



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0905645-9 B1



(22) Data do Depósito: 27/10/2009

(45) Data de Concessão: 28/04/2020

(54) Título: VACINA DE DNA CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA

(51) Int.Cl.: A61K 39/12; C12N 15/40; A61P 31/14.

(73) Titular(es): FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ.

(72) Inventor(es): ERNESTO TORRES DE AZEVEDO MARQUES; RAFAEL DHALIA; ROMULO MACIEL FILHO.

(57) Resumo: VACINA DE DNA CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA. A presente invenção se refere a vacinas de DNA codificando seqüências virais específicas. As vacinas de DNA contra a Febre Amarela, desenvolvidas de acordo com a invenção, são baseadas na seqüência que codifica a proteína do envelope de VFA (p/YE'E). Além da construção selvagem p/YFE, a seqüência E foi ainda fusionada à seqüência que codifica a Proteína de Associação à Membrana Lisossomal humana (h-LAMP), gerando a construção (pL/YFE>. Os resultados da invenção são considerados bastante promissores uma vez que as duas construções são capazes de induzir resposta de célula T contra os mesmos epitopos induzidos pela vacina 17DD, e a construção pL/YFE foi ainda capaz de induzir anticorpos neutralizantes numa concentração considerada satisfatória. O vetor pL/YFE foi ainda inoculado em camundongos, para posterior desafio intracerebral com VFA. Surpreendentemente, 100% dos camundongos imunizados com pL/YFE sobreviveram ao desafio.

Vacina de DNA contra o vírus da Febre Amarela

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção está direcionada para uma vacina de DNA otimizada, baseada na região que codifica o envelope do vírus da Febre Amarela fusionada a Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP, capaz de processar o antígeno codificado e apresentá-lo ao sistema imune pela via MHC II.

Fundamentos da Invenção

[0002] O vírus da Febre Amarela (VFA) é considerado o protótipo da família Flaviviridae, representada ainda por vários outros vírus de importância médica causadores de enfermidades graves como a Dengue, Encefalite Japonesa e Febre do Oeste do Nilo (Barrett, 2002). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 200.000 casos de infecção por FA, incluindo 30.000 mortes, ocorrem anualmente em todo o mundo (sendo 90% dos casos disseminados na África). A estratégia mais segura de prevenção da doença continua sendo a vacinação, considerando que não existe ainda nenhuma droga efetiva contra a infecção por FA. Nos últimos 70 anos mais de 400 milhões de pessoas foram globalmente vacinadas com a vacina FA de vírus-atenuado (17DD), considerada bastante segura e eficaz. Apesar do sucesso da vacinação em massa com a 17DD, que é capaz de induzir tanto resposta duradoura por anticorpos neutralizantes como resposta citotóxica por células T (Poland, Calisher et al., 1981; Reinhardt, Jaspert et al., 1998), casos adversos graves (em consequência da vacinação) vem sendo sistematicamente reportados na literatura [revisado em (Liu, 2003)]. Em alguns casos a vacinação foi diretamente associada com o aumento da severidade sintomatológica (Monath, Arroyo et al., 2002) podendo até culminar com reações fatais (Vasconcelos, Luna et al., 2001; Lefeuvre, Marianneau et al., 2004). Diante deste cenário o desenvolvimento de nova estratégia de vacinação, como vacinas de DNA codificando seqüências virais

específicas (Donnelly, Ulmer et al., 1997; Lewis e Babiuk, 1999; Robinson, 1999; Schultz, Pavlovic et al., 2000) é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias vacinais ainda mais seguras.

[0003] O genoma do VFA é organizado numa molécula positiva de RNA mensageiro, de aproximadamente 10.8Kb, flanqueada pelas estruturas cap 5' e alça 3' terminal não poli-adenilada. O RNA VFA codifica 3 genes estruturais (Capsídeo - C, Membrana – M e Envelope - E) e 7 genes que codificam proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). Durante a montagem do vírus o domínio carboxi-terminal da proteína C atua como sequência sinal para a translocação do precursor PreM/M para dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira, permitindo a maturação apropriada das proteínas M e E. A co-expressão das proteínas PreM/M e E dos flavivírus, em células de mamífero, resulta na formação de partículas pseudo-virais capazes de induzir resposta humoral (Raviprakash, Kochel et al., 2000; Wu, Li et al., 2006), pois a proteína E é o principal alvo para a produção de anticorpos neutralizantes.

[0004] A co-expressão das proteínas PreM/M e E, como estratégia vacinal, foi descrita como sendo capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra os vírus da Encefalite Japonesa e da Dengue (Konishi, Yamaoka et al., 1998; Konishi, Yamaoka et al., 2000; Konishi, Ajiro et al., 2003). Entretanto, estas vacinas não foram capazes de induzir resposta duradoura com títulos apropriados de anticorpos neutralizantes (Lu, Raviprakash et al., 2003). A ineficiência destas formulações está provavelmente relacionada ao mecanismo de apresentação destes antígenos ao sistema imune dos hospedeiros. A maioria dos antígenos produzidos endogenamente, característicos das vacinas de DNA, são seqüestrados e apresentados ao sistema imune do hospedeiro por moléculas MHC I. Para uma resposta imune satisfatória, com alta produção de anticorpos neutralizantes, é crítico que os antígenos sejam apresentados a células do tipo

T helper CD4⁺ por moléculas MHC II. O processamento e a apresentação antigênica via MHC II induz a ativação de células T CD4⁺ que é vital para o funcionamento das vacinas genéticas, como já foi demonstrado em estudos de deleção do MHC II (Raviprakash, Marques et al., 2001) e depleção CD4⁺ em camundongos (Lu, Raviprakash et al., 2003). A ativação de células CD4⁺ é de fundamental importância para a indução de resposta CD8⁺, desenvolvimento de células de memória (Marques, Chikhlikar et al., 2003) e expansão clonal de células B antígeno-específicas (De Arruda, Chikhlikar et al., 2004). Para que antígenos produzidos endogenamente sejam dirigidos a moléculas de classe II, ao invés de classe I, é necessário que estas proteínas sejam fusionadas a peptídeos-sinais que as direcionem para o compartimento lisossomal da célula.

[0005] A possibilidade de direcionamento de antígenos, produzidos endogenamente, para o processamento via MHC II foi firmemente reforçada após o descobrimento de uma proteína trans-membrana do tipo I, denominada de Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP (Chen, Murphy et al., 1985). LAMP é uma proteína que se liga à membrana externa do lisossomo, através de sua sequência carboxi-terminal YXXØ, presente numa cauda citoplasmática de 11 aminoácidos (Guarnieri, Arterburn et al., 1993; Rohrer, Schweizer et al., 1996; Obermuller, Kiecke et al., 2002). O tráfico intracelular de LAMP inclui compartimentos multilaminares especializados de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) imaturas, chamados MIIC e CIIV, onde ocorre o processamento e formação dos complexos peptídeos antigênicos-MHC II (Kleijmeer, Morkowski et al., 1997; Drake, Lewis et al., 1999; Turley, Inaba et al., 2000). A constatação da co-localização das moléculas LAMP e MHC II permite sua utilização como suporte para antígenos quiméricos, contendo as sequências alvos de LAMP, visando o direcionamento do processamento antigênico para o compartimento MHC II. Vários trabalhos vem demonstrando que os

antígenos fusionados ao LAMP (antígeno/LAMP) são capazes de gerar uma maior atividade proliferativa de linfócitos antígeno-específicos, altos títulos de anticorpos e intensa atividade T- citotóxica em relação aos antígenos selvagens não fusionados ao LAMP (Rowell, Ruff et al., 1995; Wu, Guarnieri et al., 1995; Ruff, Guarnieri et al., 1997; Raviprakash, Marques et al., 2001; Su, Vieweg et al., 2002; Donnelly, Berry et al., 2003; Anwar, Chandrasekaran et al., 2005).

[0006] A vacina 17DD de vírus-atenuado vem sendo produzida no campus de Manguinhos – FIOCRUZ/RJ desde 1937, ou seja, a pelo menos 70 anos. A imunização em massa com a vacina 17DD, assim como o combate sistemático ao vetor transmissor da Febre Amarela (*Aedes aegypti*), foi e continua sendo estratégias de fundamental importância para o controle da doença no país. Apesar da eficácia e segurança da vacina 17DD, a mesma não é recomendada para infantes, mulheres grávidas, imunodeficientes e pessoas alérgicas a proteínas do ovo (substrato de produção da vacina 17DD). Estima-se que aproximadamente 5% da população apresente alergia e/ou efeitos colaterais em resposta a vacina, podendo culminar em casos mais raros de óbito provocado pela vacinação.

[0007] Recentemente, diante da morte de macacos em regiões silvestres onde circula VFA, a população começou a entrar em pânico diante de especulações da re-introdução da Febre Amarela urbana no país. Considerando o risco de infecção predominante em áreas tropicais, a invasão do ambiente urbano pelo vetor da doença, o aquecimento global e a falta de políticas apropriadas para o combate do inseto vetor, o risco da disseminação da doença em regiões urbanas não pode ser negligenciado. O caos causado pela dengue no estado do Rio de Janeiro, que por sinal é transmitida pelo mesmo vetor da Febre Amarela, ilustra o risco de um possível (mais não provável) surto de Febre Amarela urbana no país. Considerando todos estes fatores, o desenvolvimento de uma estratégia vacinal complementar, e/ou

alternativa contra a Febre Amarela, pode complementar/substituir o uso da versão vacinal de vírus atenuado.

[0008] Apesar de nenhuma vacina de DNA ter sido ainda aprovada para uso humano, este tipo de tecnologia vem sendo cada vez mais aprimorado e potencialmente deverá substituir as formulações baseadas em microorganismos vivos. Formulações a base de DNA podem ser facilmente manipuladas e dosadas, não requerem nenhuma condição especial de temperatura para armazenamento e distribuição e ainda eliminam qualquer eventual risco de infecção pelos agentes vivos/atenuados. Este tipo de tecnologia permite ainda a manipulação de imunógenos capazes de estimular o sistema imune com epítomos e sinais biológicos específicos, evitando o uso de antígenos/epítomos desnecessários e até potencialmente perigosos no que se refere a possíveis respostas imunológicas cruzadas (principal empecilho para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a Dengue, devido a reação cruzada entre os seus 4 sorotipos). Finalmente, com o avanço tecnológico das ferramentas de manipulação de microorganismos e purificação de moléculas em larga escala, as vacinas de DNA poderão ser produzidas em maior escala e com um menor custo final quando comparada as formulações atenuadas/inativadas.

[0009] É importante ressaltar que diante dos resultados significativamente encorajadores, obtidos pelo nosso grupo, utilizando uma vacina genética baseada na sequência viral da proteína E fusionada à LAMP, e do melhoramento desta vacina pela otimização dos antígenos para a expressão em humanos, acreditamos na possibilidade do desenvolvimento e implementação de uma vacina de DNA, ainda mais segura, capaz de conferir imunidade contra o vírus da Febre Amarela em humanos. Este tipo de tecnologia poderá ainda servir de subsídio para o desenvolvimento de outras vacinas virais, principalmente contra outros flavivirus como o vírus da Dengue.

[0010] O documento WO 2004/078986 A1 divulga pseudo-partículas de flavivirus para utilização como vacinas contendo glicoproteínas prM/E agregadas em partículas do núcleo retroviral.

[0011] O documento US 2004157307 A1 divulga vacinas quiméricas compreendendo uma sequência de antígenos fusionados a um domínio para o transporte da proteína para um compartimento endossomal, por exemplo a um domínio do polipeptídico LAMP. Tais antígenos podem ser proteínas do vírus da febre amarela.

[0012] O problema da presente invenção é fornecer outros antígenos do vírus da febre amarela (VFA) direcionados para o compartimento lisossomal.

[0013] De acordo com a presente invenção, o referido problema é resolvido fusionando o polipeptídeo PreM/ME do VFA ao domínio C-terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP (SEQ ID NO: 8 a 12), conforme especificado nas reivindicações.

Sumário da Invenção

[0014] A presente invenção, em seu aspecto mais amplo, está direcionada para uma vacina de DNA otimizada, baseada na região que codifica o envelope do vírus da Febre Amarela fusionada a Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP, capaz de processar o antígeno codificado e apresentá-lo ao sistema imune pela via MHC II.

Breve Descrição das Figuras e Tabelas

[0015] Figura 1: Esquema das regiões de anelamento para a amplificação de PreM/M-E selvagem (p/YFE) e PreM/M-E fusionado a LAMP (pL/YFE). Esquema representado todo o genoma do vírus da Febre Amarela, composto de 3 genes estruturais [Capsídeo (C), Membrana (PreM/M) e Envelope (E)] e 7 não-estruturais (NS1-NS5). As setas pretas indicam as regiões de anelamento dos primers (oligonucleotídeos) utilizados para a amplificação de PreM/M-E selvagem (região carboxi-terminal do

capsídeo X região trans-membrana C-terminal do envelope). Para a amplificação de PreM/M-E, para a fusão com LAMP, o primer “reverse” utilizado foi desenhado para anelar antes da região trans-membrana do envelope (seta branca).

[0016] Figura 2: Produto de PCR PreM/M-E do vírus FA. Após a amplificação por PCR, utilizando os primers desenhados para a sequência PreM/M-E selvagem (Tabela 1), foi obtido um fragmento de aproximadamente 2000pb como esperado. O referido produto de PCR foi migrado em gel de agarose 1% e visualizado ao transluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado o 1kb plus ladder (Invitrogen®), sendo indicadas como referência as bandas de 1650 e 2000 pares de bases.

[0017] Figura 3: Produtos de PCR PreM/M-E de VFA para fusão com LAMP e C-LAMP (humano). Após a amplificação por PCR, utilizando os primers desenhados para as sequências PreM/M-E para fusão com LAMP e C-LAMP humano (Tabela 1), foram obtidos um fragmento de aproximadamente 1900pb (PreM/M-E) e outro de 125pb (C-LAMP) como esperado. Os referidos produtos de PCR foram migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado o 1kb plus ladder (Invitrogen®), sendo indicadas como referência as bandas de 100 e 2000 pares de bases.

[0018] Figura 4: Digestão de DNA plasmidial para a confirmação de clonagem da sequência PreM/M-E selvagem no vetor pGEMT-Easy. Após a transformação com a ligação pGEMT-Easy + PreM/M-E selvagem, 3 clones bacterianos brancos (triados por IPTG/X-Gal) foram inoculados em meio líquido para posterior extração de DNA plasmidial. As minipreps obtidas foram em seguida digeridas com as enzimas XhoI e NotI para a confirmação da clonagem de PreM/M-E selvagem no vetor pGEMT-Easy. Os produtos de digestão foram em seguida migrados em gel de agarose 1% e

visualizados ao transluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado o 1kb plus ladder (Invitrogen®), sendo indicadas como referência as bandas de 3000 e 2000 pares de bases. Apenas o clone 2, asterisco, liberou um fragmento do tamanho do esperado (2000pb).

[0019] Figura 5: Digestão de DNA plasmidial para a confirmação de clonagem da seqüência PreM/M-E para fusão com LAMP no vetor pGEMT-Easy. Após a transformação com a ligação pGEMT-Easy + PreM/M-E para fusão com LAMP, 8 clones bacterianos brancos (triados por IPTG/X-Gal) foram inoculados em meio líquido para posterior extração de DNA plasmidial. As minipreps obtidas foram em seguida digeridas com as enzimas NheI e XhoI para a confirmação da clonagem de PreM/M-E para fusão com LAMP no vetor pGEMT-Easy. Os produtos de digestão foram em seguida migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado o 1kb plus ladder (Invitrogen®), sendo indicadas como referência as bandas de 1650 e 2000 pares de bases. Os clones 3, 5 e 8 (asteriscos) liberaram fragmentos do tamanho esperado (1900pb).

[0020] Figura 6: Digestão de DNA plasmidial para a confirmação de clonagem de C-LAMP no vetor pGEMT-Easy. Após a transformação com a ligação pGEMT-Easy + C-LAMP, 3 clones bacterianos foram inoculados em meio líquido para posterior extração de DNA plasmidial. As minipreps obtidas foram em seguida digeridas com as enzimas XhoI e XbaI para a confirmação da clonagem de C-LAMP no vetor pGEMT-Easy. Os produtos de digestão foram em seguida migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado o 1kb plus ladder (Invitrogen®), sendo indicadas como referência as bandas de 100 e 3000 pares de bases. Do total de 3 clones todos liberaram os fragmentos do tamanho esperado (125pb, asteriscos).

[0021] Figura 7: Digestão de DNA plasmidial para a confirmação da clonagem da sequência PreM/M-E selvagem no vetor p43.2. Após a transformação com a ligação p43.2 + PreM/M-E selvagem, 3 clones bacterianos foram inoculados em meio líquido para posterior extração de DNA plasmidial. As minipreps obtidas foram em seguida digeridas com as enzimas XhoI e NotI para a confirmação da clonagem de PreM/M-E selvagem no vetor p43.2 (p/YFE). Os produtos de digestão foram em seguida migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado o 1kb plus ladder (Invitrogen®), sendo indicadas como referência as bandas de 2000 e 5000 pares de bases. Todos os clones liberaram os fragmentos do tamanho esperado (2000pb, asteriscos).

[0022] Figura 8: Digestão de DNA plasmidial para a confirmação de clonagem da sequência p43.2-PreM/M-E para fusão com LAMP no vetor p43.2. Após a transformação com a ligação p43.2 + PreM/M-E para fusão com LAMP, 8 clones bacterianos foram inoculados em meio líquido para posterior extração de DNA plasmidial. As minipreps obtidas foram em seguida digeridas com as enzimas NheI e XhoI para a confirmação da clonagem de p43.2-PreM/M-E para fusão com LAMP no vetor p43.2. Os produtos de digestão foram em seguida migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado o 1kb plus ladder (Invitrogen®), sendo indicadas como referência as bandas de 2000 e 5000 pares de bases. Do total de 8 clones 7 liberaram os fragmentos do tamanho esperado (1900pb, asteriscos).

[0023] Figura 9: Digestão de DNA plasmidial para a confirmação de clonagem de C-LAMP no vetor p43.2-PreM/M-E para fusão com LAMP. Após a transformação com a ligação p43.2-PreM/M-E + C-LAMP, 7 clones bacterianos foram inoculados em meio líquido para posterior extração de

DNA plasmidial. As minipreps obtidas foram em seguida digeridas com as enzimas XhoI e XbaI para a confirmação da clonagem de C-LAMP no vetor p43.2-PreM/M-E/LAMP (pL/YFE). Os produtos de digestão foram em seguida migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado o 1kb plus ladder (Invitrogen®), sendo indicadas como referência as bandas de 100 e 7000 pares de bases. Do total de 7 clones todos liberaram os fragmentos do tamanho esperado (125pb, asteriscos).

[0024] Figura 10: Células 293 transfectadas com as construções p/YFE e pL/YFE. A validação da expressão das proteínas codificadas pelos plasmídeos p/YFE e pL/YFE, assim como a localização intracelular das mesmas, foi realizada através de ensaios de imunofluorescência. Tanto a proteína E como E/LAMP foram detectadas através de anticorpo policlonal, anti-VFA. A esperada distribuição da proteína viral E selvagem, caracteristicamente associada a membrana reticular, foi confirmada (A). Em adição, a proteína quimérica E/LAMP (presente nas células 293 transfectadas com pL/YFE) apresentou-se distribuída pela membrana reticular mais principalmente associada às membranas lisossomais (como também era esperado devido a presença de LAMP).

[0025] Figura 11: Digestão de DNA plasmidial, nas condições livre de endotoxina, para a confirmação da identidade dos vetores (p/YFE e pL/YFE). Após a transformação com as construções p/YFE e pL/YFE, colônias isoladas de cada uma das construções foram inoculadas em meio líquido para posterior extração de DNA plasmidial. As Gigapreps obtidas foram em seguida digeridas. A construção selvagem (p/YFE) foi submetida a duas provas de digestão. A primeira com as enzimas XhoI e XbaI na qual houve a linearização da construção (1) e com as enzimas XhoI e NotI que gerou a liberação do fragmento codificado por p/YFE. A construção com LAMP (pL/YFE) também foi submetida a duas provas de digestão. A

primeira com as enzimas XhoI e XbaI na qual houve a liberação de LAMP (asterisco), e com as enzimas NheI e XbaI que gerou a liberação do fragmento codificado por pL/YFE. Os produtos de digestão foram migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado o 1kb plus ladder (Invitrogen®), sendo indicadas como referência as bandas de 1650 e 100 pares de bases.

[0026] Figura 12: Comparação das respostas celulares induzidas, em camundongos Balb/C, pela vacina 17DD e as construções p/YFE e pL/YFE. Camundongos Balb/C foram imunizados nos dias 0 e 21 com: (A) 10^4 Unidades Formadoras de Colônia – PFU da vacina 17DD, (B) 50ug da vacina pL/YFE ou (C) 50ug da vacina p/YFE. Entre 7-10 dias após a última imunização foram isoladas amostras de esplenócitos dos camundongos para ensaios de ELISPOT - IFN- γ , utilizando uma biblioteca de peptídeos sintéticos, 15 aminoácidos cada com “overlapping” de 11 aminoácidos entre os mesmos, cobrindo toda a proteína E de VFA. Esta figura representa uma média de 2-4 experimentos realizados com “pools” de 3-5 camundongos cada.

[0027] Figura 13: Níveis de anticorpos neutralizantes detectados em camundongos BALB/c e C57Bl/6, após as imunizações com as vacinas 17DD, pL/YFE e p/YFE. Os camundongos das duas espécies foram imunizados com a vacina convencional ou com as vacinas de DNA nos dias 0, 30 e 45 e os respectivos soros imunes foram obtidos nos dias 15, 45 e 60. Os soros foram testados individualmente em ensaios neutralização por redução de placas – PRNT, comparando com um soro de macaco contendo anticorpos neutralizantes contra VFA em uma concentração conhecida. A construção pL/YFE, apesar de induzir uma produção de anticorpos neutralizantes aproximadamente 3,5 vezes menor que a vacina 17DD, é capaz

de induzir títulos de anticorpos neutralizantes pelo menos 7 vezes maior que os títulos induzidos por p/YFE.

[0028] Figura 14: Avaliação de proteção contra VFA, através de ensaios de injeção intracerebral em camundongos previamente imunizados com 17DD e pL/YFE. Os ensaios de proteção foram realizados utilizando o modelo de imunização/desafio, injetando 10^5 PFU do vírus vacinal 17DD (via intracerebral) em camundongos previamente imunizados com a vacina 17DD e com a vacina pL/YFE. Os animais foram imunizados 3 vezes (dias 0, 30 e 45) e desafiados 15 dias após a última imunização. Tanto a vacina 17DD como a vacina pL/YFE foram capazes de proteger em 100% os animais desafiados. A tabela 2 complementa as informações desta figura, no que se refere ao número de animais desafiados assim como comparando a eficiência das vacinas de DNA em ambas as espécies.

[0029] Tabela 1: Oligonucleotídeos (primers) utilizados para gerar as construções vacinais p/YFE e pL/YFE. Para o desenho dos nucleotídeos capazes de amplificar as seqüências PreM/M-E selvagem e PreM/M-E-LAMP foi utilizado o software de domínio público Ape [desenvolvido pelo Dr. M. Wayne Davis – (<http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>)].

[0030] Tabela 2: Resultados do teste de proteção em camundongos BALB/c e C57B1/6 comparando a vacina 17DD com a vacina de DNA pL/YFE. Camundongos imunizados com a vacina 17DD, e com a construção de DNA pL/YFE, foram desafiados via intracerebral com o VFA 17DD. Ambas as linhagens de camundongos foram 100% protegidas com a vacina convencional e com a vacina de DNA. Como controle negativo, os camundongos foram submetidos aos mesmos esquemas de imunização com o vetor p43.2 vazio e PBS.

[0031] Tabela 3: Comparação dos níveis de expressão das proteínas do envelope de Febre Amarela, selvagens e otimizadas, por

citometria de fluxo. Células 293 foram transfectadas com 1 ug de cada DNA vacinal, usando lipofectamina, e coradas com soro de coelho anti-envelope de Febre Amarela. A transfecção das células foi normalizada, usando como controle interno um plasmídeo codificando uma proteína fluorescente, e em relação ao nível de expressão da proteína codificada pela construção codificante da sequência nativa do envelope (número 2). O plasmídeo otimizado (número 6) apresentou um nível de expressão 6.5 vezes maior que o plasmídeo codificando a sequência nativa (número 2).

Descrição Detalhada da Invenção

[0032] Os presentes inventores desenvolveram e avaliaram a eficiência de expressão e capacidade de indução de resposta imune de duas vacinas genéticas, ambas baseadas na estratégia de co-expressão das proteínas PreM/M e E do VFA (uma selvagem e a outra fusionada à LAMP). Ambas as construções, selvagem (p/YFE) e com LAMP (pL/YFE), foram utilizadas para transfectar células humanas e as respectivas proteínas codificadas pelas mesmas foram detectadas por imunofluorescência. Em seguida, os vetores p/YFE e pL/YFE foram inoculados em camundongos e as respostas imunes, induzidas por cada construção, foram analisadas em termos de resposta celular e humoral. Os resultados foram considerados excelentes uma vez que as duas construções são capazes de induzir resposta de célula T contra os mesmos epítomos induzidos pela vacina 17DD, e pL/YFE foi ainda capaz de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes. Estes vetores foram ainda inoculados em camundongos que em seguida foram desafiados contra VFA, com o objetivo de avaliar se estas construções são capazes de proteger estes animais contra a FA. Apesar da construção pL/YFE ter sido capaz de gerar um maior título de anticorpos neutralizantes que a construção selvagem p/YFE, tanto em Balb/c como em C57Bl/6 imunizados, ambas as construções conferiram 100% de proteção aos camundongos desafiados. Estes resultados são considerados excelentes.

[0033] A vacina pL/YFE foi ainda otimizada, gerando a construção pL/YFEopt, utilizando o algoritmo genético do programa LETO 1.0 (Entelechon®). No processo de otimização foram levados em consideração fatores como: codon usage, estrutura secundária do RNA mensageiro, presença de motivos repetitivos de DNA, conteúdo de GC, presença/ausência de sítios de restrição, sítios críticos de “splicing”, etc. As seqüências otimizadas foram enviadas para a síntese comercial (Geneart®) e em seguida subclonadas no vetor 8L, selvagem e com LAMP. As construções vacinais otimizadas, assim como p/YFE e pL/YFE selvagens, serão inoculadas em camundongos convencionais e transgênicos (expressando HLAs humanos) e avaliadas quanto à sua imunogenicidade através de ensaios de ELISPOT, neutralização viral por redução de placa (PRNT) e desafio contra VFA. A invenção será, agora, descrita através de exemplos. Os exemplos seguintes são ilustrativos da invenção e representam as modalidades preferidas, aqueles habilitados no estado da arte sabem ou são capazes de encontrar, usando nada mais que experimentação rotineira, como empregar outros materiais e técnicas apropriadas.

Amplificação por PCR

[0034] Os primers desenhados (Tabela 1) para a amplificação de PreM/M-E selvagem, PreM/M-E para fusão com LAMP e domínio C-terminal de LAMP, permitiram a obtenção das respectivas seqüências com os pesos moleculares esperados. A seqüência PreM/M-E selvagem foi amplificada através de primers que flanqueiam a região N-terminal de PreM/M (mais especificamente ao nível da região carboxi-terminal do capsídeo) e a região trans-membrana C-terminal do envelope. Para a amplificação da seqüência PreM/M-E, visando sua fusão ao domínio C-terminal de LAMP, o primer “forward” utilizado foi desenhado para anelar com a mesma região do capsídeo. Por outro lado, o primer “reverse” utilizado foi desenhado para anelar mais internamente dentro da região que codifica o

envelope. Desta forma, a sequência PreM/M-E (para a fusão com LAMP) não possui o domínio trans-membrana C-terminal do envelope, visando a sua substituição pelo domínio C-terminal de LAMP (Figura 1).

[0035] O produto de PCR PreM/M-E para fusão com LAMP possui aproximadamente o mesmo tamanho do produto PreM/M-E selvagem, pois a região removida do envelope tem apenas 100 pares de bases (pb). Para substituir este domínio trans-membrana C-terminal do envelope, desenhamos primers capazes de amplificar a região C-terminal do LAMP-1 humano (C-LAMP). O primer “forward” permite a fusão (em fase) de PreM/M-E com C-LAMP, enquanto o primer “reverse” possui o códon de terminação da tradução. O produto de PCR da sequência PreM/M-E selvagem, de aproximadamente 2000 pares de bases (pb), pode ser visualizada na Figura 2. Já os produtos de PCR, PreM/M-E para fusão com LAMP (1900 pb) e C-LAMP (125 pb), podem ser visualizados na Figura 3.

Clonagem dos produtos de PCR obtidos no vetor pGEMT-Easy

[0036] Uma vez confirmados os tamanhos esperados dos produtos de PCR PreM/M-E selvagem, PreM/M-E para fusão com LAMP e C-LAMP, os mesmos foram clonados no vetor pGEMT-Easy. Para facilitar a triagem de clones positivos, clones contendo inserto inserido dentro do fragmento LacZ do gene da β -galactosidase, foram selecionados apenas clones brancos de cada construção. Da placa contendo as bactérias transformadas com a ligação pGEMT-Easy + PreM/M-E selvagem, foram selecionados 3 clones. Estes clones foram inoculados em meio líquido de crescimento, para posterior preparação de DNA plasmidial (miniprep) e prova de digestão para confirmação da clonagem. Dos 3 clones escolhidos apenas 1 liberou o inserto de 2000pb esperado, relativo a construção PreM/M-E selvagem (Figura 4). Com relação as ligação pGEMT-Easy + PreM/M-E para fusão com LAMP, foram selecionados 8 clones brancos . Estes clones foram também submetidos à extração plasmidial e prova de

digestão. Dos 8 clones escolhidos 3 liberaram o inserto de 1900 esperado, relativos a construção PreM/M-E para fusão com LAMP (Figura 5). Já da ligação pGEMT-Easy + C-LAMP foram selecionados 3 clones, dos quais todos liberaram o inserto após digestão (Figura 6).

Subclonagens dos fragmentos clonados no pGEMT-easy no vetor p43.2

[0037] Para a subclonagem de PreM/M-E no vetor p43.2, este fragmento foi clivado do vetor pGEMT-Easy e inserido no vetor p43.2. Para facilitar a triagem dos clones positivos, 3 concentrações diferentes de inserto foram ligadas numa concentração constante do vetor p43.2 (como controle negativo foi realizada uma ligação na ausência de inserto). Desta forma foi selecionada a placa com maior quantidade de clones, comparando as placas com diferentes concentrações de inserto com o controle negativo, para a seleção de clones. Desta placa contendo as bactérias transformadas com a ligação p43.2 + PreM/M-E selvagem, foram selecionados 3 clones. Estes clones foram inoculados em meio líquido de crescimento, para posterior preparação de DNA plasmidial e prova de digestão para confirmação da clonagem. Dos 3 clones escolhidos todos liberaram o inserto de 2000pb esperado, relativo a construção p/YFE (Figura 7). Com relação à construção p43.2 + PreM/M-E/LAMP foi necessária a construção de um vetor intermediário, contendo PreM/M-E para a fusão com LAMP, para a posterior fusão de LAMP. Desta forma, o fragmento PreM/M-E para a fusão com LAMP foi clivado do vetor pGEMT-Easy e subclonado no vetor p43.2, gerando a construção intermediária p43.2- PreM/M-E para a fusão com LAMP. Desta ligação foram selecionados 8 clones, dos quais 7 liberaram o inserto de 1900pb esperado após a prova de digestão (Figura 8). Para fusionar LAMP ao fragmento p43.2-PreM/M-E para fusão com LAMP, C-LAMP foi clivado do vetor pGEMT-Easy/C-LAMP e purificado. Em seguida o vetor p43.2-pM/M-E para fusão com LAMP foi clivado com as mesmas enzimas, permitindo a inserção de LAMP na sua extremidade C-terminal gerando a

construção pL/YFE. Para confirmar a inserção de LAMP no p43.2-PreM/M-E para fusão com LAMP, foram digeridos 7 clones dos quais todos liberaram o fragmento de 125pb esperado (Figura 9).

Sequenciamento das construções p/YFE e pL/YFE

[0038] Para confirmar a identidade e a qualidade das seqüências subclonadas no vetor p43.2, os respectivos vetores foram seqüenciados utilizando primers internos desenhados para anelarem a cada 400pb dos insertos clonados (tanto no sentido “forward” como no sentido “reverse”). As seqüências obtidas foram analisadas através dos programas ApE® e Lasergene®. Na construção p/YFE foram encontradas 2 mutações pontuais não-silenciosas, ou sejam que alteram o aminoácido, em um total de 644 aminoácidos. As alterações foram de uma alanina (A) por uma valina (V), na posição 250, e de uma serina (S) pelo ácido aspártico (D) na posição 349. Estas mutações foram ainda as únicas encontradas na construção pL/YFE, indicando que as mutações não ocorreram ao nível de PCR e sim já estavam presentes no DNA molde utilizado para a amplificação. Considerando que a proteína E possui diversos epítomos para células B (pois apenas a proteína E e NS1 são capazes de gerar anticorpos neutralizantes), assim como para células T (dados não mostrados, obtidos por colaboradores de nosso grupo), estas mutações foram consideradas sem relevância no nosso estudo de desenvolvimento vacinal.

Detecção das proteínas E e E/LAMP por imunofluorescência

[0039] Para avaliar a expressão das proteínas E e E/LAMP, codificadas pelas construções p/YFE e pL/YFE respectivamente, células 293 humanas foram transfectadas com estas vacinas de DNA. Apesar da baixa eficiência de expressão (em torno de 40%), ambas as proteínas foram detectadas nos compartimentos celulares adequados. Como era esperado foi confirmada a distribuição reticular característica do antígeno E selvagem

(Figura 10A), assim como a distribuição lisossomal característica da proteína E-LAMP (Figura 10B).

Avaliação da resposta imune induzida em camundongos imunizados com as vacinas p/YFE e pL/YFE

[0040] Para os ensaios de imunização os DNA vacinais, p/YFE e pL/YFE, foram inicialmente preparados em larga escala livres de endotoxinas. As preparações obtidas foram submetidas a provas de digestão, com enzimas específicas, a fim de certificar a qualidade/identidade dos vetores. O vetor p/YFE foi digerido com as enzimas XhoI e XbaI e com as enzimas XhoI e NotI, enquanto o vetor pL/YFE foi digerido com as enzimas XhoI e XbaI e com as enzimas NheI e XbaI. Todas as digestões liberaram fragmentos de DNA no tamanho esperado (Figura 11). Em seguida, as construções p/YFE e pL/YFE foram usadas para testes experimentais de imunização em camundongos.

[0041] Os plasmídeos p/YFE e pL/YFE, livres de endotoxinas, foram então inoculados em camundongos BALB/c e C57Bl/6, utilizando como controle positivo a vacina 17DD e controles negativos solução salina e vetor p43.2 vazio. As respostas imunes, induzidas por cada construção, foram analisadas em termos de resposta celular (através de ensaios de “Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT – ELISPOT”) e humoral (através de ensaios de neutralização viral – PRNT). Os resultados obtidos foram considerados excelentes uma vez que as duas construções são capazes de induzir resposta de célula T contra os mesmos epítomos induzidos pela vacina de vírus atenuado convencional (Figura 12), e a construção pL/YFE foi ainda capaz de induzir anticorpos neutralizantes numa concentração considerada bastante satisfatória. A construção pL/YFE, apesar de induzir uma produção de anticorpos neutralizantes aproximadamente 3.5 vezes menor que a vacina 17DD, é capaz de induzir títulos de anticorpos neutralizantes pelo menos 7 vezes maior que p/YFE (Figura 13).

[0042] O vetor pL/YFE foi então inoculado 3 vezes (50µg/imunização) em camundongos BALB/c e C57Bl/6. Mais uma vez a vacina 17DD foi utilizada como controle positivo e tanto o vetor p43.2 vazio como solução salina (1X PBS), foram utilizados como controles negativos. Duas semanas após a última imunização, os animais foram desafiados contra VFA pelo inóculo de 10^5 Unidades Formadoras de Placas (PFU) da vacina 17DD (via intracerebral). Tanto a vacina 17DD como a vacina de DNA pL/YFE (E-LAMP) conferiram 100% de proteção aos camundongos desafiados (Figura 14 e Tabela 2).

Otimização da vacina pL/YFE gerando as construções pL/YFEopt1 e pL/YFEopt2

[0043] Para melhorar a eficiência de expressão do antígeno E em células eucarióticas, já visando experimento em primatas, a sequência de DNA que codifica a proteína E foi otimizada. Esta sequência foi analisada/otimizada com relação a características como “codon usage”, estrutura secundária do RNA mensageiro (mRNA), distribuição do conteúdo de GC, motivos repetitivos de DNA, sítios de restrição, sítios crípticos de “Splicing”, etc. O processo de otimização leva em consideração os diversos parâmetros supracitados, ao mesmo tempo, buscando um equilíbrio entre os mesmos.

[0044] Foram geradas duas versões otimizadas da vacina pL/YFE, denominadas de pL/YFEopt1 e pL/YFEopt2. As construções otimizadas foram então utilizadas para transfectar células 293 humanas, com o objetivo de se avaliar a eficiência de expressão dos antígenos E-LAMP otimizadas (E-LAMP_{OPT1-2}) com relação ao antígeno E-LAMP selvagem. Através de ensaios de imunofluorescência a expressão de E-LAMP foi considerada pelo menos 20 vezes mais intensa (dados não mostrados). Embora, não tenham sido realizados ensaios quantitativos de “western-blot” para avaliar, com mais precisão, quantas vezes E-LAMP_{OPT1} são mais

expressos com relação a E-LAMP selvagem, é possível afirmar que a expressão desses antígenos E-LAMP_{OPT1} é significativamente superior à expressão do antígeno selvagem.

[0045] Considerando a maior eficiência de expressão de p43.2/E-LAMP_{OPT1-2} com relação a p43.2/E-LAMP selvagem, acreditamos que possivelmente a vacina de DNA otimizada venha a ser considerada ainda mais eficiente que a vacina selvagem previamente testada. A maior eficiência de expressão provavelmente será acompanhada de um maior título de anticorpos neutralizantes, aumentando o potencial da vacina otimizada com relação ao número de doses e concentração de DNA em cada dose. Apesar do vetor p43.2 ter sido otimizado para a expressão em células eucarióticas (através da combinação de promotores específicos, fatores transcricionais, seqüências sinais para poli-adenilação, marcas de resistência, etc.), algumas seqüências de DNA contidas no mesmo (como por exemplo a que codifica para a marca de resistência a ampicilina) não são permitidas pela “Food and Drug Administration-FDA” para uso em humanos. Por outro lado outros vetores de expressão, como o vetor 8L por exemplo, não apresentam estas seqüências indesejáveis e portanto não são restringidos pela FDA. Desta forma, os antígenos E-LAMP_{OPT1-2} foram ainda clonados no vetor 8L gerando as construções p8L/E-LAMP_{OPT1-2} que serão avaliadas inicialmente em camundongos, e posteriormente em macacos.

EXEMPLO 1: Construção dos vetores de transfecção: p43.2-PreM/M-E (p/YFE) e p43.2-PreM/M-E-LAMP (pL/YFE);

1.1-Amplificação e purificação dos produtos de PCR

[0046] A seqüência PreM/M-E do VFA, incluindo a seqüência carboxi-terminal do capsídeo (responsável pela translocação de PreM/M para o retículo endoplasmático) foi amplificada por PCR, a partir de um plasmídeo contendo todo o genoma do VFA [clone infeccioso gentilmente cedido pelo Dr. Ricardo Galler (Biomanguinhos-IOC/FIOCRUZ)]. PreM/M-E foi

amplificada com dois pares distintos de primers visando a obtenção da sequência selvagem (estendendo desde o nucleotídeo 392 até o nucleotídeo 2452 do genoma da Febre Amarela, com base na sequência de número de acesso NC 002031 no Genbank – NCBI), assim como de uma sequência de fusão incorporando LAMP na região carboxi-terminal (estendendo desde o nucleotídeo 392 até o nucleotídeo 2323 do genoma da Febre Amarela, com base na sequência de número de acesso NC 002031 no Genbank – NCBI). A sequência C-terminal de LAMP foi amplificada a partir de um plasmídeo contendo as regiões N-terminal e C-terminal de LAMP-1 humano, p43.2 hLAMP/GAG [gentilmente cedido pelo Dr. Ernesto Marques (LaViTE-CPqAM/FIOCRUZ)]. Foram utilizados primers específicos que permitiram a incorporação de: sítios específicos de restrição, códon ATG de iniciação da tradução (em contexto com a sequência Kozak) e códon de terminação da tradução (ver tabela 1). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 50µL contendo: 1X tampão Tgo (Roche®); 0.2mM de dNTP (Invitrogen®); 0.6µM de cada primer; 1 unidade da enzima Tgo DNA polimerase (Roche®); 10ng de DNA molde. As amostras foram amplificadas em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®) programado nas seguintes condições: 1- 94°C por 2 minutos (desnaturação); 2- [94°C por 1 minuto (desnaturação); 55°C por 30 segundos (anelamento); 68°C por 75 segundos (extensão) – 30 ciclos (amplificação)]; 3- 68°C por 10 minutos (extensão e finalização dos fragmentos incompletos). Os produtos de PCR foram migrados em gel de agarose para posterior purificação utilizando o kit comercial QIAEX II (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante.

1.2-Clonagem dos produtos de PCR em vetor de replicação

[0047] Os produtos purificados de PCR foram em seguida submetidos a tratamento com a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®), para a adição de adeninas livres em suas extremidades. Esta reação foi

realizada em um volume final de 10µL contendo: 1X tampão Taq polimerase (Invitrogen®); 1.5mM MgCl₂; 2mM dATP (Invitrogen®); 5 unidades Taq DNA polimerase (Invitrogen®); 5µL do produto de PCR purificado. As amostras foram incubadas a 72°C, durante 20 minutos, em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®). Após tratamento com Taq DNA polimerase (Invitrogen®), os produtos adenilados de PCR foram utilizados para clonagem no vetor pGEMT-Easy (Promega®). As reações de ligação foram realizadas utilizando o kit pGEMT-Easy vector system I (Promega®), em um volume final de 10µL contendo: 1X tampão “Rapid Ligation”; 50ng do vetor pGEMT-Easy; 0.4 unidades de T4 DNA ligase; 2µL dos produtos de PCR tratados. A reação de ligação foi realizada a 4°C, durante aproximadamente 15 horas. As ligações foram em seguida utilizadas para a transformação de células competentes, visando a confirmação das clonagens. As transformações foram realizadas em um volume final de 80µL contendo: 50µL de células competentes (Escherichia coli TG1); 25µL de tampão de transformação (5mM MgCl₂; 5mM Tris-HCl pH 7.4); 5µL de cada produto de ligação. As reações de transformação foram incubadas durante 30 minutos, no gelo, sendo em seguida submetidas a choque térmico (37°C - 5 minutos) e esfriadas novamente no gelo. As células foram semeadas em placa com meio sólido de cultura Luria-Bertani (LB), contendo ampicilina na concentração de 50µg/mL e IPTG/X-Gal (10mM de IPTG; 0.1mg X-Gal). As placas foram incubadas, durante aproximadamente 15 horas a 37°C, e em seguida incubadas a 4°C durante 1 hora para facilitar a discriminação entre clones vazios (azuis) e clones contendo inserto (brancos).

1.3-Preparação de DNA plasmidial

[0048] Visando a confirmação das clonagens foram selecionadas colônias brancas, provenientes de cada ligação, para preparação de DNA plasmidial e prova de digestão. As colônias foram inoculadas em 2mL de meio LB líquido, contendo ampicilina (50µg/mL), e crescidas durante

aproximadamente 15 horas a 37°C. Em seguida 1.5 mL de cada cultura foi centrifugado (13.200 RPM - 5 minutos), para a obtenção de sedimento bacteriano. A partir destes “pellets” foi realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep spin miniprep (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Os DNAs plasmidiais, 50µL cada, foram em seguida utilizados para a confirmação das clonagens através de provas de digestão. As reações de digestão foram realizadas em um volume final de 10µL contendo: 1X tampão de digestão; 1.5µL de DNA plasmidial. Todas as digestões foram realizadas a 37°C, durante aproximadamente 4 horas. O vetor pGEMT-Easy contendo o fragmento PreM/M-E foi digerido com 0.01 unidades da enzima XhoI e 0.01 unidades da enzima NotI. O vetor pGEMT-Easy contendo a mesma seqüência, porém com sítio de restrição diferente que permite a posterior inserção de LAMP, foi digerido com 0.005 unidades da enzima NheI e 0.01 unidades da enzima XhoI. Já o vetor pGEMT-Easy contendo o fragmento C-LAMP foi digerido com 0.01 unidades da enzima XhoI e 0.01 unidades da enzima XbaI. A partir dos resultados das digestões, verificados em gel de agarose, clones positivos de cada construção foram digeridos em larga escala para posterior purificação dos fragmentos. As reações de digestão em larga escala foram realizadas em um volume final de 50µL contendo: 1X tampão de digestão; 15µL de DNA plasmidial. Todas as digestões foram realizadas a 37°C, durante aproximadamente 4 horas. O vetor pGEMT-Easy contendo o fragmento PreM/M-E foi digerido com 0.1 unidades da enzima XhoI e 0.05 unidades da enzima NotI. O vetor pGEMT-Easy contendo o fragmento PreM/M-E para fusão com LAMP foi digerido com 0.05 unidades da enzima NheI e 0.1 unidades da enzima XhoI e o vetor pGEMT-Easy contendo o fragmento C-LAMP foi digerido com 0.1 unidades da enzima XhoI e 0.1 unidades da enzima XbaI. Em seguida cada fragmento foi purificado através de extração de gel de agarose, utilizando o kit QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen®).

1.4-Subclonagens PreM/M-E selvagem e PreM/M-E-LAMP no vetor p43.2

[0049] O vetor p43.2 foi submetido a reações de digestões para criar sítios de restrição, compatíveis com os sítios dos fragmentos PreM/M-E selvagem e PreM/M-E para a fusão com LAMP. As reações de digestão foram realizadas em duas etapas, primeiro com uma enzima e depois com outra. Para a clonagem de PreM/M-E selvagem (p/YFE) a primeira reação de digestão foi realizada em um volume final de 50µL contendo: 1X tampão de digestão; 15µL da amostra do vetor e 0.05U da enzima NotI (Biolabs®). A digestão foi realizada a 37°C, durante aproximadamente 4 horas. Depois da digestão verificou-se se ocorreu a linearização do vetor através da comparação de tamanho entre a amostra digerida e o vetor intacto, ambos migrados sob as mesmas condições em gel de agarose. Verificada a linearização, a amostra foi precipitada com etanol e ressuspensa em um volume final de 40µL. A segunda reação de digestão foi realizada em um volume final de 50µL contendo: 1X tampão de digestão; 40µL da amostra do vetor e 0.1 unidades da enzima XhoI. Já para a clonagem de PreM/M-E para a fusão com LAMP, o vetor p43.2 foi submetido a um esquema de digestão bastante similar ao do utilizado para a clonagem do fragmento selvagem, sendo que utilizando as enzimas NheI e XhoI. As digestões foram realizadas a 37°C, durante aproximadamente 6 horas. As reações de ligação de ambos os fragmentos, ao vetor p43.2, foram realizadas em um volume final de 10µL contendo: 1X tampão T4 DNA Ligase (New England Biolabs®); 100ng de vetor p43.2 (clivado com XhoI/NotI ou NheI/XhoI); 0.4 unidades de T4 DNA ligase (New England Biolabs®); 3µL de cada fragmento purificado. As reações de ligação foram realizadas a 16°C, durante aproximadamente 20 horas. As ligações foram em seguida utilizadas para a transformação de células competentes, visando a confirmação da clonagem. Os procedimentos de transformação, preparação de DNA plasmidial e digestão foram os mesmos descritos anteriormente. Finalmente para a inserção do fragmento C-

terminal de LAMP (C-LAMP), no vetor p43.2-PreM/M-E para a fusão com LAMP, tanto o vetor como o fragmento C-LAMP foram digeridos com as enzimas XhoI e XbaI (para a obtenção da construção pL/YFE).

1.5-Sequenciamento de DNA

[0050] As construções p/YFE e pL/YFE foram submetidas ao sequenciamento automático para a certificação da identidade/qualidade das seqüências clonadas. A reação de sequenciamento foi realizada em um volume final de 10µL contendo: 1X tampão “Save money” (200mM Tris-HCl/pH 9.0, 5mM MgCl₂); 0.32µM de cada primer (de um total de 6 primers internos); 0.5µL de solução “Bigdye” (Applied Biosystems®); 200ng de DNA. As amostras foram incubadas a 95°C durante 5 minutos, em um termociclador Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems®), para desnaturação. Em seguida estas amostras foram submetidas aos seguintes ciclos de PCR para sequenciamento: 1- 94°C por 2 minutos (desnaturação inicial); 2- [94°C por 15 segundos (desnaturação); 50°C por 10 segundos (anelamento); 60°C por 4 minutos (extensão) – 45 ciclos]. As amostras foram precipitadas em isopropanol 65%, lavadas com etanol 60% e ressuspensas em 15µL de formamida (Applied Biosystems®). As amostras foram sequenciadas no Núcleo Integrado de Tecnologia (NIT) do CPqAM, utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões previamente estabelecidos nesta unidade.

EXEMPLO 2: Cultivo, infecção e transfecção de células eucarióticas

[0051] Células eucarióticas 293 foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen®) acrescido de: 10% soro bovino fetal (Gibco®); 1% penicilina/estreptomicina (Gibco®); 1% L-glutamina (Sigma®). Estas células foram utilizadas tanto para ensaios de infecção viral, como para os experimentos de transfecção. Após atingirem uma confluência de aproximadamente 90%, as células foram infectadas com um extrato viral de

VFA na concentração de 0.36×10^6 Unidades Formadoras de Placa - PFU gentilmente cedido pela Dra. Marli Tenório (CPqAM/LaViTE). Para a infecção, as células foram inicialmente incubadas com o extrato VFA puro (1 hora /37°C /5% de CO₂), sendo acrescido em seguida meio DMEM completo para a manutenção celular. As células infectadas permaneceram nas mesmas condições de incubação (37°C/5% de CO₂), durante 48 horas, até apresentarem os efeitos citopatológicos provocados pelo vírus. Para os ensaios de transfecção, as células 293 foram crescidas nas mesmas condições supracitadas. Em seguida foram incubadas com 0.8µg de cada DNA (p/YFE e pL/YFE), utilizando como controle negativo o p43.2 vazio e como controle positivo o gene repórter da β-galactosidase. As reações de transfecção foram realizadas utilizando o kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante. As células transfectadas foram incubadas (48 horas /37°C/5% de CO₂) e processadas para a avaliação da eficiência de transfecção, pela atividade de expressão do gene repórter. Para a reação de coloração do β-gal, as células foram inicialmente lavadas em 1X PBS e fixadas em solução 0.2% glutaraldeído/PBS. Em seguida as células fixadas foram incubadas em um volume final de 1mL de uma solução contendo: 20mg de X-Gal; 0.005M de ferriclamida de potássio; 0.005M de ferrociamida de potássio; 0.002M de MgCl₂ em 1X PBS, para o desenvolvimento de coloração pela atividade de β-gal.

EXEMPLO 3: Transfecção e análise de expressão por imunofluorescência.

[0052] Células 293 foram cultivadas em lamínulas e transfectadas com as construções vacinais obtidas, utilizando o kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies®). O vetor p43.2 vazio foi utilizado como controle negativo. As transfecções foram realizadas em placas de cultura de 24 poços com 2.5µg de cada plasmídeo e 10µl de lipofectamina, de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas 48 horas e em seguida fixadas em 100% metanol a -20°C durante 5 minutos, bloqueadas em

solução 1% BSA/PBS por 30 minutos, e incubadas com o anticorpo policlonal anti-Febre Amarela (produzido em camundongos, no biotério do CPqAM) na diluição de 1:200. Foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa 488, produzido em cabra, na diluição de 1:500 (Molecular Probes, Seattle, USA). Em seguida as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando o meio “ProLong gold” (Molecular Probes, Seattle, USA) e observada ao microscópio confocal. As imagens foram obtidas ao microscópio confocal Leica SPII-AOBS (Leica Microsystem, Hm®), utilizando a objetiva 63 X NA 1.3 mergulhada em óleo de imersão. O fluorocromo Alexa 488 foi excitado utilizando o laser ArKr no comprimento de onda de 488nm e a imagem digital capturada utilizando o software Leica, no formato RGB de 24 bit, numa área de 1024 X 1024 pixels. Os campos de captura foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia das células.

EXEMPLO 4: Avaliação da resposta imune induzida em camundongos imunizados com as vacinas p/YFE e pL/YFE

4.1-Obtenção dos vetores vacinais em larga escala

[0053] As construções codificando a proteínas virais E selvagem (p/YFE) e proteína E fusionada a Proteína de Associação a Membrana Lisossomal - LAMP (pL/YFE), foram submetidas à preparação de DNA plasmidial em larga escala. Alíquotas de cada DNA foram utilizadas para transformar células competentes (E.coli TG1). Em seguida, uma colônia isolada de cada placa foi escolhida para ser inoculada em 12ml de meio LB líquido, contendo ampicilina (50µg/ml), e crescidas por aproximadamente 8 horas a 37°C sob vigorosa agitação. Após este tempo, cada cultura foi inoculada em 2.5 litros de meio LB/ampicilina e crescida a 37°C por 16 horas sob vigorosa agitação. Em seguida, a cultura foi centrifugada (8.000 RPM – 15 minutos) para a obtenção do sedimento bacteriano. A partir deste “pellet”, foi realizada a extração do DNA plasmidial (em condições livre de

endotoxinas) utilizando o kit comercial Endofree Plasmid Giga Kit (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante. Os DNAs plasmidiais foram submetidos a provas de digestão em um volume final de 10µL contendo: 1X tampão de digestão, 1µL de cada DNA plasmidial e enzimas de restrição específicas. As digestões foram realizadas a 37°C, durante aproximadamente 4 horas.

4.2-Animais e protocolos de imunização

[0054] Para testes de neutralização e proteção, camundongos fêmeas BALB/c e C57B1/6 com 3 semanas de vida foram imunizados nos dias 0, 30 e 45. Um dia antes de cada imunização foram coletadas amostras de soro de cada animal. Os camundongos foram imunizados na base da cauda com a vacina do vírus atenuado 17DD à 10^4 PFU/50µl (controle positivo), vacinas de DNA p/YFE e pL/YFE (ambas na concentração de 50µg/50µl), assim como com o vetor vazio e PBS (controles negativos). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as exigências do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA), de acordo com o protocolo P-0259-05 aprovado por esta comissão.

4.3-Testes de neutralização em placa

[0055] Para a análise dos títulos de anticorpos neutralizantes induzidos, pelas vacinações com 17DD e com as construções p/YFE e pL/YFE, foram realizados ensaios de neutralização viral por redução de placas (PRNT). Estes ensaios foram realizados utilizando as amostras de soro dos camundongos Balb/c e C57B1/6 coletadas antes e depois das vacinações. Os testes de neutralização foram avaliados pela redução da formação de placas do vírus da Febre Amarela, cultivados em células Vero. Após a inativação do soro (30 min/56°C), diluições seriadas do soro foram incubadas com 50-100 PFU de vírus por 30 min a 37°C, e adicionadas em placas de 6 poços contendo células Vero. Após 1 hora de incubação, o inóculo foi removido e adicionado meio semi-sólido contendo agarose. Após uma

incubação de 8 dias as placas foram fixadas, e a formação de placas virais foi detectada através de ensaio com imuno-peroxidase. O teste de neutralização por redução de placas foi definido pela diluição na qual o número de placas foi reduzido em 50%, PRNT50, quando comparado com o controle.

4.4-Ensaio de avaliação de proteção

[0056] Camundongos Balb/c e C57Bl/6 imunizados 3 vezes com a vacina 17DD, ou com as vacinas de DNA, foram utilizados nos ensaios de proteção. Os animais foram desafiados através de inóculo intracerebral, contendo 10.000 PFU do vírus 17DD, 15 dias após a última imunização. Os animais foram monitorados durante 21 dias para avaliação de sintomas de neurovirulência e mortalidade. Os animais moribundos foram sacrificados pela exposição a CO₂.

EXEMPLO 5: Otimização do vetor pL/YFE através do algoritmo genético.

[0057] Para melhorar a eficiência de expressão do antígeno codificado pela vacina pL/YFE em células eucarióticas, já visando experimentos futuros em modelos primatas, a sequência de DNA que codifica a proteína preM/M-Env foi otimizada utilizando o algoritmo genético. Esta sequência foi analisada/otimizada com relação a características como “codon usage”, estrutura secundária do RNA mensageiro (mRNA), distribuição do conteúdo de GC, motivos repetitivos de DNA, sítios de restrição, sítios críticos de “Splicing”, etc. A sequência otimizada foi subclonada no vetor 8L, gerando a construção p8L/YFEopt.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para gerar as construções vacinais p/YFE e pL/YFE

Sequência alvo	Primers utilizados (forward X reverse)
PreM/M-E selvagem	5' ACCGCTCGAGGCCACCATGGGAGGATTGTCCTCAAGGAAACG 3' (XhoI) (Met)
	5' ACCGGCGGCCGCTCAGTTCAAGCCGCCAAATAGCCCC 3' (NotI) (Stop)

PreM/M-E para LAMP	5' ACCGGCTAGCGCCACCATGGGAGGATTGTCCTCAAGGAAACG 3' (NheI) (Met)
	5' ACCGCTCGAGGTTCAAGCCGCCAAATAGCCCC 3' (XhoI)
LAMP (C-terminal)	5' ACCGCTCGAGACGCTGATCCCCATCGCTGTGG 3' (XhoI)
	5' ACCGTCTAGACTAGATAGTCTGGTAGCCTGCGTGACTCC 3' (XbaI) (Stop)

Tabela 2 - Resultados do teste de proteção em camundongos BALB/c e C57B1/6 comparando a vacina 17DD com a vacina de DNA pL/YFE.

Imunização/ Desafio (10 ⁵ PFU/vacina 17DD)	BALB/c Mortalidade (Mortos/Inoculados)	C57B1/6 Mortalidade (Mortos/Inoculados)
Vacina 17DD	0/10	0/10
pL/YFE	0/10	0/10
p43.2/vazio ou PBS	8/10	10/10

Tabela 3 - Comparação dos níveis de expressão das proteínas do envelope de Febre Amarela, selvagens e otimizadas, por citometria de fluxo.

Plasmídeo	Expressão normalizada pelo selvagem 2. (%)
1. p43.2/vazio	0.03
2.p43.2/ENV/c-LAMP/selvagem	100
3. p43.2/ENV/c-LAMP/OPT-GA	450
4. p43.2/ENV/c-LAMP/OPT-LT	465
5. p8L/LAMP/vazio	0.00
6. p8L/ENV/c-LAMP/OPT-GA	625
7. p8L/ENV/c-LAMP/OPT-LT	350

[0058] A vacina de vírus-atenuado 17DD é a única formulação disponível para proteger humanos contra a infecção causada pelo Vírus da

Febre Amarela (VFA), importante fonte de morbidade e mortalidade nas áreas tropicais do mundo. Apesar do sucesso da vacinação em massa com a vacina 17DD, que é capaz de induzir tanto resposta duradoura por anticorpos neutralizantes como resposta citotóxica por células T, casos graves adversos em consequência da vacinação contra a Febre Amarela vem sendo sistematicamente reportados na literatura. Em alguns casos a vacinação foi diretamente associada com o aumento da severidade sintomatológica, podendo até culminar com reações fatais. Diante deste cenário o desenvolvimento de nova estratégia de vacinação, como vacinas de DNA codificando seqüências virais específicas, é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias vacinais ainda mais seguras.

[0059] A vacina de DNA contra a Febre Amarela, de acordo com a presente invenção, está baseada na seqüência que codifica a proteína do envelope de VFA (p/YFE). Além da construção selvagem p/YFE, a seqüência E foi ainda fusionada à seqüência que codifica a Proteína de Associação à Membrana Lisossomal humana (h-LAMP) gerando a construção (pL/YFE). A fusão com LAMP tem como finalidade direcionar o antígeno para a via de degradação/apresentação antigênica MHCII, pois vários trabalhos vêm demonstrando que os antígenos fusionados ao LAMP (antígeno/LAMP) são capazes de gerar uma maior atividade proliferativa de linfócitos antígeno-específicos, altos títulos de anticorpos e intensa atividade T-citotóxica em relação aos antígenos selvagens não fusionados ao LAMP.

[0060] A presente invenção tem como finalidade otimizar a vacina de DNA contra VFA, p8L/YFEopt, para torná-la capaz de proteger humanos contra a infecção causada por VFA. O desenvolvimento deste tipo de tecnologia tem como finalidade gerar uma vacina ainda mais segura que a vacina 17DD, que poderá revolucionar a estratégia de vacinação contra VFA no Brasil e no mundo. Finalmente, as estratégias utilizadas para a construção desta vacina de DNA poderão ainda servir de subsidio para o

desenvolvimento de outras vacinas virais, principalmente contra outros flavivirus como os vírus Encefalite Japonesa, Febre do Oeste do Nilo e Dengue.

REIVINDICAÇÃO

1. Vacina de DNA caracterizada pelo fato de que é capaz de efetuar a co-expressão da proteína Pre M/ME do vírus da febre amarela juntamente com a Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP, a associação proteína à membrana lisossomal, e apresentar as referidas proteínas antigênicas ao sistema imune via MHC II, onde a sequência Pre M/ME é unida ao domínio C-terminal de Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP e a referida vacina possui a SEQ ID NO: 8.

2. Vacina de DNA caracterizada pelo fato de que é capaz de efetuar a co-expressão da proteína Pre M/ME do vírus da febre amarela juntamente com Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP, a associação proteína à membrana lisossomal, e apresentar as referidas proteínas antigênicas ao sistema imune via MHC II, onde a sequência Pre M/ME é unida ao domínio C-terminal de Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP e a referida vacina possui a SEQ ID NO: 9.

3. Vacina de DNA caracterizada pelo fato de que é capaz de efetuar a co-expressão da proteína Pre M/ME do vírus da febre amarela juntamente com Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP, a associação proteína à membrana lisossomal, e apresentar as referidas proteínas antigênicas ao sistema imune via MHC II, onde a sequência Pre M/ME é unida ao domínio C-terminal de Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP e a referida vacina possui a SEQ ID NO: 10.

4. Vacina de DNA caracterizada pelo fato de que é capaz de efetuar a co-expressão da proteína Pre M/ME do vírus da febre amarela juntamente com Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP, a associação proteína à membrana lisossomal, e apresentar as referidas proteínas antigênicas ao sistema imune via MHC II, onde a sequência Pre M/ME é unida ao domínio C-terminal de Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP e a referida vacina possui a SEQ ID NO: 11.

5. Vacina de DNA caracterizada pelo fato de que é capaz de efetuar a co-expressão da proteína Pre M/ME do vírus da febre amarela juntamente com Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP, a associação proteína à membrana lisossomal, e apresentar as referidas proteínas antigênicas ao sistema imune via MHC II, onde a sequência Pre M/ME é unida ao domínio C-terminal de Proteína de Associação à Membrana Lisossomal - LAMP e a referida vacina possui a SEQ ID NO: 12.

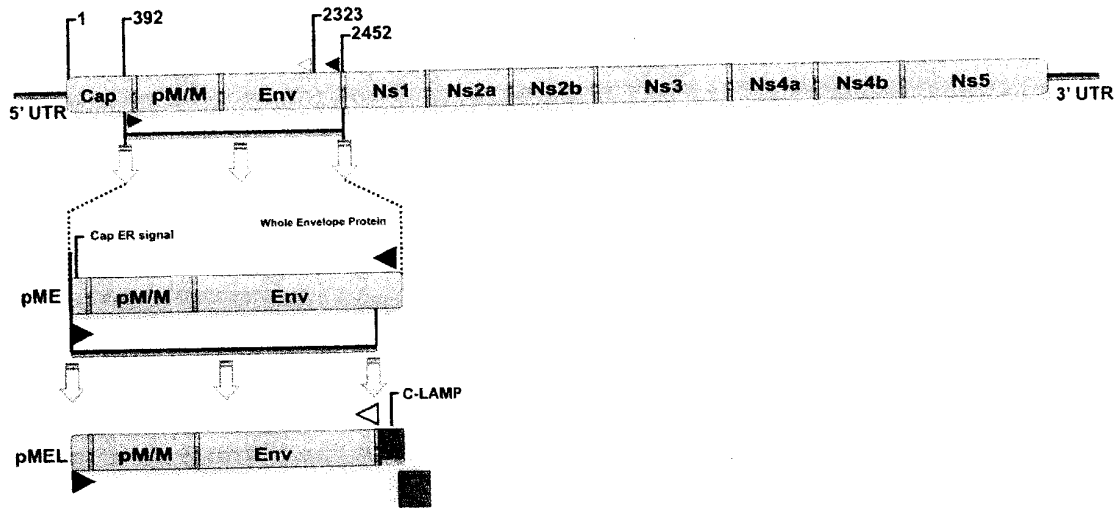


Figura 1.

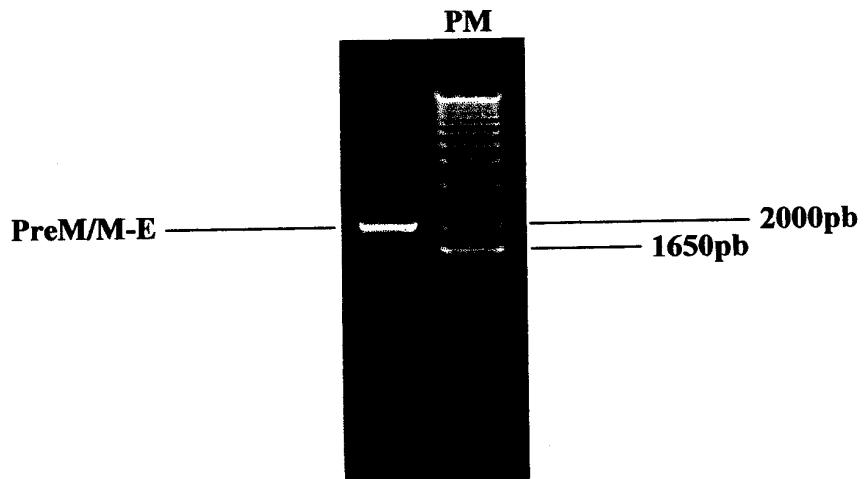


Figura 2

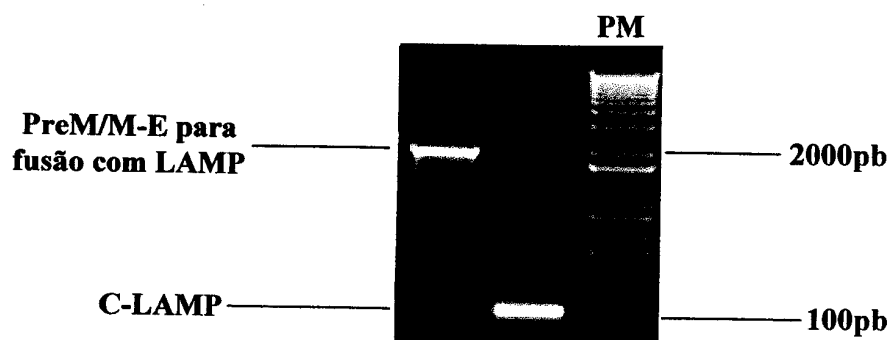


Figura 3

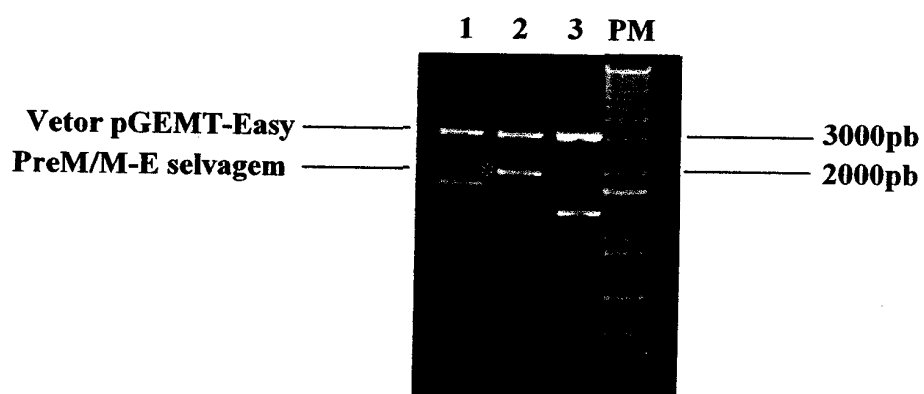


Figura 4

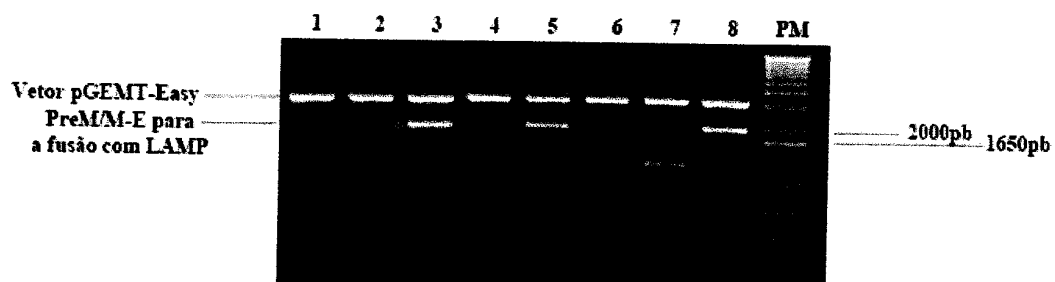


Figura 5

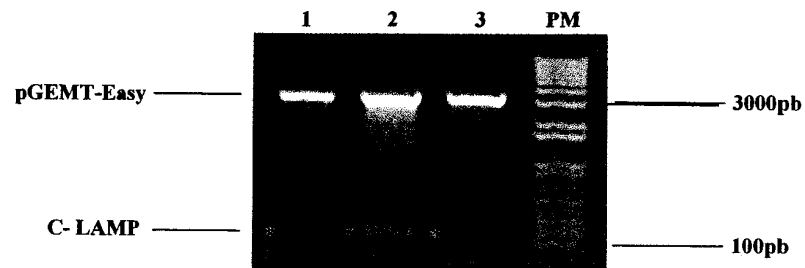


Figura 6

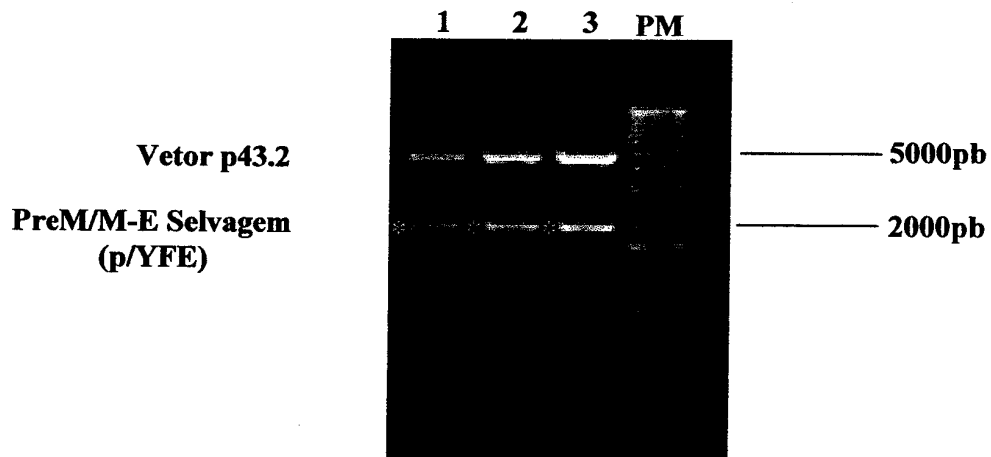


Figura 7

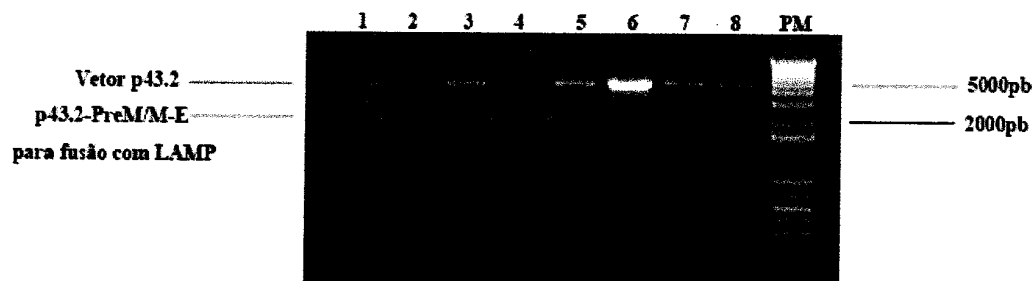


Figura 8

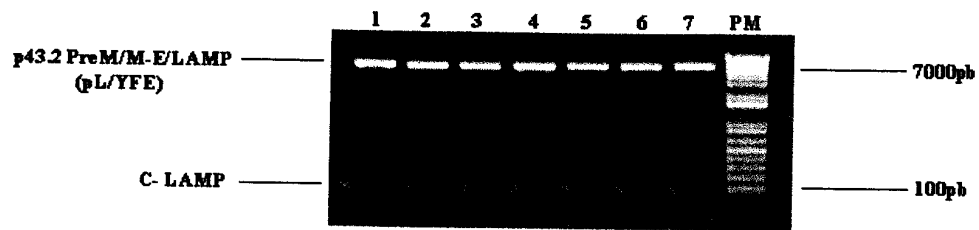


Figura 9

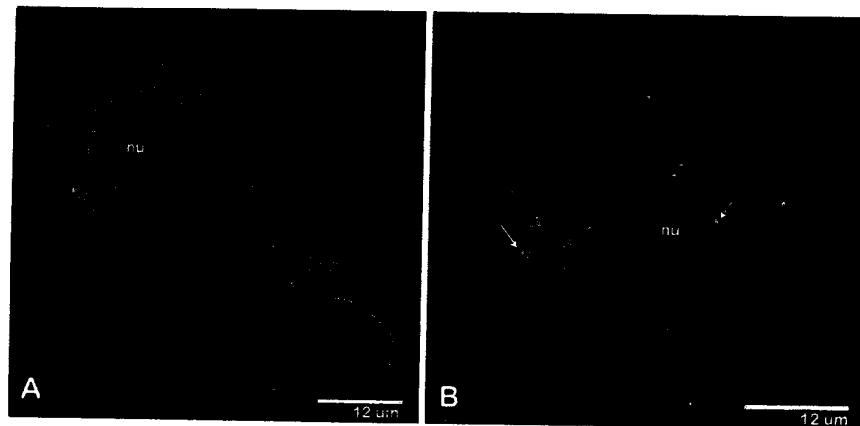


Figura 10

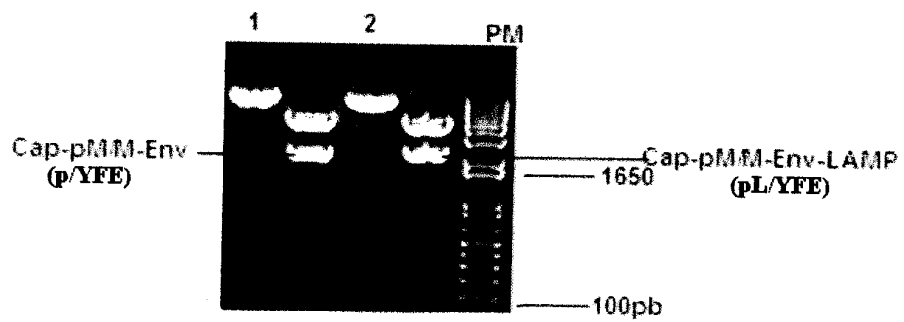
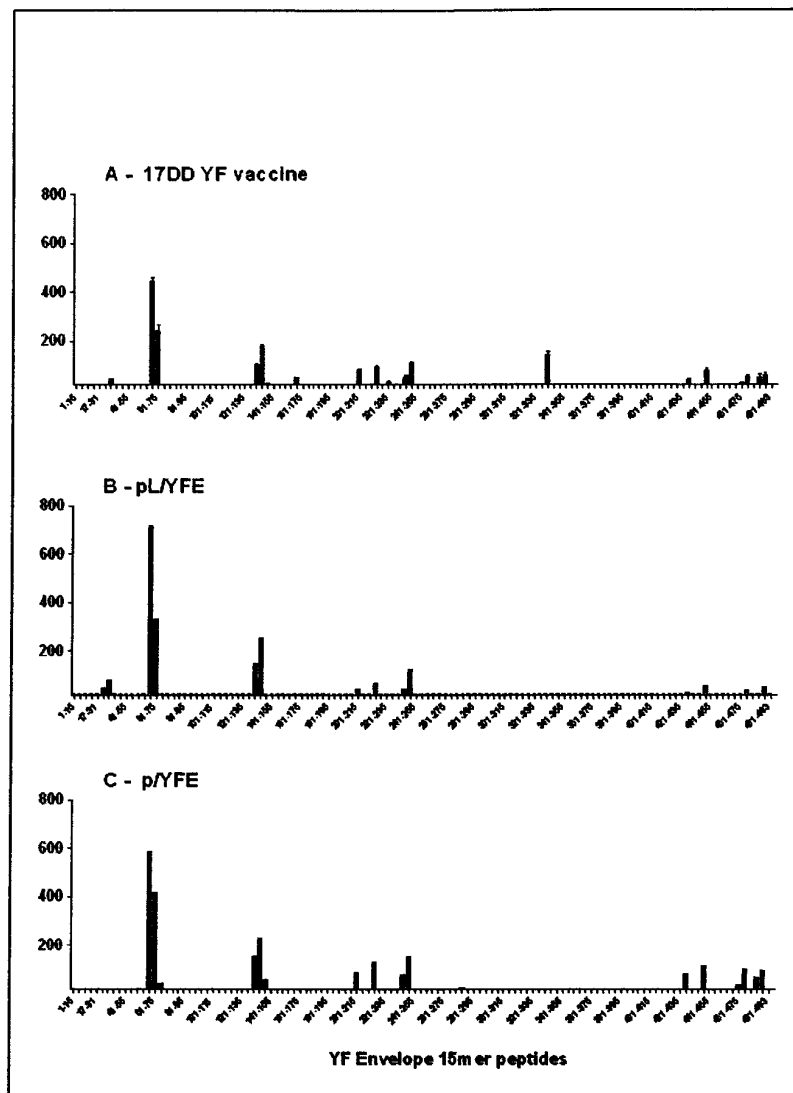


Figura 11

**Figura 12**

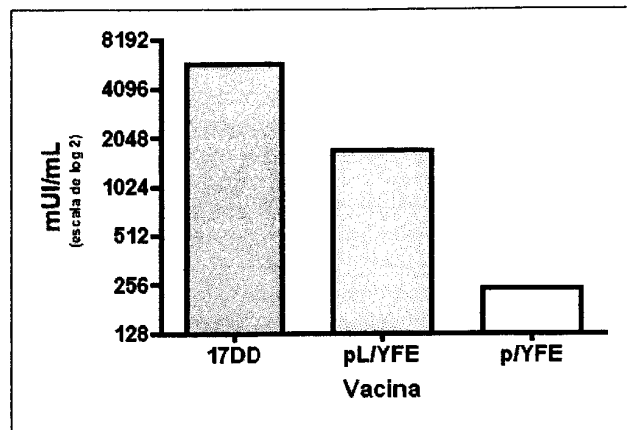


Figura 13

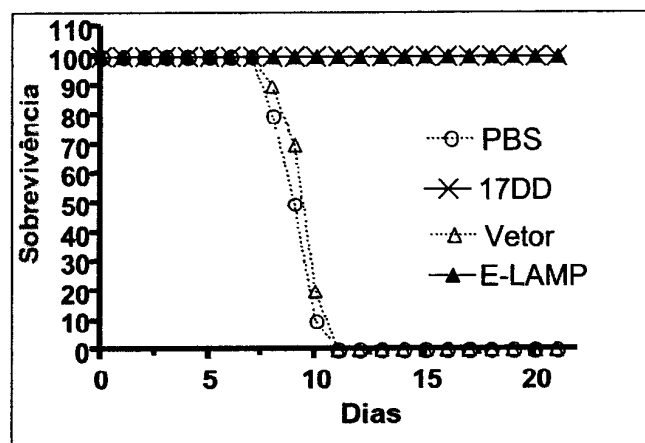


Figura 14