD14 e receptores do tipo Toll (TLR) [9]. A GXM é reconhecida tanto por CD14 quanto pelos TLRs 2 e 4, num processo que parece ser determinante para o curso da infecção [9]. Nosso grupo demonstrou que a ausência de TLR2 em macrófagos resulta em índices reduzidos de fagocitose de *C. neoformans*.

[0015] *C. neoformans* é considerado um agente patogênico intracelular facultativo, apresentando capacidade de sobreviver no interior de macrófagos, células da microglia e células endoteliais [10]. Essa é uma característica chave na sua patogênese. Os mecanismos relacionados a essa característica são múltiplos, incluindo extrusão de fagossomos e propagação entre fagócitos sem que o fungo atinja o ambiente extracelular. A cápsula tem um papel importante no parasitismo intracelular, conforme deduzido pelo fato de que mutantes acapsulares não são capazes de replicar no interior de células fagocíticas. Além de ser fundamental no escape contra células do sistema imune hospedeiro quando associada à cápsula, a GXM secretada para o ambiente extracelular também contribui para escape das defesas do hospedeiro [11].

[0016] Outra habilidade de virulência do fungo abrange a capacidade de crescer em temperaturas de 37°C. Já foram identificados 12 genes necessários para crescimento a 37°C. Dentre eles, o gene codificador de calcineurina A, uma serina-treonina fosfatase que é ativada por cálcio-calmodulina e é envolvida na resposta ao estresse em leveduras. Quando o gene para calcineurina A foi deletado em *C. neoformans*, o fungo foi incapaz de crescer a 37°C, tornando-se incapaz de causar danos ao hospedeiro em modelos de criptococose experimental.

[0017] Outro fator de virulência do fungo é a produção de melanina, um pigmento hidrofóbico de alto peso molecular formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos. A síntese desse pigmento em *C. neoformans* é catalisada pela enzima lacase, que polimeriza compostos difenólicos como a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Já foi descrito em *C. neoformans* o envolvimento da melanina na resistência contra a ação de defensas antimicrobianas e fagocitose por macrófagos. A síntese de melanina também está amplamente associada ao neurotropismo das espécies de *Cryptococcus*, visto que há uma alta disponibilidade de compostos

difenólicos no cérebro.

[0018] De acordo com dados apresentados pelo Fundo Global de Ações contra Infecções Fúngicas (GAFFI, da denominação em inglês Global Action Fund for Fungal Infections), mais de 300 milhões de pessoas de todas as idades sofrem de alguma infecção fúngica grave a cada ano no globo. É estimado que, nesse grupo, mais de 1,5 milhões de pessoas morrerão a cada ano. Nesse cenário, os patógenos fúngicos *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* causam coletivamente um milhão de mortes de humanos por ano. Essas estatísticas são comparáveis as observadas para malária e tuberculose, causadoras de 1,2 e 1,4 milhões de mortes por ano, respectivamente. *Cryptococcus neoformans* é o fungo de maior mortalidade para humanos. No Brasil, o *C. neoformans* é o principal causador de morte em pacientes imunodeprimidos acometidos por micoses sistêmicas e no mundo mata mais de 500 mil humanos por ano. O padrão patogênico de sua espécie irmã, *C. gattii*, é alarmante, uma vez que, ao contrário do *C. neoformans*, essa espécie atinge preferencialmente pacientes imunocompetentes.

[0019] Apesar do impacto causado pelas doenças fúngica, apenas cinco classes de antifúngicos estão disponíveis atualmente na clínica, sendo elas os análogos de pirimidina, as alilaminas, os poliênicos, os azóis e as equinocandinas. E, somente três classes de moléculas estão atualmente aprovadas para o tratamento de micoses invasivas [12].

[0020] Agentes antifúngicos poliênicos (como anfotericina B e nistatina) atuam através da sua ligação ao ergosterol, um esterol presente na membrana plasmática fúngica que é essencial para integridade e regulação de fluidez membrana. Essa ligação resulta na formação de poros que permitem o efluxo iônico, resultando em morte celular. A anfotericina B possui um amplo espectro de ação, sendo utilizada por via intravenosa para o tratamento de infecções fúngicas invasivas conjugadas a deoxicolato ou em formulações

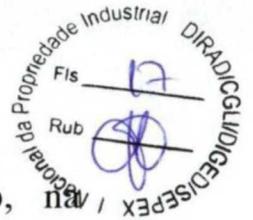
lipossomais, lipídicas ou coloidal. Apesar de eficazes, as formulações contendo anfotericina B induzem alta toxicidade, possivelmente justificada pela alta similaridade estrutural entre ergosterol e colesterol. Nefrotoxicidade é o efeito tóxico mais comumente descrito para pacientes que fazem uso dessa terapia.

[0021] O ergosterol é, indiretamente, alvo de outras classes de antifúngicos, como, por exemplo os azóis. Essa classe de antifúngico é a mais utilizada para tratamento de infecções fúngicas superficiais e invasivas. Compostos azólicos atuam sobre etapas de biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima lanosterol 14- α -demetilase, codificada pelo gene ERG11. Essa é uma etapa chave no processo de síntese do ergosterol, cujo bloqueio resulta na acumulação de intermediários tóxicos.

[0022] A síntese do ergosterol é também alvejada pelas alilaminas. Essa classe de antifúngicos atua inibindo de forma reversível a enzima esqualeno epoxidase, que age em etapas iniciais da via biossintética do ergosterol. O representante mais comum dessa classe de drogas é a terbinafina, que possui um amplo espectro de ação e é frequentemente utilizado para tratamento de onicomicoses.

[0023] Além dos azóis e alilaminas, outras classes de antifúngicos possuem alvos citoplasmáticos. Os análogos de pirimidinas, por exemplo, interferem com a síntese de ácidos nucleicos. A 5- fluorocitosina (5-FC), principal representante dessa classe, é transportada para o interior da célula fúngica por uma citosina permease, para então sofrer modificações metabólicas e conversão final em estruturas inibidoras da enzima timidilato sintase, interrompendo assim a síntese do DNA. Antifúngicos citoplasmáticos incluem também os inibidores mitóticos como a griseofulvina, que se liga à tubulina e causa desorganização nos fusos mitóticos.

[0024] A classe de antifúngicos mais recentemente descoberta, em 2002, corresponde às equinocandinas, que incluem as caspofunginas,



micafungina e anidulafungina. As equinocandinas atuam inibindo, na membrana plasmática, a β -1,3 glucana sintase, enzima responsável pela polimerização de glucanas β -1,3 ligadas componentes da parede celular de fungos. Esses antifúngicos são eficazes para o tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida* e *Aspergillus*. As equinocandinas, entretanto, não possuem efeito sobre *C. neoformans*.

[0025] O padrão ouro de tratamento da meningoencefalite causada por *Cryptococcus* spp. é a associação de anfotericina B com 5-FC. Entretanto, formulações lipídicas ou lipossomais da anfotericina B, menos tóxicas, tem custo muito elevado. A 5-fluocitosina não está disponível em várias regiões com limitações socioeconômicas [13]. Além disso, o tratamento requer administração intravenosa e monitoramento terapêutico próximo por conta da nefrotoxicidade da anfotericina B e toxicidade hematológica da 5-FC. Nesse cenário, em regiões como a África subsaariana foi implantado o uso do fluconazol, de administração oral e custo reduzido. Entretanto, o fluconazol é menos efetivo que a combinação da anfotericina B com 5-FC [14]. Além disso, o fluconazol vem sendo associado ao surgimento de cepas de *C. neoformans* resistentes. Nesse contexto, é clara a necessidade de novos antifúngicos para tratamento da criptococose humana [15].

[0026] A validação de um alvo celular para fins de triagem de fármacos geralmente envolve a demonstração experimental de que a inativação desse produto celular torna o microrganismo avirulento, em algum grau; ou ainda, modula ou impede seu crescimento, sobrevivência ou viabilidade ao atuar em vias metabólicas essenciais para o metabolismo do fungo. Consequentemente, um fármaco ativo contra um produto celular essencial, por exemplo, a cápsula do *C. neoformans* seria considerado como um agente terapêutico eficaz. Do mesmo modo, espera-se que um produto celular necessário para patogenicidade e virulência proporcione um alvo adequado para triagem de fármaco. A validação do alvo, neste caso, é baseada

na demonstração de que a inativação do gene que codifica o fator de virulência cria uma cepa de fungo que se torna menos patogênica ou, idealmente avirulenta, em estudos de modelos animais. A identificação e validação de alvos de fármacos são questões críticas para a detecção e identificação de novos fármacos porque estes alvos constituem a base para plataformas de alto rendimento na indústria farmacêutica.

[0027] A pesquisa de alvos para novas drogas terapêuticas é tradicionalmente custosa e laboriosa, principalmente pelo fato de a análise de novos alvos, quer sejam genes ou produtos de genes, ser realizada individualmente. Sequenciamentos de DNA genômicos completos tem marcadamente acelerado o processo de identificação de novos genes essenciais alvo. Consequentemente, novos métodos e ferramentas são necessários para analisar esta informação, para identificar e discernir quais genes codificam produtos os quais podem ser alvos potenciais para novas drogas efetivas, sem efeitos adversos e viáveis economicamente. A identificação, por sequenciamento, de genes não valida seu potencial como alvos para novas drogas. A elucidação da função primária e a determinação do quanto essa função é ou não essencial para o microrganismo ainda se apresenta como um obstáculo para a identificação de apropriados alvos de drogas

[0028] A conclusão recente de iniciativas para sequenciamento do DNA genômico de *C. neoformans* e *C. gattii* estimularam esforços para identificação de novos alvos de fármacos antifúngicos. No entanto, permanece um obstáculo à exploração desta informação para o desenvolvimento de fármacos úteis: a dificuldade em se estabelecer se um gene específico codifica um produto essencial [16, 17].

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0029] A presente invenção se refere a métodos para identificação e validação de produtos de genes essenciais do fungo *Cryptococcus* como alvos

efetivos para intervenção terapêutica em indivíduos acometidos pela criptococose.

[0030] A presente invenção também provê polinucleotídeos essenciais do fungo *Cryptococcus* e seus polipeptídeos codificados, homólogos destes e seus usos. Adicionalmente, a invenção ainda provê métodos para identificação de polinucleotídeos e polipeptídeos essenciais os quais podem ser utilizados para a triagem de compostos com atividade antifúngica.

[0031] Ainda, a presente invenção também se dirige a métodos para identificação de cepas de fungo, selvagens ou mutantes, as quais são úteis para a triagem de compostos com atividade antifúngica.

[0032] Especificamente, a presente invenção se refere a métodos para validação de dois genes e seus produtos nucleotídicos e proteicos, identificados em *Cryptococcus*, quais sejam, CNBG_3695 e CNBG_3981, responsáveis pela produção da proteína nucleolar 16 (NOP16) e de escramblase como alvos efetivos para intervenção terapêutica contra a infecção fúngica.

[0033] Mais especificamente, a presente invenção se refere a um processo para identificação de um composto antifúngico caracterizado por modular, aumentar ou diminuir a atividade dos produtos dos genes essenciais da proteína NOP16 e da escramblase de *Cryptococcus* ao:

a) contactar o dito produto ou fragmentos deste com um composto ou uma pluralidade de compostos ou uma preparação compreendendo um ou mais ligantes; e

b) determinar se o dito composto ou a pluralidade de compostos ou a preparação compreendendo um ou mais ligantes modula, aumenta ou diminui a atividade do dito produto do gene ou fragmentos deste.

[0034] A presente invenção ainda descreve o processo para identificação de um composto antifúngico caracterizado por ter habilidade para inibir o crescimento, proliferação, sobrevivência ou viabilidade do

Cryptococcus, ou modular ou inibir a produção de subprodutos celulares ou extracelulares, compreendendo as seguintes etapas:

a) reduzir o nível ou a atividade dos produtos dos genes da NOP16 e da escramblase em uma célula de *Cryptococcus*, em relação ao tipo celular normal, sem que a dita redução seja letal para a dita célula;

b) contactar a dita célula com um composto ou uma pluralidade de compostos ou uma preparação compreendendo um ou mais ligantes; e

c) determinar o quanto o dito composto ou a pluralidade de compostos ou a preparação compreendendo um ou mais ligantes inibiu ou modulou o crescimento, proliferação, sobrevivência ou viabilidade da dita célula ou a produção de produtos celulares ou extracelulares.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0035] Figura 1: Efeito antifúngico da droga mebendazol contra a cepa H99 de *C. neoformans* e R265 de *C. gattii*.

[0036] Figura 2: Perfil de sensibilidade de 8.000 mutantes de *C. gattii* ao mebendazol. As setas vermelhas indicam os dois mutantes mais resistentes ao antifúngico.

[0037] Figura 3: Identificação de ortólogos das sequências identificadas como necessárias para a ação antifúngica do mebendazol nos mutantes P38-A1 e P46-G7.

[0038] Figura 4: Perfil de secreção de glucuronoxilomanana GXM por ensaio imunoenzimático de três cepas de *C. gattii*, P38-A1 e P46-G7 (mutantes) e R265 (controle), nos tempos de 24, 48 e 72h.

[0039] Figura 5: Perfil visual da cinética de pigmentação de três cepas de *C. gattii*, P38-A1 e P46-G7 (mutantes) e R265 (controle), nos tempos de 24, 48 e 72h, em meio de cultura sólido contendo L-dopa.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0040] A presente invenção se refere a métodos para identificação e

validação de produtos provenientes de genes essenciais do fungo *Cryptococcus* como alvos efetivos para intervenção terapêutica em indivíduos acometidos por criptococose.

[0041] A presente invenção é dirigida para genes essenciais de *Cryptococcus* e seu uso em plataformas para triagem de novos fármacos antifúngicos. A invenção compreende a seleção de genes essenciais interessantes para triagem de fármacos com atividade criptocócica a partir de (i) construção de mutantes de *Cryptococcus* (mutantes nocaute ou com expressão condicional de genes aleatórios) e (ii) verificação da essencialidade fisiológica dos genes deletados para o microrganismo, sua interferência na virulência ou na patogenicidade do fungo por determinação experimental. Confirmada a essencialidade, cepas mutantes ou o produto dos genes essenciais identificados são utilizados na busca de novos antifúngicos contra a criptococose.

[0042] Em uma forma de realização da presente invenção, são identificados o gene CNBG_3981 (SEQ ID NO: 1), responsável pela produção de uma escramblase putativa e o gene CNBG_3695 (SEQ ID NO: 2), responsável pela produção da proteína nucleolar 16 putativa (NOP16). Os genes foram identificados por comparações de sequências com genes de todos os organismos vivos e sua importância para o crescimento, sobrevivência, viabilidade e proliferação do microrganismo foi determinada experimentalmente. As cepas mutantes para CNBG_3695 e CNBG_3981 se mostraram úteis para a triagem de novos fármacos antifúngicos.

[0043] A presente invenção, em outro aspecto, engloba o uso de perfis transcricionais, técnicas de proteômica ou de interatoma para analisar a expressão de genes essenciais e/ou de virulência de *Cryptococcus* sob uma variedade de condições, inclusive na presença de compostos antifúngicos já conhecidos. A informação alcançada a partir destes estudos pode ser utilizada para a identificação do alvo e dos mecanismos de ação das drogas

nocauteadas para um gene. Na verdade, a demonstração direta da expressão do gene em questão, associada à viabilidade da célula que carrega o gene, é requerida para a confirmação inequívoca que o gene em questão é essencial.

[0046] Neste sentido, em gene essencial de *Cryptococcus* pode ser colocado sob controle de um promotor heterólogo regulável de modo que uma variação de níveis de expressão da célula mutante possa ser obtida. Tais níveis de expressão de um gene essencial incluem níveis muito baixos ou negligenciáveis, permitindo a avaliação do fenótipo de tal mutante de *Cryptococcus* geneticamente alterado com expressão condicional quando em condições normais de crescimento ou outras condições permissivas de crescimento. A perda ou redução da viabilidade ou crescimento da cepa mutante confirma a essencialidade do gene de *Cryptococcus*.

[0047] De acordo com os métodos da invenção, uma coleção de mutantes com expressão condicionada de *Cryptococcus* foi gerada, na qual a taxa de produção dos genes específicos foi modulada, de modo que as funções de sobrevivência, crescimento, viabilidade, proliferação e/ou patogenicidade puderam ser investigadas. As informações obtidas a partir destes estudos permitiram a identificação e validação de produtos de genes individuais como alvos potenciais de drogas. A presente invenção ainda provê métodos de uso dos mutantes genéticos individualmente ou como uma coleção em triagem de drogas e para investigação de mecanismos de ação de drogas.

[0048] Ainda se pode considerar que, pelo fato de as sequências serem conservadas entre os produtos de genes essenciais de *Cryptococcus* e outros fungos patogênicos *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida glabrata* e *Coccidioides posadasii*, os produtos dos genes essenciais de *Cryptococcus* podem ser usados para auxiliar no desenho racional de drogas contra produtos gênicos semelhantes de outros fungos patogênicos humanos. Assim, os genes essenciais em *Cryptococcus* podem ser utilizados no desenvolvimento de drogas que tenham ação contra os fungos *Candida*

Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories.

[0053] A presente invenção também provê polinucleotídeos essenciais do fungo *Cryptococcus* e seus polipeptídeos codificados, homólogos destes e seus usos. Os genes ou polinucleotídeos dos genes CNBG_3695 e CNBG_3981, aqui descritos, podem ser utilizados para vários propósitos para triagem de novos fármacos antifúngicos. Sem limitação, os polinucleotídeos podem ser utilizados para expressar proteínas recombinantes para caracterização do microrganismo ou determinação de função biológica microbiana ou para rastreamento de fármacos antifúngicos que atuem impedindo ou limitando a proliferação fúngica; ou para utilização terapêutica a partir de técnicas de interferência de RNA (por exemplo, moléculas anti-sense) ou por ligação de proteína-proteína (por exemplo, por interação receptor-ligante).

[0054] As sequências de polinucleotídeos também podem ser utilizadas em ensaios para identificar outros polinucleotídeos ligantes ou receptores, ou para identificar inibidores do evento de ligação (interação receptor-ligante), ou mesmo para isolar os receptores ou ligantes, especialmente no caso de fatores de virulência. As proteínas ou polinucleotídeos envolvidos nestas interações também podem ser usadas para triar peptídeos ou pequenas moléculas inibidoras ou agonistas de interação de ligação, ou quaisquer moléculas envolvidas.

[0055] Na presente invenção, os genes modificados em *Cryptococcus* correspondem a um gene essencial, que é requerido para a sobrevivência, crescimento e proliferação da cepa fúngica. Em um aspecto mais preferível, o gene modificado de *Cryptococcus* resulta em uma cepa mutante com fenótipo alterado, em relação à cepa original, em relação à sobrevivência, crescimento e proliferação da cepa fúngica.

[0056] Em outro aspecto, a presente invenção provê cepas mutantes de *C. neoformans* ou *C. gattii* nas quais os genes essenciais são modificados

pela introdução (por exemplo, por recombinação) de um promotor heterólogo, de tal forma que a expressão do gene essencial é regulada pelo promotor heterólogo.

[0057] Ainda, a presente invenção também se dirige a métodos para identificação de cepas de fungo, selvagens ou mutantes, as quais podem ser utilizadas para a triagem de compostos com atividade antifúngica.

[0058] Técnicas de manipulação genética e biologia molecular de fungos patogênicos vêm sendo usadas amplamente desde os anos 1990. Várias das técnicas visando mutações sítio-dirigidas desenvolvidas na levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae* foram implantadas em modelos de grande importância médica, como *Candida* e *Aspergillus*. Nesses patógenos, métodos de eletroporação e transformação clássicos vêm sendo usados com sucesso e poderiam ser adaptados ao modelo experimental aqui descrito. Em *Cryptococcus*, essas técnicas são de baixa eficiência, devido ao fato da superfície desse fungo estar envolvida por uma densa camada de polissacarídeos capsulares.

[0059] A técnica para interrupção de genes que se mostrou eficiente em *Cryptococcus* foi a técnica de mutagênese por inserção, amplamente utilizada para identificação de genes de patogenicidade fúngica [19]. Mutagênese por inserção é definida como uma alteração de sequências gênicas através da inserção de uma ou mais bases componentes do DNA. Esse tipo de mutagênese pode ocorrer naturalmente na natureza ou artificialmente em laboratório.

[0060] Neste sentido, para *Cryptococcus*, a metodologia de transformação por bio-balística foi implantada com grande sucesso, consistindo da metodologia padrão de geração de mutantes aleatórios ou sítio-dirigidos há cerca de duas décadas. A técnica é de fácil execução e alto índice de sucesso [18]. A técnica de biobalística é o bombardeamento do vetor com alta pressão no genoma fúngico. Primeiramente as regiões que flanqueiam o

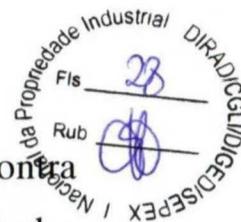
genoma fúngico que se deseja deletar são amplificadas e colocadas em um vetor contendo um marcador de resistência (geralmente higromicina ou nourseotricina). Esse vetor é então bombardeado em células fúngicas selvagens e através de recombinação homóloga das regiões que flanqueiam o gene, esse é substituído e passa a conter a marca de seleção de resistência.

[0061] Outra ferramenta para indução de mutagênese por inserção já usada em *C. neoformans* consiste da transferência de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* para a célula fúngica. *A. tumefaciens* é uma bactéria do solo naturalmente capaz de introduzir genes em plantas hospedeiras. Essa propriedade foi manipulada em laboratório para permitir a transferência de genes bacterianos para outros organismos, incluindo fungos. Na presente invenção, uma coleção de mutantes com genes do *C. neoformans* aleatoriamente interrompidos pela inserção de genes de *A. tumefaciens* foi produzida. A análise do potencial virulento desses mutantes revelou vários genes necessários para a interação com o hospedeiro.

[0062] Nesse sentido, cabe destacar grandes avanços obtidos nesta invenção em relação ao estado da arte. A técnica de mutagênese se apresentou como importante ferramenta para a identificação de alvos para a ação de fármacos. E, não há relatos da geração de coleções de cepas mutantes similares na espécie de *C. gattii*, úteis para processo de triagem de compostos com atividade antifúngica.

[0063] As cepas mutantes podem fazer parte de uma coleção ou biblioteca de cepas mutantes que podem ser utilizadas de acordo com vários métodos descritos na presente invenção. O conceito de coleção é também extensível para a coleção de dados, processamento e interpretação dos dados obtidos a partir das diferentes cepas mutantes, trabalhados coordenadamente como um conjunto, coleção ou biblioteca.

[0064] Em um outro aspecto da presente invenção, as cepas mutantes de *Cryptococcus*, as quais foram construídas de acordo com os métodos aqui



descritos, são usadas para a detecção de agentes antifúngicos efetivos contra *C. neoformans* e *C. gattii*. As cepas mutantes de *Cryptococcus* são cultivadas sob condições de crescimento diferenciadas na presença ou na ausência do composto. As taxas de crescimento são então comparadas a fim de indicar o quanto o composto é ativo contra o produto dos genes essenciais mutados; ou o quanto o composto é ativo contra a cepa mutante que não produz ou produz parcialmente o produto do gene essencial mutado. Alternativamente, o gene mutado pode ser substancialmente mais expresso para prover à cepa de *Cryptococcus* uma resistência aumentada aos compostos ativos contra o produto codificado pelo gene essencial mutado.

[0065] Um mutante de *Cryptococcus* nocaute para o gene alvo pode ser construído por diversas técnicas, nas quais ocorre um evento de interrupção ou interferência nas atividades normais do dito gene alvo. Um técnico no assunto pode facilmente identificar a melhor técnica a ser utilizada para a obtenção dos mutantes nocautes de *Cryptococcus*.

[0066] Um exemplo de técnica para obtenção de mutantes knock-out de *Cryptococcus* pode ser realizada por um evento de interrupção do gene alvo a partir da transformação da cepa de *Cryptococcus* por técnica de PCR direcionada para o gene a ser interrompido e seleção de transformantes resistentes a determinada droga que tenham precisamente modificado o gene alvo original por um marcador de resistência. Tais mutantes podem ser selecionados pelo crescimento na presença da droga ou pela ausência de um determinado nutriente. O gene interrompido não está funcional e sua expressão tem índices nulos.

[0067] Em outro aspecto da presente invenção, as cepas de *Cryptococcus* mutantes construídas de acordo com os métodos aqui descritos podem ser úteis para a triagem de agentes terapêuticos efetivos para o tratamento de infecções fúngicas em humanos e também em diversos outros animais, tais como aves, gatos, cachorros.

[0068] Sondas para as sequências identificadas nesta invenção podem ser sintetizadas baseado nas sequências de DNA descritas aqui em SEQ ID NO: 1-2. Como descrito aqui, o gene alvo ou gene essencial se referem a (i) um gene contendo, ao menos uma das sequências de DNA ou fragmentos destas sequências, que estão descritas nas SEQ ID NO: 1-2; (ii) uma sequência de DNA, ou fragmento desta sequência, que codifica a sequência de aminoácidos descritas nas sequências SEQ ID NO: 3-4; assim como os produtos do gene alvo codificados por sequências genômicas SEQ ID NO: 1-2 expressas por *Cryptococcus*; (iii) qualquer sequência de DNA que hibridize com a sequência de nucleotídeos descritas nas sequências SEQ ID NO: 1-2 sob condições de estringência que permitam a hibridização, facilmente determinadas por um técnico no assunto.

[0069] Preferencialmente, os polinucleotídeos que hibridizam para as sequências de DNA descritas nesta invenção codificam produtos que podem ser funcionalmente equivalentes aos produtos codificados pelo gene alvo. Os produtos polipeptídicos aqui mencionados correspondem, parcial ou integralmente, às sequências SEQ ID 3-4.

[0070] Como descrito acima, as sequências de gene alvo incluem não somente sequências de nucleotídeos degenerados que codificam as sequências de aminoácidos das sequências SEQ ID NO: 3-4, mas também os produtos do gene alvo codificados pelas sequências genômicas SEQ ID NO: 1-2, como expressos em *Cryptococcus*, e ainda sequências de nucleotídeos degenerados que, quando traduzidas em outros organismos diferentes de *Cryptococcus*, podem construir um polipeptídeo contendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-4, como ocorre em *Cryptococcus* ou fragmentos destas sequências.

[0071] Os produtos do gene alvo usados e incorporados nos métodos e composições da presente patente incluem todos os produtos (por exemplo, RNA, proteínas) que são codificados pelos genes alvo essenciais descritos

acima. Quando expresso em um organismo o qual não utiliza o código genético universal, os produtos proteicos dos genes alvo contendo as seqüências de aminoácidos de NOP16 e da escramblase, assim como os produtos dos genes alvo codificados por CNBG_3695 e CNBG_3981, tal como expressados em *Cryptococcus*, podem ser codificados por seqüências nucleotídicas adaptadas para o sistema de código de códons utilizado pelo microrganismo. Um técnico no assunto pode facilmente adaptar as modificações necessárias para otimizar as diferenças de uso de códons para diferentes microrganismos, tais como, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigattus*, *Candida glabrata* e *Coccidioides posadasii*, e outros sistemas de expressão, tais como *Pichia pastoris*, *Escherichia coli* e tabaco.

[0072] Um técnico versado na técnica pode, facilmente, selecionar os códons apropriados ou modificar as seqüências SEQ ID NO: 1-2 para que sejam apropriadamente traduzidas em outros microrganismos. Ainda deve-se ressaltar que genes alvos podem ter genes naturalmente semelhantes em outros fungos, que compartilham extensa homologia de seqüência de nucleotídeos com os genes de *Cryptococcus*, ou seja, genes ortólogos em outros microrganismos. É esperado que métodos para triagem de drogas que podem ser aplicados para *Cryptococcus* possam ser aplicados a genes ortólogos em fungos *Candida albicans*, *Aspergillus fumigattus*, *Candida glabrata* e *Coccidioides posadasii*.

[0073] Em outro aspecto, a invenção também incorpora (a) polinucleotídeos que codificam porções do gene alvo que correspondam a domínios funcionalmente equivalentes e os produtos de polipeptídeos codificados por tais seqüências nucleicas, incluindo domínios, mas não limitados a, seqüências de sinais (signal sequences), domínios extracelulares, domínios transmembrana, domínios citoplasmáticos, domínios de ligação, domínios com atividade enzimática ou catalizadora; (b) polinucleotídeos que codificam mutantes de um produto do gene alvo, no qual o todo ou parte de

seu domínio é deletado ou alterado sem contudo, perder sua funcionalidade ou atividade; (c) polinucleotídeos que codificam proteínas fusionadas contendo um produto do gene alvo ou qualquer de seus domínios funcionais fusionados a outro polipeptídeo.

[0074] Fragmentos dos genes alvo da invenção podem ser de, ao menos, 10 nucleotídeos de comprimento. Em um aspecto alternativo, os fragmentos podem ser de cerca de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 ou mais nucleotídeos em comprimento. Alternativamente, os fragmentos podem compreender sequências de nucleotídeos que codificam, ao menos, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ou mais aminoácidos contíguos oriundos dos produtos dos genes alvo.

[0075] Em outro aspecto, os métodos e composições da invenção podem usar e incorporar proteínas e polipeptídeos que representam produtos do gene alvo funcionalmente equivalentes. Tais produtos do gene alvo funcionalmente equivalentes incluem, mas não são limitados a, variantes naturais de polipeptídeos compreendendo ou consistindo essencialmente de sequências de aminoácidos das sequências descritas em SEQ ID NO: 3-4, assim como os produtos codificados pelas sequências de nucleotídeos SEQ ID NO: 1-2, tal como expresso em *Cryptococcus*.

[0076] O termo “funcionalmente equivalente” se refere à polipeptídeos capazes de exibir uma atividade substancialmente similar *in vitro* ou *in vivo* do produto do gene alvo em *Cryptococcus*, codificado por uma ou mais sequências de genes alvo descritas na presente invenção. Alternativamente, quando utilizado na descrição de ensaios abaixo, o termo “funcionalmente equivalente” pode se referir a peptídeos ou polipeptídeos que são capazes de interagir com outras moléculas celulares ou extracelulares de maneira substancialmente similar à forma na qual a porção correspondente do produto do gene alvo poderia interagir com outras moléculas.

[0077] Tais produtos do gene alvo funcionalmente equivalentes podem conter, por exemplo, deleções, adições ou substituições de resíduos de aminoácidos na sequência proteica codificada pelas sequências de gene alvo descritas acima, mas resultar em uma mutação silenciosa, assim produzindo um produto do gene alvo funcionalmente equivalente. Substituições de aminoácidos podem ser feitas, baseando-se em similaridades de polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliçidade e/ou natureza anfipática dos resíduos de aminoácidos substituíveis. Assim, um técnico no assunto pode facilmente adaptar substituições de modo que os produtos proteicos dos genes alvo permaneçam apresentando a atividade esperada.

[0078] Peptídeos e polipeptídeos correspondentes a um ou mais domínios de produtos dos genes alvo (por exemplo, domínios de atividade enzimática, catalisadora ou de ligação), produtos oriundos dos genes alvo deletados ou truncados (por exemplo, polipeptídeos no qual um ou mais domínios de um produto do gene alvo são deletados) e proteínas correspondentes ao gene alvo fusionadas (por exemplo, proteínas ou produtos provenientes dos genes alvo, de tamanho completo, truncadas ou deletadas, ou um peptídeo ou polipeptídeo correspondente a um ou mais domínios de um gene alvo é fusionado a um proteína não relacionada) também estão no escopo da presente invenção. Tais peptídeos ou polipeptídeos (também nomeados como polipeptídeos ou proteínas quiméricas) podem ser facilmente desenhadas por qualquer técnico no assunto com base nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos genes alvo das SEQ ID NO 1-2 e SEQ ID NO 3-4; ou baseados nas sequências de CNBG_3695 e CNBG_3981, tal como expressas em *Cryptococcus*; ou ainda baseados nos genes da proteína NOP16 e na escramblase, tal como expressas em *Cryptococcus*.

[0079] Exemplos de proteínas, polipeptídeos ou peptídeos fusionados podem incluir, mas não são limitadas a, estratégias utilizando “epitope tag-fusion proteins” que pode facilitar o isolamento do produto do gene alvo pelo

uso de cromatografia de afinidade. Outro exemplo inclui fusões a sequências de aminoácidos que permitem o ancoramento da proteína fusionada a membrana celular, permitindo que os produtos dos genes alvo sejam exibidos na superfície celular, ou fusões a enzimas ou outras proteínas utilizadas em métodos laboratoriais de triagem ou diagnóstico, tal como proteínas fluorescentes, proteínas repórteres etc.

[0080] Os produtos provenientes dos genes alvo da presente invenção podem ser facilmente produzidos por qualquer técnico do estado da arte, seja por técnicas de síntese química ou por métodos de tecnologia de DNA recombinante que são conhecidas no estado da arte. Exemplos de técnicas de produção de peptídeos e polipeptídeos podem ser observados nas referências Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman and Co., N.Y., Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., Pla et al., e *Oligonucleotide Synthesis*, 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford que aqui são incorporados em sua totalidade.

[0081] Outros produtos que são necessários para reconhecer, identificar, isolar, se ligar, atuar cataliticamente, manipular ou interferir nos produtos dos genes alvo também estão inseridos no escopo da presente invenção, tais como anticorpos, ribozimas, sondas nucleotídicas neutralizadoras altamente específicas, tais como RNA de interferência, RNA antisense. Tais anticorpos incluem, mas não são limitados a, anticorpos policlonais ou monoclonais (mAbs), monoméricos, diméricos ou pentaméricos, anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos, anticorpos de cadeia simples ou dupla, fragmentos Fab, F(ab')₂, fragmentos produzidos por livraria de expressão de fragmentos Fab de anticorpos, anticorpos anti-idiotípicos, fragmentos de ligação a epítomos. Tais ribozimas incluem, mas não são limitados a, polinucleotídeos de RNA enzimáticos capazes de se hibridizar às sequências de RNA provenientes dos genes alvo e posterior

clivagem do RNA.

[0082] Todos os produtos inseridos nesta invenção com o propósito de reconhecer, identificar, isolar, se ligar, atuar cataliticamente, manipular ou interferir nos produtos dos genes alvo podem ser preparados por qualquer método conhecido na arte para síntese de DNA, RNA ou proteína.

[0083] A presente invenção provê o uso terapêutico ou profilático de ácidos nucleicos, de ao menos, seis nucleotídeos de extensão que são complementares (antisense) ao gene essencial ou à porção dele para o tratamento do indivíduo infectado por *Cryptococcus*. Um ácido nucleico antisense, como aqui citado, se refere a um ácido nucleico capaz de hibridizar a uma porção de RNA do gene alvo, preferencialmente RNAm, em face da complementariedade das sequências. A presente invenção ainda provê composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade efetiva de ácidos nucleicos antisense complementares às sequências SEQ ID NO 1-2 e um carreador farmacêuticamente aceitável.

[0084] Em outro aspecto, a presente invenção está direcionada a métodos para inibição ou modulação da expressão do gene alvo em *Cryptococcus*, seja *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*, compreendendo prover uma quantidade efetiva de uma composição contendo ácidos nucleicos antisense complementares às sequências SEQ ID NO 1-2. Múltiplos ácidos nucleicos antisense complementares aos genes alvo podem ser usados em combinação ou simultaneamente.

[0085] A “complementariedade” necessária significa estar habilitado a se hibridizar com RNA, formando uma fita dupla estável. A habilidade para uma sequência de nucleotídeos se hibridizar depende do grau de complementariedade e do tamanho do ácido nucleico antisense. Um técnico no assunto pode verificar o grau tolerável de divergência através de procedimentos padrões para determinar as condições de hibridização do complexo do RNA alvo e RNA antisense.

[0086] As informações descritas no presente pedido de patente constituem uma base para o desenvolvimento de plataformas de triagem de alto rendimento para novos fármacos contra espécies de *Cryptococcus* de importância médica.

[0087] Os seguintes ensaios são desenhados para identificar compostos que se liguem aos produtos do gene alvo, se liguem a outras proteínas celulares que interajam com os produtos do gene alvo e a compostos que interferem com a interação de produtos do gene alvo com outras proteínas celulares. Compostos identificados por tais métodos podem incluir compostos que modulam a atividade de um polipeptídeo codificado pelo gene alvo da invenção (ou seja, aumentar ou diminuir sua atividade, relativa a atividade observada na ausência do composto). Alternativamente, compostos identificados por tais métodos podem incluir compostos os quais modulam a expressão do polinucleotídeo (ou seja, que aumentam ou diminuem os níveis de expressão, relativamente aos níveis de expressão observados na ausência do composto), ou aumentam ou diminuem da estabilidade do produto expresso codificado pelos polinucleotídeos descritos na presente invenção. Compostos, aqui descritos, podem ser testados usando ensaios padrão bem conhecidos por sua capacidade em modular a expressão ou a atividade dos produtos do gene alvo, podendo ser facilmente realizados por qualquer técnico no assunto.

[0088] A presente invenção provê métodos para identificação de compostos com atividade antifúngica compreendendo a triagem de uma pluralidade de compostos com o propósito de se identificar um composto capaz de modular a atividade ou o nível de expressão de um produto do gene alvo, tal produto de gene sendo codificado pela sequência de nucleotídeos das SEQ ID NOs: 1-2, tal como expresso pelo *Cryptococcus*; ou baseados nas sequências de CNBG_3695 e CNBG_3981; ou ainda baseados nos genes da proteína NOP16 e na escramblase, tal como expressas em *Cryptococcus*; ou

uma sequência semelhante ou funcionalmente equivalente de nucleotídeos que ocorra naturalmente em outros fungos de importância médica ou genes ortólogos dos genes alvo.

[0089] A validação de genes alvo se refere ao processo pelo qual o produto do gene é identificado como útil em métodos de triagem ou ensaios para encontrar moduladores, inibidores de função ou ligantes de estruturas dos produtos do gene alvo. O critério utilizado para validação do produto do gene essencial como alvo para a triagem de drogas pode variar dependendo do modo de ação dos compostos antifúngicos assim como depende de características do hospedeiro infectado a ser protegido. Os genes essenciais alvo da presente invenção ainda devem atender ao critério de estarem ausentes no hospedeiro a ser tratado, não apresentando homólogos.

[0090] Especificamente, a presente invenção se refere a métodos para identificação e validação de produtos de dois genes essenciais identificados em *Cryptococcus*, CNBG_3695 e CNBG_3981. Mais especificamente, a presente invenção se refere a métodos para identificação e validação de produtos de dois genes essenciais responsáveis pela produção da proteína nucleolar 16 (NOP16) e de uma escramblase como alvos efetivos para intervenção terapêutica contra a infecção fúngica.

Métodos de triagem de novos compostos antifúngicos

[0091] Os seguintes ensaios são desenhados para identificar compostos que se ligam aos produtos dos genes alvo, se ligam a outras proteínas celulares que interagem com os produtos do gene alvo, e compostos que interferem com a interação do produto dos genes alvo com outras proteínas celulares. Compostos identificados através de tais métodos podem incluir aqueles que modulam a atividade de polipeptídeos codificados pelos genes alvo aqui apresentados, ou seja, que propiciem o aumento ou a diminuição da atividade dos produtos do gene alvo, quando comparado a atividade observada na ausência do composto.

[0092] Alternativamente, compostos identificados através de tais métodos podem incluir compostos que modulam a expressão de polinucleotídeos provenientes dos genes alvo aqui apresentados, ou seja, que propiciem o aumento ou a diminuição da atividade dos produtos do gene alvo, quando comparado à atividade observada na ausência do composto. Ou mesmo o aumento ou a diminuição da estabilidade de produtos expressos por tal polinucleotídeo. Compostos, utilizando os métodos aqui descritos, podem ser testados usando ensaios padrões bastante conhecidos por técnicos no assunto.

[0093] De acordo com a presente invenção, são apresentados métodos para identificar compostos com atividade antifúngica compreendendo a triagem de uma pluralidade de compostos a fim de se identificar um composto que module a atividade ou a produção de produtos dos genes alvo. Tal produto dos genes essenciais sendo codificado por uma sequência de nucleotídeos selecionado do grupo compreendido das sequências SEQ ID NOs: 1-2, assim como, os produtos dos genes essenciais codificados pelas sequências genômicas SEQ ID NOs: 1-2, tal como expresso em *Cryptococcus*, ou uma sequência de nucleotídeos que ocorre naturalmente em outros fungos e que são ortólogos do gene alvo. Tal produto de genes essenciais também sendo codificado por uma sequência de aminoácidos selecionado do grupo compreendido nas sequências SEQ ID NOs: 3-4, tal como expresso pelo *Cryptococcus*, ou baseados nas sequências de aminoácidos da proteína NOP16 e da escramblase, tal como expressas em *Cryptococcus*; ou uma sequência proteica semelhante ou funcionalmente equivalente de aminoácidos que ocorra naturalmente em outros fungos de importância médica.

Ensaio de triagem *in vitro*

[0094] Sistemas *in vitro* são desenhados para identificar compostos capazes de se ligar aos produtos dos genes alvo da presente

invenção. Compostos identificados dessa forma são úteis, por exemplo, em modular a atividade de produtos dos genes essenciais, tanto em sua forma nativa ou mutada; são úteis em elucidar as funções biológicas dos produtos dos genes alvo; são utilizados em triagem para identificar outros compostos que rompem as interações normais dos produtos do gene alvo; ou são úteis como próprios bloqueadores de tais interações.

[0095] O princípio de tais métodos usados para identificar compostos que se ligam aos produtos do gene essencial envolve o preparo de uma mistura de reação compreendendo o produto do gene alvo e o composto a ser testado sob condições laboratorialmente controladas e por tempo suficiente para permitir que os dois componentes da reação interajam e se liguem, formando assim um complexo o qual é removido e/ou detectado na mistura de reação. Estes ensaios podem ser conduzidos por uma grande variedade de diferentes métodos, tais como ELISA, técnicas de microtitulação, técnicas de atividade enzimática, análise de alterações estruturais decorrentes de ligação à droga por ressonância magnética nuclear e possíveis variações das técnicas, compreendendo: a ligação dos produtos dos genes alvo ou dos compostos à fase sólida de reação ou variações que contemplem a precipitação do complexo produto do gene/composto; variações de detecção dos complexos produto do gene/composto seja por atividade enzimática, radioativa, fluorescente ou associações das técnicas; variações de detecção dos complexos por via direta ou indireta, por meio de anticorpos, fragmentos de anticorpos ou proteínas Ig-like, lectinas, peptídeos, sondas de nucleotídeos etc; variações dos produtos dos genes alvo a partir de sua ligação a moléculas ou macromoléculas (caracterizando um produto fusionado) úteis para o procedimento técnico, ou fragmentos dos produtos dos genes alvo compreendendo o domínio de atividade.

[0096] Os produtos do gene alvo da presente invenção interagem, *in vivo*, com uma ou mais moléculas celulares ou extracelulares, tal como

proteínas. Tais moléculas ou macromoléculas incluem, mas não estão limitadas a, moléculas de ácido nucleicos e proteínas identificadas por métodos tais como os descritos acima. Para os propósitos desta patente, tais macromoléculas celulares ou extracelulares são denominadas aqui por “ligantes”. Compostos que rompem tais interações podem ser úteis na regulação da atividade dos produtos do gene alvo. Tais compostos incluem, mas não estão limitados a, moléculas tais como anticorpos, peptídeos, compostos químicos ou proteínas do interatoma do fungo.

[0097] Um princípio básico adicional do ensaio é identificar compostos que interferem com a interação do produto do gene alvo e seu ligante (s) celular (es) ou extracelular (es) compreendendo preparar uma mistura de reação contendo o produto do gene alvo e seu ligante sob condições e tempo necessários para permitir que interajam e se liguem, formando assim um complexo. Com o propósito de se identificar um composto com atividade inibitória sobre o produto do gene alvo, a mistura de reação deve ser preparada na presença ou ausência do composto a ser testado. Testes de triagem contendo o microrganismo

[0098] Técnicas baseadas no comportamento do microrganismo para identificar ou caracterizar compostos com atividade inibitória dependem da capacidade do composto teste em modular a atividade do produto do gene alvo localizado no interior ou na superfície do microrganismo. As moléculas alvo podem ser proteínas, enzimas, receptores, ou mesmo moléculas de DNA, lipídios, carboidratos e RNA (RNA mensageiro, ribossomal, transportador), e macromoléculas associadas. Diversas técnicas baseadas no comportamento do microrganismo à presença do composto teste são bastante conhecidas no estado da arte, sendo facilmente desenvolvidas por um técnico no assunto.

[0099] A presente invenção apresenta técnicas com substanciais vantagens ao utilizar cepas mutantes nos quais o nível ou atividade de um determinado gene ou produto deste gene, essencial para a sobrevivência,

crescimento, proliferação, virulência ou patogenicidade do fungo, tenha sido especificamente reduzido a ponto de a ausência desta função celular se tornar limitante, em algum grau ou nível, para o *Cryptococcus*. Estas técnicas ainda permitem usar as cepas mutantes para revelar novos alvos celulares e vias metabólicas que não estariam acessíveis diretamente a métodos de triagem de novas drogas, ao expor vias metabólicas alternativas ou suplementares do microrganismo.

[00100] Em um aspecto da presente invenção, as cepas mutantes de *Cryptococcus*, nas quais não é possível a expressão dos genes essenciais ou produtos destes genes, ou sua produção é reduzida nos termos acima descritos, podem ser submetidas a ensaios laboratoriais de inibição de crescimento ou de produção de algum subproduto celular ou extracelular em resposta a presença ou ausência de compostos teste. Os subprodutos, identificados com base nos resultados descritos nas Figuras 4 e 5, poderiam incluir, mas não limitados a, pigmentos e polissacarídeos extracelulares. Outros fatores de virulência ou patogenicidade também podem ser medidos como forma de se verificar os efeitos da atividade do composto teste e, conseqüentemente, da viabilidade do *Cryptococcus*, tais como, a produção de enzimas como fosfolipase, urease, lacase e de vesículas secretórias.

[00101] As cepas mutantes são cultivadas em diferentes condições e sob diferentes concentrações do composto teste. O crescimento do microrganismo ou a produção de determinado subproduto celular ou extracelular, em diferentes níveis ou graus quando comparados à cepa não mutada, ou sua ausência são indicativos da ação inibitória, microbicida ou microstática do composto teste; indicando assim o potencial como agente terapêutico antifúngico.

[00102] Os compostos podem ser testados por diversas técnicas, tais como microtitulação em meio sólido ou líquido, por técnicas automatizadas ou semi-automatizadas, com diferentes estratégias de detecção

do crescimento ou da produção do subproduto celular ou extracelular. As técnicas e suas variações e condições necessárias, tais como concentração do composto a ser testado, concentração de células do fungo, mistura e etapas de reação, condições e meio de crescimento, podem ser facilmente desenhadas ou adaptadas para a obtenção dos melhores resultados por um técnico no assunto.

[00103] Outro aspecto da presente invenção é um método para determinação de vias metabólicas essenciais, suplementares ou alternativas para as quais existam compostos com atividade inibitória, vias estas onde a atividade de proteínas ou ácidos nucleicos são essenciais para o crescimento, sobrevivência, proliferação, virulência ou patogenicidade do fungo e são potencialmente afetadas, reduzidas ou aumentadas em contato com o composto teste. Este método é similar aos anteriormente descritos na presente invenção e podem ser facilmente desenhados, adaptados e otimizados por um técnico no assunto.

[00104] A inibição de crescimento de *Cryptococcus*, resultante da presença de concentração subletal de compostos com atividade antifúngica, pode ser de 5% a 100% de inibição do crescimento. Alternativamente, concentrações subletais de compostos com atividade antifúngica podem também ser determinadas pela medição da produção ou da atividade do produto dos genes essenciais ou de outros subprodutos celulares ou extracelulares do metabolismo do fungo. Células do fungo são contactadas com o composto a ser pesquisado, em concentrações sub-letais e letais a fim de se identificar compostos com atividade sobre o fungo.

Testes de triagem por modelagem computadorizada

[00105] A modelagem computadorizada e tecnologias de busca, por meio de bases de dados, permitem a identificação de compostos ou o aperfeiçoamento de compostos já conhecidos, que podem modular a expressão ou a atividade dos genes essenciais alvo. E, para tal, é necessária a

identificação de domínios ou sítios ativos dos produtos dos genes alvo. O sítio ativo é identificado a partir do uso de métodos conhecidos no estado da arte, como por exemplo, a partir de sequências de aminoácidos, de sequências de nucleotídeos ou a partir do estudo de complexos de compostos com seus respectivos ligantes naturais. Neste último exemplo, métodos de cristalografia de raios X podem ser usados para identificar sítios ativos a partir do complexo de ligação composto/ligante, a partir da determinação da estrutura geométrica tridimensional do sítio ativo. Técnicas de ressonância magnética nuclear também podem ser utilizadas para determinar distâncias intramoleculares dentro do sítio ativo, no complexo de ligação do composto e seu ligante. Outros métodos experimentais para determinação da estrutura, conhecidos no estado da arte, podem ser utilizados para se obter a estrutura geométrica tridimensional parcial ou completa do sítio ativo e do complexo como um todo, o que aumenta a acurácia dos resultados de seleção de novos ligantes. Métodos de modelagem computadorizados podem ser utilizados para completar a estrutura onde os dados se apresentaram incipientes. A partir da determinação da estrutura do sítio ativo, seja experimentalmente ou por modelagem computacional, ou por ambos, compostos podem ser estudados quanto a potencialidade de atividade ao se buscar em databases ou bibliotecas de compostos a partir da informação da estrutura molecular.

[00106] A busca por compostos, que tenham estruturas que combinem com o sítio ativo dos produtos dos genes alvo, pode potencialmente identificar substâncias que se liguem, modulem, aumentem ou diminuam a atividade ou a expressão dos produtos dos genes alvo. E, neste sentido, os produtos dos genes da presente invenção podem ser utilizados para triagem de novos compostos antifúngicos, a partir do uso de métodos e técnicas de cristalografia de raios X dos produtos de genes essenciais alvo, ou de domínios ou sítios ativos destes polipeptídeos associado ao uso de ressonância magnética nuclear e uso de programas computacionais que analisam a

interação molecular dos compostos com potencial antifúngico.

[00107] Compostos e compostos análogos, identificados a partir da estratégia acima descrita, ainda podem ser sistematicamente modificados por programas de modelagem computacional de forma a alcançarem maior potencial de ação sobre produtos de genes essenciais alvo ou de domínios ou sítios ativos destes polipeptídeos.

[00108] Todas estas técnicas e métodos acima descritos estão no estado da arte. Qualquer técnico no assunto poderá identificar quais as melhores condições e variações na técnica para que se possa alcançar os resultados esperados para a triagem de novos compostos com potencial antifúngico a partir dos genes essenciais descritos na presente invenção.

[00109] Alguns ou todos estes aspectos da presente invenção podem ser utilizados para confecção de um kit para comercialização de produtos de pesquisa. O referido kit pode conter polinucleotídeos e/ou polipeptídeos correspondentes aos genes essenciais de *Cryptococcus* da presente invenção, além de outros reagentes necessários, conhecidos do estado da técnica. O kit também pode conter as cepas mutantes para os genes essenciais de forma a permitir que o usuário possa utilizar o microrganismo em todas as técnicas aqui descritas.

Exemplo 1: Microrganismos

[00110] Os microrganismos utilizados nesse trabalho foram *C. neoformans* e *C. gattii*. Foram utilizadas a cepa de *C. neoformans* sorotipo A (H99) e a cepa selvagem de *C. gattii* sorotipo B (R265). As cepas foram conservadas a -80° C em meio Sabouraud com 20% de glicerol e mantidos em ágar Sabouraud a 4° C. Os mutantes testados foram obtidos a partir da cepa selvagem de *C. gattii* (R265) e estocados a -20° C em placas de 96 poços contendo 200 µl de meio YPD suplementado com 20% de glicerol.

Exemplo 2: Análise da atividade antifúngica do mebendazol.

[00111] Valores da concentração mínima inibitória (MICs) foram

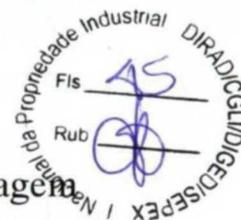
determinados usando métodos recomendados pelo "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) com pequenas modificações. O mebendazol foi diluído seriadamente nas concentrações de 20 a 0.03 μM em meio RPMI 1640 (duas vezes concentrado, pH 7; 2% de glicose) tamponado com 0.165 g/mol de ácido morpholinepropanesulfônico (MOPS) em placa de 96 poços. Os inóculos de *C. neoformans* e *C. gattii* foram preparados seguindo protocolo europeu de análise de antimicrobianos (EUCAST), amplamente aceito internacionalmente. As suspensões de células fúngicas foram ajustadas para densidade final de $2,5 \times 10^5$ / poço e posteriormente as placas foram incubadas a 37°C com agitação por 48 h. Os valores de MIC corresponderam a menor concentração do mebendazol capaz de inibir crescimento fúngico.

[00112] O efeito antifúngico dos benzimidazóis foi previamente descrito, porém os mecanismos de ação pelo qual essas drogas inibem o crescimento de *Cryptococcus* spp. ainda não são conhecidos. O efeito do mebendazol contra o *C. gattii* também nunca foi caracterizado. *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram perfis similares de susceptibilidade ao mebendazol (Figura 1), apresentando ação antifúngica de cerca de 40% de inibição crescimento na concentração de 0.3125 μM e 100% de inibição de crescimento a partir da concentração de 1.25 μM .

Exemplo 3: Obtenção de biblioteca de mutantes de *C. gattii*

[00113] Uma coleção de transformantes de *C. gattii*, com cerca de 8.000 linhagens, obtidas por inserção aleatória da marca de seleção foi obtida por agrotransformação. Esta metodologia foi realizada em dois passos distintos: (1) transformação de *Agrobacterium tumefaciens* e (2) agrotransformação de *C. gattii*.

[00114] A primeira etapa se deu pela transformação do plasmídeo binário pPZP-HYG, o qual contém um cassete para expressão da marca de resistência à higromicina sob controle do promotor do gene ACT1 e do



terminador do gene TRP1 [19], ambos de *C. neoformans*, na linhagem EHA105 de *A. tumefaciens*. Células desta bactéria foram inoculadas em meio 10 mL de meio LB e cultivadas a 30°C com rotação constante por 16 h. Uma alíquota foi removida e inoculada novamente em 50 mL de meio LB a 30°C com rotação constante, sendo a densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) acompanhada até a obtenção de um valor entre 0,4 e 0,5. As culturas foram então resfriadas por 15 minutos em gelo, sendo então centrifugadas por 15 minutos, a velocidade de 5.000 g. O sobrenadante foi descartado e o centrifugado foi suspenso em 1 mL de uma solução contendo 20 mM de $CaCl_2$ e 10% glicerol. Cerca de 1 μ g do plasmídeo pPZP-HYG foi então adicionado a uma alíquota de 0,2 mL desta suspensão. Esta mistura foi incubada no gelo por 30 minutos e em seguida a 37° C por 5 minutos. Foi então adicionado 1 mL de LB líquido e incubado por 2 horas a temperatura de 30° C com rotação constante. Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em meio LB-ágar acrescido de canamicina na concentração de 50 μ g/mL e cultivados a temperatura de 30°C.

[00115] Para agrotransformação de *C. gattii*, um clone representativo da linhagem de *A. tumefaciens* contendo o vetor binário pPZP-HYG foi cultivada em 10 mL de meio LB líquido acrescido de canamicina na concentração de 50 μ g/mL a 30°C com rotação constante por 16 h. Paralelamente, a linhagem R265 de *C. gattii* foi cultivada, por 24 h, em 10 ml de YPD, a 30°C com rotação constante. Cada cultura foi centrifugada por 2 min a 4,000 x g e as células foram lavadas duas vezes com tampão fostato-salino (PBS). As células de *A. tumefaciens* foram então incubadas em meio de indução [0,2 mM acetoseringona; 10 mM glucose; 0,5% glicerol; 0,5 mg/mL $(NH_4)_2SO_4$; 40 mM ácido 2-N-morfolino-etanosulfônico; 1,45 mg/mL KH_2PO_4 ; 2,05 mg/mL K_2HPO_4 ; 1,5 mg/mL NaCl; 0,5 mg/mL $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,066 mg/mL $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,0062 mg/mL $FeSO_4 \cdot 7H_2O$] por 8 h. Uma alíquota de 0,1 mL da cultura de *A. tumefaciens* contendo o vetor binário

pPZP-HYG foi misturada a 0,1 mL da cultura de *C. gattii*. O volume final de 0,2 mL foi adicionado no centro de uma placa de Petri contendo meio de indução acrescido de 2 % de ágar, sendo incubado por 48 h a temperatura de 30°C. Após este período, as células foram raspadas da placa com o auxílio de 1 mL de meio YPD e alíquotas de 0,05 mL foram semeadas em meio YPD-ágar contendo 0,2 mg/mL de higromicina e 0,2 mg/mL de cefotaxima. As colônias resistentes foram então cultivadas em meio YPD líquido acrescido de 0,2 mg/mL de higromicina para obtenção dos estoques.

Exemplo 4: Análise da atividade antifúngica do mebendazol na biblioteca de mutantes de *C. gattii*. Triagem de mutantes.

[00116] A fim de se compreender o mecanismo de ação do mebendazol em *Cryptococcus* sp., foi realizada triagem na coleção de mutantes de *C. gattii*, composta por cerca de 8.000 mutantes gerados aleatoriamente, descrita no item anterior.

[00117] As células mutantes foram cultivadas por 72 h (30°C) em 200 µl de meio YPD distribuídos em placas de 96 poços. Em seguida, as células mutantes foram testadas quanto à susceptibilidade ou resistência ao mebendazol, em placas de 96 poços, em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço, em meio RPMI 1640, suplementado com 0.165 g/mol de ácido morpholinepropanesulfônico (MOPS), glicose a 2%, Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% e mebendazol na concentração final de 10 µM por 48h a 30°C. A leitura do crescimento foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 540nm. Os mutantes que cresceram com valores de absorbância (A_{540}) maiores que 0.3 foram selecionadas como resistentes.

[00118] A maioria dos mutantes apresentou sensibilidade ao mebendazol (Figura 2). Entretanto, algumas cepas mutantes foram parcialmente resistentes e duas cepas mutantes (cepas P38-A1 e P46-G7) apresentaram perfil de grande resistência ao mebendazol (Figura 2, setas vermelhas).

Exemplo 5: PCR inverso

[00119] Baseado nos fenótipos de resistência, duas linhagens dos mutantes de *C. gattii*, que apresentaram perfil de grande resistência ao mebendazol, foram selecionadas para identificação dos alvos pela reação em cadeia da polimerase (PCR). As cepas P38-A1 e P46-G7 foram cultivadas, por 12 h, em 10 ml de YPD, a 30°C com rotação constante. Cada cultura (2 ml) foi centrifugada por 2 min a 4,000 x g e as células foram lavadas duas vezes com tampão fostato-salino (PBS).

[00120] Posteriormente foi realizada a extração de DNA. As células foram suspensas em 400 µl de tampão de lise (Tris-HCl a 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA a 1 mM, NaCl a 200 mM, Triton X100 a 2%, dodecil sulfato de sódio - SDS a 0.5%, pH 7.5), seguindo-se a adição de 1 volume de fenol-clorofórmio (pH 8) e 100 µl de pérolas de vidro (diâmetro de 2 µm). A lise mecânica foi realizada através de ciclos alternados de 1 min de agitação em vortex e 1 min de banho de gelo. Os lisados foram centrifugados a 4.000 x g por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e o DNA foi precipitado em etanol por 12 h a -20°C. O material foi posteriormente tratado com RNase na concentração de 1 mg/ml por 15 minutos, a temperatura de 37°C.

[00121] A identificação dos genes interrompidos foi realizada utilizando a técnica de PCR inverso [21]. O DNA extraído foi quantificado usando o kit comercial Reagent Qubit (Invitrogen, CA, USA) e 1 µg de cada amostra foi digerida separadamente com as enzimas de restrição BgIII, Sall ou StuI (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). Uma alíquota de 200 ng da digestão foi então incubada com 1 U da enzima T4 DNA ligase (New England, Massachusetts, USA) e incubada por 16 h a temperatura de 4°C. Uma alíquota referente a 20 ng foi então utilizada para PCR utilizando iniciadores para PCR inverso AgRBIN (5'-AACAGTTGCGCAGCCTGAATG-3'), que anela na porção final da borda

direita do T-DNA, e AgLBIN (5'- AGAGGCGGTTTGCGTATTGG -3'), que se anela na porção final da borda esquerda do T-DNA. O conjunto de tampões e de Taq DNA Polimerase foram obtidos do sistema comercial Taq DNA Polimerase Recombinant (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). O programa de PCR consistia em um período inicial de 5 minutos de desnaturação a 94°C, seguidos de 30 ciclos de um período de 15 segundos de desnaturação a 94°C, 15 segundos de anelamento a 60°C e 5 minutos de extensão a 72°C.

[00122] Os produtos de amplificação foram purificados com o kit comercial "QIAquick Gel Extraction" (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para o sequenciamento de DNA, 50 ng de cada amostra e 5 pmol de cada iniciador (AgRBIN ou AgLBIN) foram utilizados. As sequências foram obtidas no ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) e a qualidade das sequências, assim como seu agrupamento, foram determinadas através da análise de eletroferograma na plataforma disponível no endereço <http://www.biomol.unb.br/phph/>.

Exemplo 6: Identificação dos genes essenciais em *Cryptococcus*

[00123] A identificação dos genes interrompidos por T-DNA foi realizada por análises comparativas. Cada fragmento de DNA sequenciado, marcado com uma sequência de T-DNA foi comparado com a sequência genômica da linhagem R265 de *C. gattii*, disponível no banco de dados de *Cryptococcus* do Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org>).

[00124] O mutante P38-A1 de maior resistência teve interrupções em sequência codificadora para uma proteína hipotética (CNBG_3981) com similaridade às enzimas da classe das escramblases, proteínas responsáveis pela translocação de fosfolípidos entre duas monocamadas de membranas celulares.

[00125] O segundo mutante com maior resistência ao mebendazol, P46-G7, apresentou interrupção na sequência codificadora para a proteína

nucleolar 16 (CNBG_3695), responsável pela síntese de ribossomos em eucariotos.

[00126] As sequências obtidas foram:

1 – Sequência do mutante P38-A1 de *C. gattii*, obtidas com os iniciadores AgRBIN e AgLBIN, referente ao gene CNBG_3981, relativo a proteína escramblase putativa.

SEQ ID NO. 1:

5'GCGAATGAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
 GTTTAAACTATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACGGA
 AATGCTGGAAATGCTGGAAATGCTGGCTGACACGGGGCGGAAGAAT
 ATACTAATGACGACACCTCCCCGGCACGGCCTTGGCCGATTTTCAA
 GTGGAGGTTTATGTAATGTGAATTCGATCAACAATTAACCACTCTC
 TTCACTACGCAGAAACGAAAAGGATTTGCAGCTCAAGATTATCA
 AATATGACAAGTGTAGGGTGCATATGCATGATGATCCCAATCACG
 ACCTAGCTCTCCTTCTTCTAGCCTCTTCTATTCTCCTCTGCTTTTCAG
 CTTCCCGCCCCGCCCTCGGGCTTCTTACAGTCTGTGCCGCCGCCGC
 CTCCTTGTTGACCTCGACGCCAGGTTCCCTGAATCCTCTCGACAAAC
 TCTCCTTGCTGCTTCCTCTTTATGCTCGCCGTGCGCTTGGCATTTTG
 CTCAGCATGTACCCTTTTCGCAGATTCTTCAGAAGCCTGCTTGACG
 GATTTTTGAAAGTACTCTTTTGCAGCGTTAAACGTGTCCATGTAGG
 AAGGACTCTTGAAGGGCTCTGCTCCCGGTTCAAGCGCCTGCGCTTT
 GGTGATGGGTAAACCGAGATATCGCTTGACGATAGGCTGACGAAG
 GATGATGGATTTAGAGCAATTCGGCGTTAATTCAGTACATTAATAAAA
 CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACA
 CCACAATATATCCTGCCAGCATTTCCTTGCTTTGTCACATCTTTCTC
 CTCCCGAAAACACTTCCCAAACCCCCTTGGCAATCTCTCTAACAAC
 CGTCCGTCTTACAATGCTGCCTAGAAGCATTACCGCTTCGGCGTTG
 CGTGTGGGCAGCATGTCCCATCCCATGCTTGCTCGAGGTATAGCTA
 CTGCCGTCCCCCTTTTACGGCAGCAAGAACGG 3'

2 – Sequência do mutante P46-G7 de *C. gattii*, obtida com os iniciadores AgRBIN e AgLBIN, referente ao gene CNBG_3695, relativo a proteína nucleolar 16 putativa.

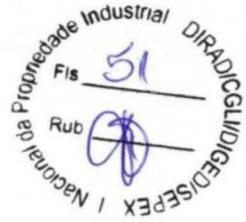
SEQ ID NO. 2:

5'GCGAATGAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
 GTTTAAACTATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACATC
 ACTGAATTTTCTATATGAGTACGAACAGCAAAACGATAACTTTTTG
 TTTTTGTTTTTCGAACAGTAAAAGCTCACATAAGTATACACTATTCA
 CCATGGCCAACCCGCGACAGAGAAACAAGGCAAAGTCCTCCAGGT
 CTCACAAACCCAGCCTGAACGCAAAGAGAAGAATGCACCAGAAG
 CTCAGGAAGGCACCTCCTCTCAAGGGTCCCGAGGTGTTGCAAGAA
 AAGTGGGACAAGAAGAAGACCGTCTTCCAAAAGTAAGTCTTTTCT
 ATTCCCGTAGAGCAATTCGGCGTTAATTCAGTACATTA AAAACGTC
 CGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCAC
 AATATATCCTGCCATGGAAAAAGCTTTTTCTGTTTAATTACGTAAC
 GAGTATTGGGACGTCAAACAGCTCGTGTCTCAAATCCAATCCCAT
 TCATTCCCTCGCTTTCCTCAATCTCATCCATCTCAGCATCCATATAT
 ACTATACCCTTGCTCAAATCCTTTACGCCTCAATAAATTAGACTTG
 AACACAGACAAGATGGGTGGTGAAGGTCAGTCCCAATTGGCAAAG
 ACTACTGGAAGCGGAAAACGCGGAGAGCTGACTTATCATCGCCCC
 TGGTTTCGCTCTGGCTGATGTCCTCGTGACCGATCCTCTTAACACTC
 GCTTCCTGATCCTCAACAAACAGGCTGGATTTTTCTCTTTGCGGTC
 CTTATGGCCGCTGTGCTCTTGTTACCATGGTGTCTTTGTGAGTGT
 TTCACTTTTGGCTCGTGACATCATTGTAATTCCGCTAACATCAATCT
 TGCGTCCCTCATGTGCAGATCATCATGTTCTCTGACCTTGAGTGCG
 GTAAGTCGATGAATCAGGA3'

3 - Sequência de aminoácidos predita para a escramblase de *C. gattii*

SEQ ID NO 3:

1 mlprsitasa lrvgsms hpm largiatavp llrqqlpr ghvrptrrpi rhtlpldtde



61 rpgpsyqstt tatdgpqafh ayepydphvi ppvhhsgrvd ippdpsgvlg dshaareilg
 121 heslvivrql emlnvfmge qanryaihsp dgqlvgflae qeqgilstis rqlrthrf
 181 rsvvmdrygk pvlwirrpfa finsrifvhs sedpdsrlvg eaqqqwhpwr rrynlqsre
 241 sdtfrqfakv dsqflawdfw lkgkddrlla sinrnfrgig relftdtggy virfdaagte
 301 ldlapgsnin vqqqtlvlpr ssdsgltldq ramtlatavs idfdyfsrhs gsgglgfpff
 361 fwgggdgsae aqaggrpsdv qpldggagaa aagaaagaas ggadmte del iyggqpaqpg
 421 nptnngpvpp paqeedtggw eqfpeglegy deesgweqde vmqdpwgnqg gdggwfgggs
 481 gggggggdwg dwgq

4 - Sequência de aminoácidos predita para a proteína NOP16 de *C. gattii*

SEQ ID NO 4:

1 manprqrnka kssrshkpsl nakrrmhqkl rkapplkgpe vlqekwdkkk tvfqnyaalg
 61 llpsipvpkg astsrsvrvk lpevpaevea envkvgfgri irdeegnvid iidededeq
 121 eeqikvheek eiglieakte vvrleelaa saapvkrhss msertwlqql vdkygddtek
 181 mardrklnvw qktegeikrm ikkaggvqll rk

[00127] A partir desta comparação, foi possível identificar o gene interrompido da cepa mutante de *C. gattii* resistente ao mebendazol. E, desta forma, identificar o gene essencial do fungo a ser utilizado para triagem de novos compostos antifúngicos.

[00128] A presença de sequências semelhantes em outros microrganismos ou organismos na natureza foi avaliada com o uso da base de dados OrthoMCL. A análise da distribuição de ortólogos na natureza revelou que nenhuma das duas sequências ocorre em células humanas (Figura 3A e 3B).

[00129] Sequências similares à observada para a proteína nucleolar 16 ocorrem apenas em fungos. Foi identificada similaridade com fungos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida glabrata*, *Coccidioides posadasii*, *Schizosaccharomyces pombe*, entre outros. Em contrapartida, não foi possível observar similaridades em outros domínios como protozoários, arqueas, nematódeos e artrópodes, por exemplo.

[00130] Por outro lado, a potencial escramblase é observada em outros domínios da vida, mas também é ausente em células humanas. Foi identificada similaridade com diferentes tipos de plantas e algas, como o grupo das *Oryza sativa Japonica*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arabidopsis thaliana* e outros fungos, como *C. albicans*, *A. fumigattus*, *C. glabrata*, *C. posadasii*, *S. pombe*, *C. immitis*, *A. oryzae*, bem como roedores como *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e artrópodes como *Pediculus humanus*.

Exemplo 7: Produção de melanina pelos mutantes de *C. gattii*

[00131] A capacidade de espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* de causar dano ao hospedeiro depende da capacidade de produção pelo fungo do pigmento melanina e do polissacarídeo glucuronoxilomanana (GXM). As cepas mutantes P38-A1 e P46-G7, que apresentaram resistência ao mebendazol, foram analisados quanto a sua capacidade de produzir melanina.

[00132] A produção de melanina foi determinada visualmente após inóculo de 10^7 células de *C. gattii* em meio de cultura baseado em ágar suplementado com 1 mM de L-DOPA e cultivo por 24h, 48h e 72h a 30°C.

[00133] Ambos os mutantes P38-A1 e P46-G7 apresentaram uma cinética de produção de melanina alterada, quando comparado a cepa selvagem controle *C. gattii* R265 (Figura 5).

Exemplo 8: Produção de glucuronoxilomanana (GXM) pelos mutantes de *C. gattii*

[00134] A capacidade de espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* de causar dano ao hospedeiro também depende da capacidade de produção e secreção pelo fungo do polissacarídeo GXM. As cepas mutantes P38-A1 e P46-G7 que apresentaram resistência ao mebendazol, foram analisados quanto a sua capacidade de secretar GXM.

[00135] A quantificação de GXM extracelular foi determinada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) usando o anticorpo monoclonal 18B7.

Anticorpos primário e secundário foram utilizados na concentração de 1 µg/ml. Sobrenadantes de cultivo de 24h, 48h e 72h de *C. gattii* plaqueados em duplicatas e incubados por 1h a 37°C. O bloqueio foi realizado com PBS-BSA 1% por 1h a 37°C. Etapas seguintes foram realizadas com anticorpo primário 18B7 e posteriormente anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina. A revelação ocorreu pela adição de tampão contendo 5mg/ml de PNPP (p-nitrofenilfosfato), substrato da enzima fosfatase alcalina, e a leitura foi realizada espectrofotometricamente em comprimento de onda equivalente a 405 nm.

[00136] Ambos os mutantes P38-A1 e P46-G7 apresentaram uma grande redução na secreção de GXM nos tempos de 24, 48 e 72h, quando comparado a cepa selvagem controle *C. gattii* R265 (Figura 4).

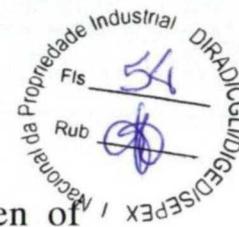
[00137] A presente invenção é descrita detalhadamente através dos exemplos aqui apresentados. Entretanto, é necessário frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos, mas que também inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela funciona.

1. May, R.C., et al., *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 2016. 14(2): p. 106-17.

2. Kwon-Chung KJ, B.T., Fell JW, Diaz M., (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondriani* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hyphomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*, 2002. 51: 804–806.

3. Byrnes, E.J., 3rd, et al., *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect*, 2011. 13(11): p. 895-907.

4. Bicanic, T., et al., Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. *Clin Infect Dis*, 2006. 43(8): p. 1069-73.



5. Park, B.J., et al., Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 2009. 23(4): p. 525-30.

6. Fonseca, F.L., et al., Role for chitin and chito oligomers in the capsular architecture of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, 2009. 8(10): p. 1543-53.

7. Rodrigues, M.L., et al., Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryot Cell*, 2007. 6(1): p. 48-59.

8. Monari, C., et al., Glucuronoxylomannan, a microbial compound, regulates expression of costimulatory molecules and production of cytokines in macrophages. *J Infect Dis*, 2005. 191(1): p. 127-37.

9. Yauch, L.E., et al., Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo. *Infect Immun*, 2004. 72(9): p. 5373-82.

10. Barbosa, F.M., et al., Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes Infect*, 2006. 8(2): p. 493-502.

11. Zaragoza, O., et al., The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*, 2009. 68: p. 133-216.

12. Robbins, N., G.D. Wright, and L.E. Cowen, *Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents*. *Microbiol Spectr*, 2016. 4(5).

13. Butts, A., et al., A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis. *Eukaryot Cell*, 2013. 12(2): p. 278-87.

14. Bicanic, T., et al., Independent association between rate of

clearance of infection and clinical outcome of HIV-associated cryptococcal meningitis: analysis of a combined cohort of 262 patients. *Clin Infect Dis*, 2009. 49(5): p. 702-9.

15. Butts, A., et al., Estrogen receptor antagonists are anti-cryptococcal agents that directly bind EF hand proteins and synergize with fluconazole in vivo. *MBio*, 2014. 5(1): p. e00765-13.

16. Heitman, J., et al., The *Cryptococcus neoformans* genome sequencing project. *Mycopathologia*, 1999. 148(1): p. 1-7.

17. Meyer, W., *Cryptococcus gattii* in the Age of Whole-Genome Sequencing. *MBio*, 2015. 6(6): p. e01761-15.

18. Toffaletti, D.L., et al., Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *J Bacteriol*, 1993. 175(5): p. 1405-11.

19. Idnurm, A., et al., *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryot Cell*, 2004. 3(2): p. 420-9.

20. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the, E.E.C.f.A.S.T., EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*, 2008. 14(4): p. 398-405.

21. Pavlopoulos, A., Identification of DNA sequences that flank a known region by inverse PCR. *Methods Mol Biol*, 2011. 772: p. 267-75.

22. Kwon-Chung, K.J., et al., *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014. 4(7): p. a019760.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para identificação de um composto antifúngico, caracterizado pelo fato de modular a atividade de produto do gene da NOP16 ao:

a) contactar o dito produto ou fragmentos deste com um composto ou uma pluralidade de compostos ou uma preparação compreendendo um ou mais ligantes; e

b) determinar se o dito composto ou a pluralidade de compostos ou a preparação compreendendo um ou mais ligantes modula a atividade do dito produto do gene ou fragmentos deste.

2. Processo para identificação de um composto antifúngico, caracterizado pelo fato de modular a atividade do produto do gene da escramblase ao:

a) contactar o dito produto ou fragmentos deste com um composto ou uma pluralidade de compostos ou uma preparação compreendendo um ou mais ligantes; e

b) determinar se o dito composto ou a pluralidade de compostos ou a preparação compreendendo um ou mais ligantes modula a atividade do dito produto ou fragmentos deste.

3. Processo para identificação de um composto antifúngico de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato de que a atividade ou produção do produto dos genes é inibida, diminuída ou aumentada.

4. Processo para identificação de um composto antifúngico, caracterizado pelo fato de ter habilidade em modular o crescimento, proliferação, sobrevivência ou viabilidade do *Cryptococcus*, ou modular a produção de subprodutos celulares ou extracelulares, compreendendo as seguintes etapas:

a) reduzir o nível ou a atividade do produto do gene da NOP16 em *Cryptococcus*, em relação ao tipo celular normal, sem que a dita redução

seja letal para o microrganismo;

b) contactar o dito microrganismo com um composto ou uma pluralidade de compostos ou uma preparação compreendendo um ou mais ligantes; e

c) determinar o quanto o dito composto ou a pluralidade de compostos ou a preparação compreendendo um ou mais ligantes inibiu o crescimento, proliferação, viabilidade ou sobrevivência do dito microrganismo ou a sua produção de produtos celulares ou extracelulares.

5. Processo para identificação de um composto antifúngico, caracterizado pelo fato de ter habilidade em modular crescimento, proliferação, sobrevivência ou viabilidade do *Cryptococcus*, ou modular a produção de subprodutos celulares ou extracelulares, compreendendo as seguintes etapas:

a) reduzir o nível ou a atividade do produto do gene da escramblase em *Cryptococcus*, em relação ao tipo celular normal, sem que a dita redução seja letal para o microrganismo;

b) contactar o dito microrganismo com um composto ou uma pluralidade de compostos ou uma preparação compreendendo um ou mais ligantes;

c) determinar o quanto o dito composto ou a pluralidade de compostos ou a preparação compreendendo um ou mais ligantes inibiu o crescimento, proliferação, viabilidade ou sobrevivência do dito microrganismo ou a sua produção de produtos celulares ou extracelulares.

6. Processo para identificação de um composto antifúngico de acordo com as reivindicações 1, 2, 4 e 5, caracterizado pelo fato de ser o composto da classe dos azóis.

7. Processo para identificação de um composto antifúngico de acordo com as reivindicações 1, 2, 4 e 5, caracterizado pelo fato de ser o composto um anticorpo, um fragmento de anticorpo ou uma molécula de

ácido nucleico antisense ou uma ribozima.

8. Processo para identificação de um composto antifúngico de acordo com as reivindicações 1, 2, 4 e 5, caracterizado pelo fato de utilizar cepas de *Cryptococcus* que foram submetidas a processo de mutação do gene alvo essencial.

9. Processo para identificação de um composto antifúngico de acordo com as reivindicações 1, 2, 4 e 5, caracterizado pelo fato de utilizar cepas de *C. neoformans*.

10. Processo para identificação de um composto antifúngico de acordo com as reivindicações 1, 2, 4 e 5, caracterizado pelo fato de utilizar cepas de *C. gattii*.

FIGURA 1

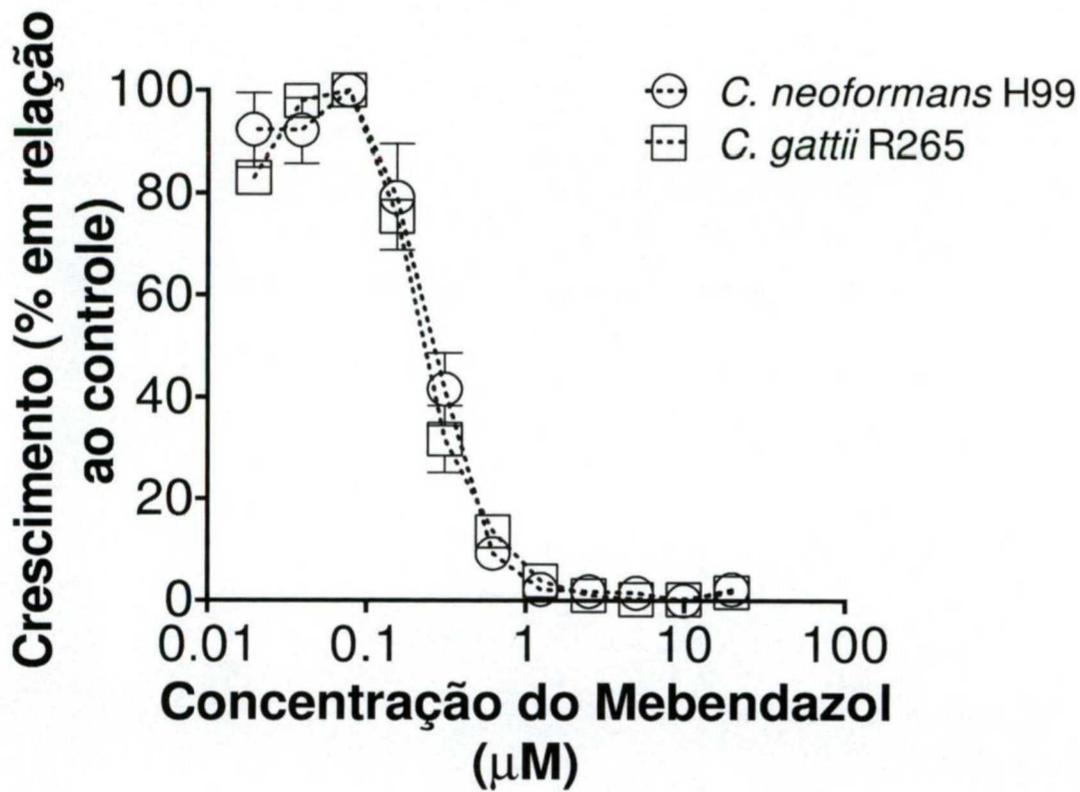


FIGURA 2

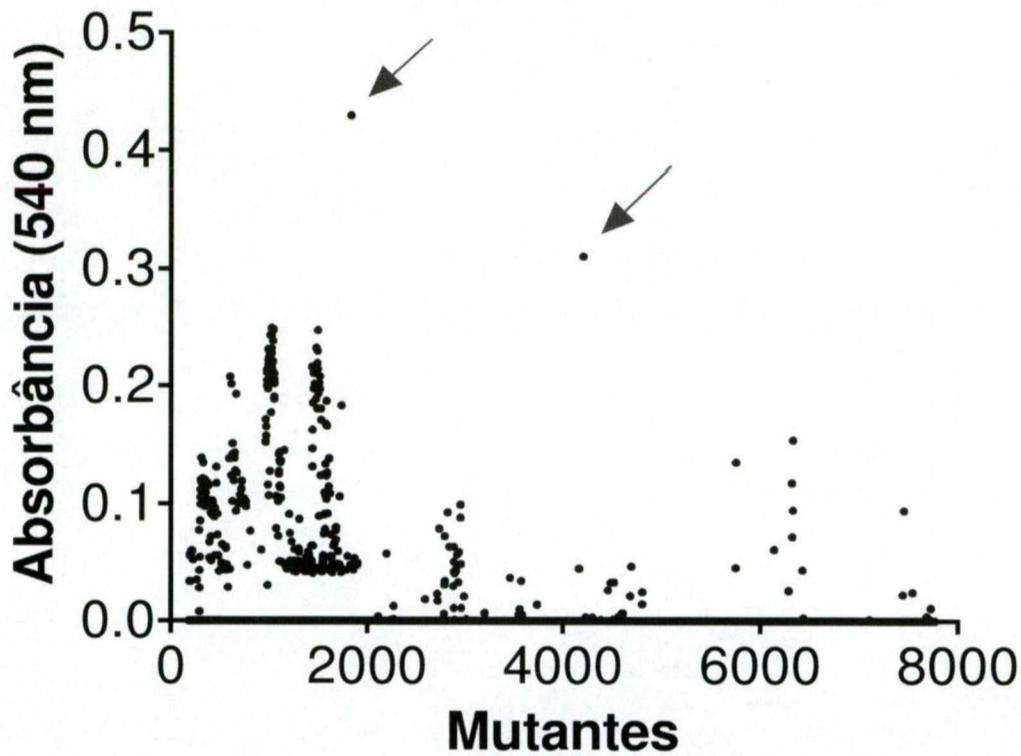


FIGURA 3

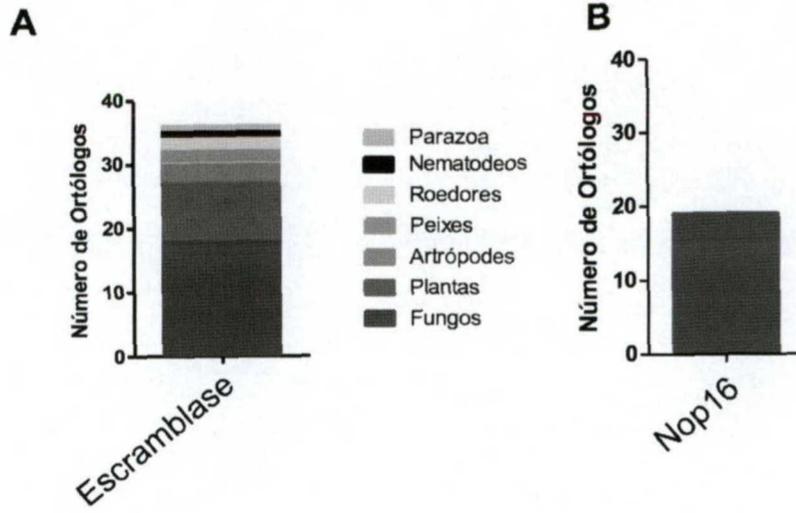


FIGURA 4

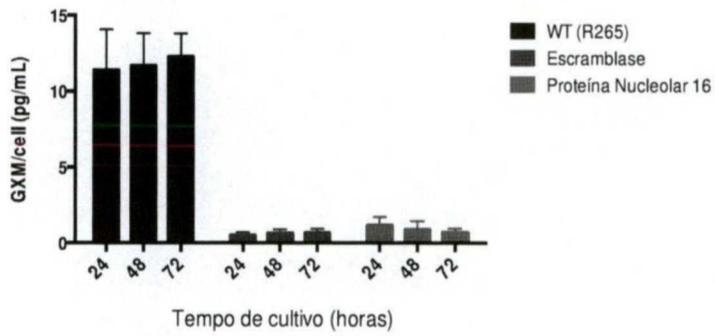
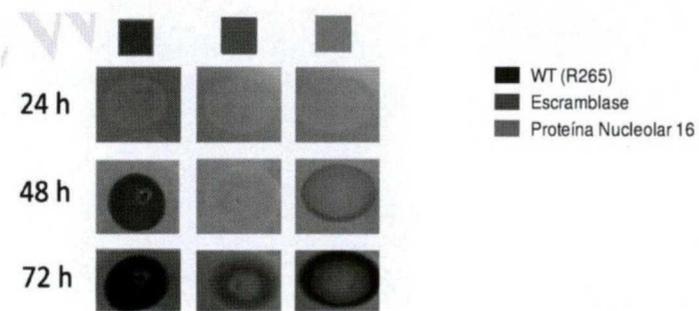


FIGURA 5



RESUMO

“GENES ESSENCIAIS DE *CRYPTOCOCCUS*”

A presente invenção se refere a métodos para identificação e validação de produtos gênicos essenciais do fungo *Cryptococcus* como alvos efetivos para triagem de drogas terapêuticas. O uso de dois genes essenciais identificados em *Cryptococcus*, responsáveis pela produção da proteína nucleolar 16 (NOP16) e de uma escramblase, se mostrou útil para o estudo de vias metabólicas essenciais para o crescimento, proliferação e sobrevivência do *C. neoformans* ou *C. gattii*, assim como para a produção de subprodutos celulares ou extracelulares importantes para a patogenicidade e virulência do microrganismo. Cepas de *Cryptococcus*, selvagens ou que sofreram mutação para interrupção de genes foram utilizadas para triagem de compostos com atividade antifúngica.