



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

(11) PI 1009616-7 B1



(22) Data do Depósito: 08/06/2010

(45) Data de Concessão: 11/05/2021

(54) Título: PLATAFORMA DE IMUNIZAÇÃO PARA USO EM UMA ESTRATÉGIA DE IMUNIZAÇÃO PRIME-BOOST E KIT

(51) Int.Cl.: A61K 39/205; A61P 31/14; A61P 37/04.

(30) Prioridade Unionista: 08/06/2009 US 61/184,959.

(73) Titular(es): THE UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO.

(72) Inventor(es): CHIL-YOUNG KANG; GYUONG NYOUN KIM.

(86) Pedido PCT: PCT CA2010000874 de 08/06/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/142030 de 16/12/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/12/2011

(57) Resumo: DIFERENTES SOROTIPOS DE VIRUS DA ESTOMATITE VESICULAR COMO VETORES DE EXPRESSÃO PARA REGIMES DE IMUNIZAÇÃO. Plataformas de imunização, regimes de vacinação e medicamentos úteis para induzir uma resposta imune em um mamífero e prevenir ou tratar uma infecção patogênica em um mamífero, em que as ditas plataformas de imunização e medicamentos constituem um vírus recombinante da estomatite vesicular (VSV) de um sorotipo e um rVSV de outro sorotipo e são utilizados em regime de imunização primeboost. Em aspectos da invenção um sorotipo VSV é Indiana e o outro sorotipo VSV é New Jersey.

“PLATAFORMA DE IMUNIZAÇÃO PARA USO EM UMA ESTRATÉGIA DE IMUNIZAÇÃO PRIME-BOOST E KIT”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma plataforma inovadora de vacinas ou de composições imunogênicas compreendendo dois sorotipos diferentes de vírus recombinantes de estomatite vesicular e ao uso da nova plataforma em composições e métodos para regimes de vacinação profiláticos e terapêuticos contra patógenos humanos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Ao longo deste pedido, várias referências são citadas entre colchetes para descrever mais amplamente o estado da técnica a que pertence esta invenção. A divulgação dessas referências é incorporada como referenda aqui na presente descrição.

A melhor maneira de preparar CD8+CTL e sintetizar os antígenos alvo por transsecção de DNA ou infecção utilizando de vetores virais ou bacterianos. Os requisitos como vetores de vacina viral são uma ampla gama de hospedeiros e boa expressão do gene de interesse.

O vírus da estomatite vesicular (VSV) infecta a maioria das células de mamíferos e expressa proteínas virais em até 60% das proteínas totais, em células infectadas (KIM, G. N., and C. Y. KANG. *Virology* 357:41, 2007). Na natureza, o VSV infecta porcos, gado e cavalos, e causa a doença vesicular em torno da boca e da pata. Embora a infecção humana pelo VSV tenha sido relatada, o VSV não causa sintomas graves (FIELDS, B. N., and K. HAWKINS. *N Engl J Med* 277:989, 1967; JOHNSON, K. M. *et al.*, *Am J Trop Med Hyg* 15:244, 1966).

O VSV é um vírus do RNA de fita negativa que codifica cinco proteínas, a proteína de nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), matriz proteica (M), glicoproteína de superfície (G), e RNA polimerase dependente de RNA (L). As proteínas N, P e L do VSV são requeridas

para a síntese de RNAs e mRNAs genômicos de sentido positivo e sentido negativo, que são necessários para a síntese de proteínas VSV, bem como genes de interesse, como proteínas do vírus da hepatite C (HCV) humano.

5 Desde o desenvolvimento do sistema de genética reversa do VSV (LAWSON, N. D., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92:4477, 1995; WHELAN, S. P. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92:8388, 1995) para gerar VSVs recombinantes de cDNA, o VSV tem sido estudado como um
10 vetor de vacina viral para a imunização de vários agentes patogênicos (BRANDSMA, J. L., *et al.*, *J Virol* 81:5749, 2007; DADDARIO-DICAPRIO, K. M., *et al.*, *J Virol* 80:9659, 2006; KOHL, W., *et al.*, *J Gen Virol* 88:157, 2007; KUATE, S., *et al.*, *Virology* 362:26, 2007; PALIN, A., *et al.*, *Vaccine* 25:741, 2007; SCHWARTZ, J. A., *et al.*, *Virology* 366:166, 2007).

Embora o VSV seja um vírus de rápida replicação,
15 eventualmente, respostas imune, humoral e celular, contra o VSV serão produzidas no animal hospedeiro, como quaisquer outros vetores virais (YEWDELL, J. W. *et al.*, *J Exp Med* 163:1529-1938, 1986; PUDDINGTON, L. *et al.*, *J Virol* 60:708-717, 1986; KALINKE, U. *et al.*, *Immunity* 5:639-652, 1996). Animais infectados com VSV desenvolvem
20 respostas imunes em uma ou duas semanas, incluindo um anticorpo neutralizante (KALINKE, U. *et al.*, *Immunity* 5:639-652, 1996), o que dificulta a eficácia da imunização para a vacinação com o mesmo vetor. O VSV é neutralizado por anticorpos sorotipo-específicos contra a glicoproteína G da superfície viral. Dois sorotipos diferentes de VSV,
25 VSV-Indiana (VSV_{Ind}) e VSV-New Jersey (VSV_{NJ}) mostram 50% de identidade de aminoácido na glicoproteína (GALLIONE, C. J., and ROSE, J. K. J. *J Virol* 46:162-169, 1983). Anticorpos produzidos contra um sorotipo de VSV não neutralizam os outros sorotipos de VSV (CARTWRIGHT, B., and BROWN, F. J. *Gen. Virol.* 16:391-398, 1972),

por isso outros autores utilizaram o VSV_{Ind} como um vetor de vacina em que a glicoproteína foi substituída pelo vetor de VSV_{NJ} para minimizar os problemas decorrentes da presente resposta imune contra os vetores virais [ROSE, N. F. *et al.*, *J. Virol.* 74:10903-10910, 2000; ROSE, N. F. *et al.*, *Cell* 106:539-549, 2001].

Embora o VSV_{Ind} com proteína G do sorotipo de VSV_{NJ} seja útil para evadir da resposta imune humoral, não vai impedir a resposta imune celular que pode ser desencadeada por outras proteínas VSV incluindo as proteínas N, P, M e L. As respostas imunes celulares contra proteínas VSV, excluída a proteína G, podem resultar em incompletas respostas imunes contra o antígeno de interesse. Portanto, a geração de VSV recombinante adicional a partir de outro sorotipo pode aumentar a eficácia do uso do VSV como um vetor vivo de vacina viral.

Curiosamente, foi sugerido anteriormente que a geração de um completo vetor do sorotipo [γ]VSV_{NJ} não foi tentada devido ao potencial de respostas de reação cruzada de linfócitos T citotóxicos entre os sorotipos Indiana e New Jersey (CLARKE, *et al.*, *Springer Semin Immun* 28:239, 2006).

Tendo em vista o contexto acima, seria vantajoso prover uma abordagem para a imunoprevenção e imunoterapia utilizando ambos os sistemas imunes, celular e humoral. Como tal, o Depositante desenvolveu um sistema que compreende uma combinação de vacinas que provoca uma resposta contra agentes infecciosos.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Em um aspecto a presente invenção fornece uma plataforma de imunização para o uso em uma estratégia de imunização *prime-boost* caracterizada pelo fato da referida plataforma de imunização compreender: (a) uma vacina ou composição imunogênica

contendo um vírus recombinante de estomatite vesicular (rVSV) de um sorotipo, e (b) outra vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV de outro sorotipo.

5 Em um aspecto da presente invenção a plataforma de imunização é caracterizada pelo fato de que um sorotipo é Indiana e o outro sorotipo é New Jersey.

Em outro aspecto da presente invenção a plataforma de imunização é caracterizada por cada um dos dois sorotipos rVSV incluírem um gene mutante de matriz protéica (M).

10 Em outro aspecto da presente invenção a plataforma de imunização é caracterizada pelo fato de um sorotipo incluir um gene de glicoproteína (G) de superfície do outro sorotipo.

Em outro aspecto da presente invenção a plataforma de imunização é caracterizada por os dois sorotipos rVSV serem capazes de
15 expressar uma ou mais proteínas de interesse.

Em outro aspecto da presente invenção a plataforma de imunização é caracterizada pelo fato dos dois sorotipos rVSV serem capazes de expressar uma ou mais proteínas do vírus da hepatite C (HCV).

20 Em outro aspecto a presente invenção proporciona um regime de imunização caracterizado pelo fato do mencionado regime de imunização compreender a administração a um indivíduo de uma dose *prime* (inicial de preparação) de uma vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV de um primeiro sorotipo, seguido por uma
25 dose *boost* (dose secundária) de uma vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV do segundo sorotipo.

Em um aspecto, o regime de imunização é caracterizado pelo fato da dose *boost* ser seguida por pelo menos mais uma dose da

vacina ou composição imunogênica compreendendo o rVSV do primeiro sorotipo.

Em outro aspecto o regime de imunização é caracterizado pelo fato do primeiro sorotipo ser Indiana e o segundo New Jersey.

5 Em outro aspecto o regime de imunização é caracterizado pelo fato do primeiro sorotipo ser New Jersey e o segundo sorotipo Indiana.

10 Em outro aspecto o regime de imunização é caracterizado pelo fato do primeiro e o segundo sorotipos rVSV incluírem um gene mutante M.

Em outro aspecto o regime de imunização é caracterizado pelo fato do segundo sorotipo rVSV incluir o gene G do primeiro sorotipo rVSV.

15 Em outro aspecto o regime de imunização é caracterizado pelo fato do primeiro e o segundo sorotipos rVSV serem capazes de expressar uma ou mais proteínas de interesse.

20 Em outro aspecto o regime de imunização é caracterizado pelo fato de as referidas uma ou mais proteínas de interesse serem uma ou mais proteínas de um vírus exógeno selecionado do grupo composto por: HCV, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus do Nilo Ocidental, Hantavirose, vírus Influenza, vírus Ebola, vírus da Dengue de febre hemorrágica, vírus da encefalite japonesa, SARS Coronavírus.

25 Em outro aspecto o regime de imunização é caracterizado pelo fato do primeiro e o segundo sorotipos rVSV serem capazes de expressar uma ou mais proteínas de HCV.

Em outro aspecto o regime de imunização é caracterizado pelo fato do primeiro sorotipo ser Indiana e o segundo sorotipo ser New Jersey, onde tanto o rVSV Indiana como o rVSV New Jersey incluírem um gene mutante M, e em que o rVSV Indiana e o rVSV New Jersey

serem capazes de expressar uma ou mais proteínas de um vírus exógeno.

Em outro aspecto, ainda, a presente invenção fornece um método para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV
5 caracterizado pelo fato do mencionado método compreender as seguintes etapas: (a) administrar ao mamífero uma quantidade eficaz de uma primeira vacina ou composição imunogênica, em que a referida primeira vacina ou composição imunogênica compreenda um rVSV de um primeiro sorotipo, e (b) administrar ao indivíduo uma quantidade
10 efetiva de uma segunda vacina ou composição imunogênica, em que a referida segunda vacina ou composição imunogênica compreenda um rVSV de um segundo sorotipo.

Em um aspecto o método da presente invenção para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV é caracterizado pelo
15 fato do mencionado método ainda compreender: (c) administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz da primeira vacina ou composição imunogênica.

Em outro aspecto o método da presente invenção para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV é caracterizado
20 pelo fato do primeiro sorotipo ser Indiana e o segundo sorotipo ser New Jersey.

Em outro aspecto o método da presente invenção para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV é caracterizado
25 pelo fato do primeiro sorotipo ser New Jersey e o segundo sorotipo ser Indiana.

Em outro aspecto o método da presente invenção para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV é caracterizado pelo fato do primeiro e o segundo sorotipos rVSV incluírem um gene mutante M.

Em outro aspecto o método da presente invenção para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV é caracterizado pelo fato do segundo sorotipo rVSV incluir o gene G do primeiro sorotipo rVSV.

5 Em outro aspecto o método da presente invenção para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV é caracterizado pelo fato da resposta imune incluir uma resposta imune humoral e/ou celular.

10 Em outro aspecto o método da presente invenção para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV é caracterizado pelo fato do primeiro e segundo sorotipos rVSV serem capazes de produzir partículas do tipo vírus tendo a capacidade de provocar uma resposta imune mediada por células e/ou humoral.

15 Em outro aspecto o método da presente invenção para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV é caracterizado pelo fato do primeiro e o segundo sorotipos rVSV serem capazes de expressar uma ou mais proteínas de um vírus exógeno, e a dita resposta imune ainda compreender uma resposta imune para uma ou mais proteínas de vírus exógeno, onde o referido vírus exógeno é
20 selecionado do grupo composto por: HCV humano, HIV, vírus do Nilo Ocidental, Hantavirose, vírus Influenza, vírus Ebola, vírus da Dengue de febre hemorrágica, vírus da encefalite Japonesa, SARS Coronavírus.

25 Em outro aspecto o método da presente invenção para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV é caracterizado pelo fato do primeiro e o segundo sorotipos rVSV serem capazes de expressar uma ou mais proteínas de HCV, e a dita resposta imune ainda compreender uma resposta imune a uma ou mais proteínas de HCV.

Em mais um aspecto a presente invenção provê um medicamento combinado útil para induzir uma resposta imune contra um patógeno, caracterizado pelo fato do referido medicamento combinado compreender: (a) uma vacina ou composição imunogênica
5 contendo um rVSV de um sorotipo que seja capaz de expressar uma ou mais proteínas do patógeno, e (b) outra vacina ou composição imunogênica contendo um rVSV de outro sorotipo que seja capaz de expressar uma ou mais proteínas do patógeno.

Em um aspecto o medicamento combinado é caracterizado
10 por um sorotipo ser um rVSV Indiana e o outro um sorotipo rVSV New Jersey, onde o rVSV Indiana e o rVSV New Jersey incluem um gene mutante M.

Em mais um aspecto da presente invenção um método é fornecido para prevenir ou tratar uma infecção causada por um
15 patógeno, caracterizado por o referido método compreender: (a) administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de uma primeira vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV de um primeiro sorotipo capaz de expressar uma ou mais proteínas do patógeno, e (b) administrar ao indivíduo uma quantidade efetiva de uma
20 segunda vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV de um segundo sorotipo capaz de expressar uma ou mais proteínas do patógeno.

Em um aspecto o método da presente invenção para prevenir ou tratar uma infecção causada por um patógeno é
25 caracterizado pelo fato de o mencionado método compreender ainda: (c) administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz da primeira vacina ou composição imunogênica.

Em outro aspecto o método da presente invenção para prevenir ou tratar uma infecção causada por um patógeno é

caracterizado por o primeiro ser um sorotipo rVSV Indiana e o segundo um sorotipo rVSV New Jersey.

Em outro aspecto o método da presente invenção para prevenir ou tratar uma infecção causada por um patógeno é
5 caracterizado pelo fato de o primeiro ser um sorotipo rVSV New Jersey e o segundo um sorotipo rVSV Indiana.

Em um aspecto adicional a presente invenção provê um kit que inclui: (a) pelo menos uma dose de uma quantidade eficaz de uma vacina compreendendo um rVSV de um sorotipo, e (b) pelo menos uma
10 dose de uma quantidade eficaz de uma vacina compreendendo um rVSV de outro sorotipo.

Em um aspecto o kit da presente invenção é caracterizado por (a) e (b) serem formuladas em um veículo farmaceuticamente aceitável.

15 As vantagens da utilização do VSV e dois sorotipos do VSV como vetores da vacina incluem:

(1) A utilização de dois sorotipos de VSV faz o VSV um vetor de vacinas mais eficaz, pois um sorotipo de VSV (primeira vacina) não irá neutralizar o outro sorotipo VSV (segunda vacina) ou facilmente matar
20 as células infectadas com o outro sorotipo de VSV.

(2) O VSV não causa doenças graves em seres humanos e a maioria das pessoas infectadas são veterinários que lidam com os animais doentes ou cientistas que trabalham com o VSV. Portanto, a taxa de soropositivos em uma população humana, em geral, é muito baixa, o
25 que torna o VSV um atraente vetor de vacina.

(3) O VSV replica de uma forma auto-limitada em um indivíduo infectado, mas ainda provoca intensas respostas imunes celulares e humorais.

(4) O VSV replica bem na maioria das células de mamíferos em cultura e titulação viral de alto rendimento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

5 A presente invenção tornar-se-á mais plenamente entendida a partir da descrição detalhada aqui transmitida e das figuras que a acompanham, que são incluídas somente a título de ilustração e não limitam o escopo da invenção.

A figura 1 ilustra organização de genes do vírus da estomatite vesicular (VSV), cepa do sorotipo Indiana (Ind) resistente ao calor (HR) e do sorotipo New Jersey (NJ) cepa Hazlehurst (Haz).

A figura 2 ilustra um sistema de genética reversa para a recuperação de VSV de cDNA.

A figura 3 ilustra a cinética de crescimento do VSVs recombinantes sem o gene de interesse.

15 A figura 4 ilustra a expressão de proteínas VSV nas células de rim do hamster recém-nascido infectado com VSVs recombinantes.

A figura 5 apresenta respostas das células CD8+T de peptídeos específicos VSV em camundongos Balb/c recebendo um único vírus, com posologia de 3 vacinas VSV.

20 A figura 6 mostra respostas das células CD8+T de peptídeos específicos VSV em camundongos Balb/c recebendo em um regime de administração de vacinas sucessivas VSV na ordem: New Jersey-Indiana-New Jersey.

A figura 7 retrata respostas das células CD8+T de peptídeos específicos VSV em camundongos Balb/c recebendo em um regime de administração de vacinas sucessivas VSV na ordem de Indiana-New Jersey-Indiana.

A figura 8A mostra a comparação de respostas das células CD8+T de peptídeos específicos VSV em camundongos Balb/c recebendo um ou dois sorotipos de vacinas do VSV.

5 A figura 8B mostra a comparação da reativação de células CD8+T após estimulação *ex vivo* com peptídeos HCV classe I MHC em um coorte de camundongos (n = 2) vacinados com VSV_{Ind}-M(M51R) + HCV-CoreΔER, depois VSV_{NJ}-M(M48/51R) + HCV-CoreΔER, seguido três semanas mais tarde por uma dose adicional de VSV_{Ind}-M(M51R) + HCV-CoreΔER (conjunto de barras à direita do painel).

10 A figura 9 ilustra a clonagem de genes de HCV Core com ou sem mutações de deleção no clone de cDNA do VSV_{NJ}.

A figura 10 ilustra a clonagem de genes de HCV Core com ou sem mutações de deleção no clone de cDNA de VSV_{Ind}.

15 A figura 11 descreve a expressão de proteínas do HCV Core a partir do VSV_{NJ} recombinante do tipo selvagem M e mutante M (A). A expressão das proteínas VSV das mesmas células foi igualmente detectada (B). A expressão foi determinada pelo teste de Western blot usando anticorpo Core ou anticorpo VSV_{NJ}.

20 A figura 12 descreve a expressão de proteínas do HCV Core do VSV_{Ind} recombinante do tipo selvagem M e mutante M (A). A expressão das proteínas VSV das mesmas células foi igualmente detectada (B). A expressão foi determinada pelo teste de Western blot usando anticorpo Core ou anticorpo VSV_{NJ}.

25 A figura 13 mostra a expressão do HCV Core a partir do rVSV_{NJ} e rVSV_{Ind} com genes do HCV Core. Proteínas do HCV Core foram detectadas por rotulagem da célula infectada durante uma hora com 3H-Leucina e imunoprecipitando a proteína do Core com anticorpo contra o HCV Core.

A figura 14 ilustra a clonagem de genes HCV NS3 no clone de cDNA de rVSV_{NJ}(M_{WT}), rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), rVSV_{Ind}(M_{WT}), e rVSV_{Ind}(M_{M51R}).

A figura 15 mostra a recuperação de rVSV_{NJ}(M_{WT}),
 5 rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), rVSV_{Ind}(M_{WT}) e rVSV_{Ind}(M_{M51R}) expressando NS3. A expressão do NS3, sorotipos e fenótipos M do rVSV recuperado foi confirmada por análise de Western blot usando o anticorpo HCV NS3 e anticorpos sorotipos específicos VSV.

A figura 16 ilustra a clonagem de genes HCV NS5A e NS5B
 10 no clone cDNA de rVSV_{NJ}(M_{WT}), rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), VSV_{Ind}(M_{WT}) e rVSV_{Ind}(M_{M51R}).

A figura 17 mostra o rVSV_{NJ}(M_{WT}) recuperado, rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), expressando NS5A. A expressão de NS5A, sorotipos e fenótipos M do rVSV recuperado foi confirmada por meio de análise de
 15 Western blot usando anticorpo do HCV NS5A e anticorpos específicos do sorotipo VSV_{NJ}.

A figura 18 retrata o rVSV_{Ind}(M_{WT}) recuperado, rVSV_{Ind}(M_{M51R}), expressando NS5A. A expressão de NS5A, sorotipos e fenótipos M do rVSV recuperado foi confirmada por análise de Western
 20 blot usando o anticorpo do HCV NS5A e anticorpos específicos do sorotipo VSV_{Ind}.

A figura 19 retrata o rVSV_{NJ}(M_{WT}) recuperado, rVSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}), expressando NS5B. A expressão de NS5B, sorotipos e fenótipos M do rVSV recuperado foi confirmada por análise de
 25 Western blot usando anticorpo do HCV NS5B e anticorpos específicos do sorotipo VSV_{NJ}.

A figura 20 retrata o rVSV_{Ind}(M_{WT}) recuperado, rVSV_{Ind}(M_{M51R}), expressando NS5B. A expressão de NS5B, sorotipos e fenótipos M do rVSV recuperado foi confirmada por meio do teste de

Western blot usando o anticorpo do HCV NS5B e anticorpos específicos do sorotipo VSV_{Ind}.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

1. DEFINIÇÕES

5 Por conveniência, o significado de certos termos e frases empregadas na especificação, exemplos e reivindicações anexadas é fornecido abaixo. A menos que definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado que
10 invenção. Os artigos "um" e "uma" são usados aqui para se referir a um ou mais de um (ou seja, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo.

Os termos "animal" e "indivíduo", como aqui utilizados, incluem todos os membros do reino animal, incluindo mamíferos,
15 preferencialmente humanos.

O termo "quantidade eficaz" como aqui utilizado significa uma quantidade eficiente e em doses e por períodos de tempo necessários para atingir o resultado desejado.

Os termos "Indiana" e "IND" são usados para se referir ao
20 sorotipo VSV Indiana (VSV_{Ind}).

"M_{WT}" "M(WT)" são usados para se referir a VSV com um gene M tipo selvagem. "M51R" é usado para se referir a um gene M no VSV_{Ind} com uma metionina alterada para uma arginina na posição 51. "M48R-M51R" é usado para se referir a um gene M em VSV_{NJ} com uma
25 metionina alterada para uma arginina nas posições 48 e 51.

Os termos "New Jersey" e "NJ" são usados para se referir ao sorotipo VSV New Jersey (VSV_{NJ}). "Ind-M(M51R)/NJ G" é usado para se referir a VSV_{Ind} com um gene mutante M e expressando a proteína G do VSV sorotipo New Jersey (VSV_{NJ}). "Ind-M(WT)/NJ G" é usado para se

referir a VSV_{Ind} com uma proteína M tipo selvagem e expressando uma proteína G do VSV_{NJ}.

"NJ-M (M48R-M51R)/Ind G" é usado para se referir a VSV_{NJ} com um gene mutante M e expressando uma proteína G do VSV_{Ind}. "NJ-M(WT)Ind G" é usado para se referir a VSV_{NJ} com um gene M tipo selvagem e expressando uma proteína G do VSV_{Ind}.

O termo "proteína", como aqui utilizado, é definido como uma cadeia de resíduos de aminoácidos, geralmente com uma sequência definida. Como usado aqui, o termo proteína é inclusivo dos termos "peptídeos" e "proteínas". Os termos também abrangem um polímero de aminoácidos que tenha sido modificado.

"rVSV" é usado para se referir a um vírus recombinante da estomatite vesicular.

2. VISÃO GERAL

A presente invenção apresenta plataformas de imunização, regimes de vacinação e medicamentos úteis para induzir uma resposta imune em um indivíduo e prevenir ou tratar uma infecção patogênica em um indivíduo, onde as referidas plataformas, regimes e medicamentos constituem um VSV recombinante de um sorotipo, e um VSV recombinante de outro sorotipo.

Antes da invenção atual, outros grupos de pesquisa utilizaram o VSVs ligado ao gene da glicoproteína de superfície (G) para a segunda imunização para evitar a neutralização do vírus *booster* pelos anticorpos, provocada pelos vírus *prime*. Antes da invenção atual, no entanto, nenhum outro grupo de pesquisa utilizou dois sorotipos diferentes do rVSV em um regime ou estratégia de imunização *prime* e *boost*.

Assim, em um aspecto, a presente invenção provê uma plataforma de imunização para uso em uma estratégia de imunização

prime-boost caracterizada pelo fato da mencionada plataforma de imunização ser composta por:

- (a) uma vacina ou composição imunogênica contendo um vírus recombinante da estomatite vesicular (rVSV) de um sorotipo, e
- 5 (b) outra vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV de outro sorotipo.

Em outro aspecto, a presente invenção provê um medicamento combinado útil para induzir uma resposta imune contra um patógeno, caracterizado pelo fato do referido medicamento
10 combinado compreender:

- (a) uma vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV de um sorotipo que seja capaz de expressar uma ou mais proteínas do patógeno, e
- (b) outra vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV
15 de outro sorotipo que seja capaz de expressar a uma ou mais proteínas do patógeno.

O Depositante desenvolveu um sistema de genética reversa para recuperar o VSV_{NJ} do cDNA pela primeira vez (ver figuras 1 e 2; KIM, G. N. and KANG, C. Y., *Virology*, 357:41-53, 2007). O VSV_{NJ}
20 recombinante é um vetor viral eficaz juntamente com o VSV_{Ind} para a expressão de genes estranhos (ou seja, genes de vírus exógenos), que pode ser usado para minimizar os problemas associados com respostas imunes preexistentes contra o VSV em si. Além do sistema de vetor VSV_{NJ}, o Depositante também gerou um clone de comprimento total do
25 VSV_{Ind} (figura 1) que pode ser usado como um vetor de expressão para evitar a neutralização de vetores VSV após a imunização *boost*.

As características da plataforma do Depositante incluem a imunização rVSV, em um aspecto, o uso de dois sorotipos diferentes de VSV, e, em outro aspecto, o uso de VSVs com genes M do tipo selvagem

e M mutante. Em aspectos da invenção os dois sorotipos diferentes de VSV são o VSV_{Ind} e o VSV_{NJ}.

A proteína M VSV inibe a síntese de proteínas celulares de forma muito eficiente, mas quando a metionina é alterada para arginina na posição 51 no VSV_{Ind} M e nas posições 48 e 51 no VSV_{NJ} M, as proteínas M perdem seu efeito inibitório sobre a expressão da proteína celular do hospedeiro (KIM, G. N., and C. Y. KANG. *Virology* 357:41, 2007; PETERSEN, J. M., *et al.*, *Mol Cell Biol* 20:8590, 2000; von KOBBE, C, *et al.*, *Mol Cell* 6:1243, 2000). O rVSV com o gene mutante M podem, portanto, ser vetores de melhor expressão do que vetores rVSV com tipo selvagem M, porque eles não vão bloquear a expressão de proteínas imune relacionadas, tais como quimiocinas nas células que apresentem antígenos.

3. VACINAS OU COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS DA INVENÇÃO

A presente invenção também apresenta vacinas ou composições imunogênicas que compreendem um rVSV de um primeiro sorotipo e vacinas ou composições imunogênicas que compreendem um rVSV de um segundo sorotipo, como descrito acima. A vacina ou as composições imunogênicas da invenção são adequadas para administração a indivíduos em uma forma biologicamente compatível *in vivo*. A expressão "forma biologicamente compatível adequada para administração *in vivo*", como aqui utilizada, significa uma forma da substância a ser administrada na qual quaisquer efeitos tóxicos são superados pelos efeitos terapêuticos. As substâncias podem ser administradas a qualquer animal ou indivíduo, de preferência seres humanos. As vacinas da presente invenção podem igualmente ser fornecidas como uma preparação liofilizada. As vacinas da presente invenção também podem ser fornecidas como uma solução que possa ser congelada para o transporte. Além disso, as vacinas podem conter

conservantes adequados, como o glicerol, ou podem ser formuladas sem conservantes. Se apropriado (ou seja, nenhum dano para o VSV na vacina), as vacinas podem também conter solventes, adjuvantes e/ou veículos adequados.

5 A dose da vacina pode variar de acordo com fatores como o estado de doença, idade, sexo e peso do indivíduo, bem como a capacidade do anticorpo para obter uma resposta desejada no indivíduo. O regime de dosagem pode ser ajustado para fornecer a ótima resposta terapêutica. A dose da vacina também pode ser variada
10 para dar uma resposta ótima à dose preventiva, dependendo das circunstâncias.

4. MÉTODOS DE USO

A presente invenção também apresenta métodos de induzir uma resposta imune em um indivíduo e prevenir ou tratar uma infecção
15 patogênica em um indivíduo, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de uma combinação de vacinas ou composições imunogênicas.

Como tal, em um aspecto, a presente invenção fornece um método para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV
20 caracterizado pelo fato do referido método compreender as seguintes etapas:

- (a) a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz de uma primeira vacina ou composição imunogênica, onde a referida primeira vacina ou composição imunogênica compreende um rVSV de um
25 primeiro sorotipo, e
- (b) administração ao indivíduo de uma quantidade efetiva de uma segunda vacina ou composição imunogênica, em que a referida segunda vacina ou composição imunogênica compreende um rVSV de um segundo sorotipo.

Em outro aspecto, a presente invenção também fornece um método para prevenir ou tratar uma infecção causada por um patógeno, caracterizado pelo fato do mencionado método compreender: (a) a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de uma primeira vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV de um primeiro sorotipo que seja capaz de expressar uma ou mais proteínas do patógeno, e (b) administração ao indivíduo de uma quantidade efetiva de uma segunda vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV de um segundo sorotipo que seja capaz de expressar a uma ou mais proteínas do patógeno.

Em determinados aspectos da invenção, os métodos para induzir uma resposta imune em um mamífero a um VSV e os métodos para prevenir ou tratar uma infecção causada por um patógeno podem ainda compreender a etapa de (c) administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz da primeira vacina ou composição imunogênica. A etapa (c) pode ser administrada ao indivíduo mais de uma vez ao longo da indução de uma resposta imune, prevenção ou tratamento.

A informação acima de forma geral descreve a presente invenção. Uma compreensão mais completa pode ser obtida tendo como referência os exemplos específicos a seguir. Estes exemplos são descritos apenas para fins de ilustração e não se destinam a limitar o escopo da invenção. Alterações na forma e substituição de equivalentes são contempladas à medida que as circunstâncias possam sugerir ou tornar conveniente. Apesar dos termos específicos terem sido empregados neste documento, tais termos são destinados em um sentido descritivo e não para fins de limitação.

EXEMPLOS

Os exemplos são descritos para fins de ilustração e não se destinam a limitar o escopo da invenção.

EXEMPLO 1 - RECUPERAÇÃO DO VSV POR GENÉTICA REVERSA

O Depositante gerou VSVs recombinantes de cDNA pelo sistema de genética reversa, que foi estabelecido antes por Rose e Wertz, separadamente (LAWSON, N. D., *et al.*, *Proc Natl Acad. Sci U.S.A* 92:4477, 1995; WHELAN, S. P. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 92:8388, 1995). Células renais de hamster recém-nascido expressando polimerase do RNA bacteriófago T7, denominado células BHK-T7 (BUCHHOLZ, U. J. *et al.*, *J Virol* 73:251, 1999), foram transfectadas com um plasmídeo de DNA, codificando o genoma de comprimento total do VSV, sorotipo Indiana ou sorotipo New Jersey, e plasmídeos codificando genes VSV N, P e L. O meio de cultura celular contendo vírus recém-gerado foi colhido 48 a 72 horas após a transfecção, dependendo do grau de efeitos citopáticos pelo VSV recombinante. A figura 2 ilustra o sistema de genética reversa para a recuperação de VSV do DNA.

A figura 1 ilustra os clones de cDNA de VSV_{Ind} e VSV_{NJ} gerados pelo Depositante. O diagrama da figura 1 descreve a ordem dos genes (N, P, M, G e L) e sítios de restrição enzimática (Pac I, Not I, Kpn I, e Spe I) no clone de comprimento total de DNA do genoma VSV, que pode ser usada para clonar genes de interesse (genes estranhos) no genoma do VSV. As mutações introduzidas no gene M (M51R no VSV_{Ind} e M48R-M51R no VSV_{NJ}) do VSV são também mostrados.

Com referência à figura 3, os VSV recombinantes foram purificados por 3 consecutivas escolhas de placas e amplificados em células de rim de hamster recém-nascido. A fim de determinar a cinética de replicação do VSVs recombinante, infectamos as células BHK com uma multiplicidade de infecção (MOI), de 3 e colhemos o meio de cultura celular a partir de células infectadas a cada 2 horas até 10

horas após a infecção. A titulação viral no meio de cultura colhido foi determinada por ensaio de placa.

EXEMPLO 2 - EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VSV EM CÉLULAS DO RIM DO HAMSTER RECÉM-NASCIDOS INFECTADOS COM VSVs RECOMBINANTES

5 Expressão de proteínas recombinantes do VSVs (dois sorotipos, VSV_{Ind} e VSV_{NJ}, VSVs M do tipo selvagem e mutante M e VSVs com gene G ligado) foi examinada por meio do teste de Western blot utilizando anticorpos contra o VSV_{Ind} e o VSV_{NJ}. Nossos anticorpos contra VSV_{Ind} ou VSV_{NJ} detectam quatro proteínas do VSV (N, P, M e
10 G). A figura 4 mostra três bandas de proteínas, porque a proteína N e a proteína P migram como as proteínas do mesmo tamanho no gel SDS-PAGE.

O anticorpo contra VSV_{Ind} ou VSV_{NJ} poderia detectar todas as quatro proteínas do VSV, N, P5, M e G, que foram expressas a partir
15 de um único sorotipo. A troca do gene G no VSV_{Ind}-NJG foi confirmada pela falta de detecção da proteína G por anticorpos VSV_{Ind} porque os anticorpos do VSV_{Ind} não reagem de forma cruzada com a proteína G do VSV_{NJ} (faixas 2 e 4). A troca do gene G no VSV_{NJ}-IG foi confirmada pelas diferenças de tamanho em VSV_{Ind} G e VSV_{NJ} G. O VSV_{Ind} G migra
20 ligeiramente mais lento do que o G do VSV_{NJ}, o que é mostrado nas faixas 6 e 8. A mutação no gene M (M51R na proteína do VSV_{Ind} M e M48R-M51R na proteína do VSV_{NJ} M) faz com que as proteínas M migrem um pouco mais rápido do que as proteínas M do tipo selvagem de ambos os sorotipos, o que está demonstrado nas faixas 3, 4, 7 e 8. O
25 padrão de migração das proteínas M confirma a mutação no VSVs mutante.

EXEMPLO 3 - REGIMES DE VACINAÇÕES OU REGIMES PARA ENCONTRAR A MELHOR COMBINAÇÃO DE INOCULAÇÃO VIRAL

Com referência às figuras 5 a 8 e tabela 1, uma vez que um dos objetivos do Depositante é utilizar um regime *prime* e *boost* para imunizar os animais, o Depositante determinou a melhor ordem dos sorotipos VSV recombinantes para o regime de imunização *prime* e *boost*. O Depositante estudou se a vacinação com 1) vetores com base em dois diferentes sorotipos (VSV_{Ind} ou VSV_{NJ}), 2) vetores VSV expressando a proteína G do sorotipo alternativo ou 3) a proteína do VSV M do tipo selvagem citotóxico ou mutante não-citopático forneceu alguma vantagem para a geração de células CD8+T específicas de VSV. A tabela 1 ilustra todas as possíveis combinações do sorotipo.

Grupos de camundongos foram vacinados com rVSVs em um programa de três doses de vacinação. Neste estudo de vacinação consistindo em 13 grupos de camundongos, o objetivo foi determinar a construção (ou construções) da vacina do recombinante VSV que gerou o maior percentual de células CD8+T específicas do nucleocapsídeo VSV, com base na produção de gama-interferon (IFN γ) após a estimulação com o peptídeo VSV N275 do VSV N (peptídeos específicos MHC I H2d direcionados para a sequência de aminoácidos em VSV N). Em particular, nós estudamos se a vacinação com (1) vetores baseados em duas diferentes cepas (VSV_{Ind} ou VSV_{NJ}), (2) vetores expressando a proteína G do sorotipo alternativo ou (3) a proteína do VSV M do tipo selvagem citotóxico ou mutante não-citopático proporcionaram alguma vantagem para a geração de células CD8+T específicas de VSV N.

Seis camundongos Balb/c femininos com seis semanas de idade (tipo MHC H2d) por grupo receberam 1×10^6 pfu (unidade de formação de placa) de rVSV por dose 1, administrado por injeção intramuscular no músculo posterior da coxa e diluído em um total volume de 50 μ l de PBS. Os camundongos receberam 1×10^6 pfu de rVSV por dose 2, e 5×10^6 de rVSV pela dose 3. Um período de tempo de

quatro semanas separaram as doses 1 e 2, e um adicional de 10 semanas separaram as doses 2 e 3. Os camundongos foram sacrificados 7 dias após a 3ª dose e esplenócitos colhidos para a detecção de células CD8+T específicas para um peptídeo nucleocapsídeo VSV (VSV N275).

Uma suspensão de célula única de esplenócitos foi preparada em RPMI completo e, em seguida, 1×10^6 de células foram transferidas para poços apropriados em uma placa de 96 poços com fundo em U. O peptídeo VSV N específico VSV N275, NH₂-MPYLIDFGL-COOH (GenScript Corporation, Piscataway NJ) e misturas de co-estimulante anti-CD28 (clone 37,51, BD Biosciences, San Jose CA) foram adicionados e as misturas foram incubadas por 2 horas. Brefeldin A (BD Biosciences) foi adicionado de acordo com as instruções do fabricante para bloquear a secreção de citocina e as células foram incubadas por mais 3 horas. As células foram marcadas com anticorpos de reconhecimento de CD8 (FITC-CD8a, BD Biosciences clone 53-6.7) de murino ou anticorpos de controle de isotipos apropriados. As células foram lavadas e, depois, permeabilizadas com reagentes do kit Cytofix/cytoperm (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante e, em seguida, incubadas para IFN γ (APC-IFN γ , BD Biosciences, clone XMG 1.2). As células incubadas foram identificadas através de um citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences) e do *software* FlowJo (Tree Star Inc., Ashland OR). Os dados são expressos como a porcentagem média de esplenócitos CD8+IFN γ + em 4 a 6 camundongos por grupo (+/- desvio padrão médio, SEM) para cada vacina. Uma estatística significativa foi determinada utilizando uma ANOVA *one-way* com uma correção de Bonferroni (*software* Prism 4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

RESULTADOS

Os resultados mostram claramente que a alternância dos sorotipos VSV para a segunda dose é melhor do que o fornecimento de três doses de um sorotipo VSV único para a geração de células CD8+T específicas de VSV N. Em vista dos resultados apresentados neste documento, uma estratégia para induzir células CD8+T específicas de VSV N é uma primeira dose de VSV_{Ind}-M mutante, seguido de uma dose de VSV_{NJ}-M mutante, e, finalmente, uma dose de VSV_{Ind}-M mutante (figura 8A).

EXEMPLO 4: ESTUDOS DE IMUNIZAÇÃO COM VSV RECOMBINANTE

EXPRESSANDO PROTEÍNAS DO HCV

ANTECEDENTES

O vírus da hepatite C (HCV) é o agente causador da Hepatite C em humanos. O número de casos de hepatite C é estimado em cerca de 170 milhões no mundo inteiro. Aproximadamente 3% da população mundial estão cronicamente infectadas pelo vírus. Estima-se que aproximadamente 3 milhões de pessoas nos Estados Unidos estão cronicamente infectadas com o HCV, com a maioria das infecções ocorrendo entre pessoas de 30 a 50 anos de idade.

A infecção por HCV pode ser extremamente grave. A infecção inicial pode não causar nenhuma doença ou pode resultar em hepatite acompanhada de icterícia; a insuficiência hepática fulminante é rara. No entanto, a maioria das infecções pelo VHC torna-se crônica. Esta infecção crônica, embora tolerada por alguns, conduz à doença hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular. Estes pacientes cronicamente infectados são a fonte de quase todas as novas infecções.

Embora o genoma HCV já tenha sido isolado e sequenciado mais de uma década atrás, nenhuma vacina eficaz para prevenir a infecção pelo HCV ou tratar o HCV agudo ou crônico foi desenvolvida.

A vacina ou estratégia de vacinação do HCV ideal será aquela que induza respostas imunes tanto humorais como celulares. Assim, a nova estratégia de imunização com o VSV recombinante desenvolvida pelo Depositante, utilizando dois sorotipos diferentes VSV, provê uma plataforma para a obtenção de um sistema de vacina para o HCV.

GERAÇÃO DE VSV RECOMBINANTE EXPRESSANDO PROTEÍNAS DO HCV

Com referência às figuras 9 a 20, os genes do HCV core, NS3, NS5A e NS5B foram primeiro clonados em um vetor pBluescript II KS (Stratagen) para introduzir sequências intergênica de junção do VSV, que estejam envolvidas na interrupção transcricional do gene montante e reinício transcricional do VSV no seu a jusante. O comprimento total do Core e quatro genes do HCV Core com deleções em regiões envolvidas na localização do núcleo e ancorando na membrana ER foram clonados no vetor pBluescript II KS. O comprimento total do gene NS3 foi clonado em um vetor pBluescript II sem modificações. Os NS5A e NS5B completos, e os NS5A e NS5B com deleções na região de ancoragem da membrana ER foram clonados em um vetor pBluescript II KS. Após a confirmação das sequências corretas em cada clone, os genes do HCV com sequências intergênica de junção do VSV, exceto NS5B total, foram cortados com a enzima de restrição KPN I e clonados em pVSV_{NJ}-M(WT) e pVSV_{NJ}-M(M48R-M51R) entre o gene G e o gene L. O corte Pac I de genes HCV com sequências de junção intergênica do VSV foi clonado no local do Pac I entre os genes G e L no pVSV_{Ind}-M(WT) e pVSV_{Ind}-M(M51R). Os NS5B inteiros foram cortados com Spe I a partir de um vetor pBluescript II e finalizados bruscamente com o fragmento *Klenow* e ligados a pVSV_{NJ}, que foi cortado com KPN I e encerrado bruscamente com o fragmento *Klenow*. A inserção do NS5B em pVSV_{NJ} foi confirmada por digestão do

plasmídeo com Pac I, cujo local foi apresentado a ambas as extremidades do clone NS5B. Genes do HCV Core foram parcialmente digeridos com a Kpn I por causa da presença de um local Kpn I adicional no gene do núcleo. Os mesmos clones no vetor pBluescript II foram cortados com a enzima de restrição, Pac I, a fim de clonar genes HCV, Core, NS3, NS5A e NS5B em pVSV_{Ind}-M(WT) e pVSV_{Ind}-M(M51R). A inserção de genes HCV nos pVSVs foi confirmada pela digestão dos plasmídeos com a KPN I ou Pac I e pelo sequenciamento de DNA.

Os recombinantes VSV_{Ind} e VSV_{NJ} expressando HCV Core (figuras 11, 12 e 13), NS3 (figura 15), NS5A (figuras 17 e 18), e NS5B (figuras 19 e 20) foram recuperados a partir de clones de cDNA pela genética reversa do VSV. Os vírus recombinantes foram purificados por três consecutivas escolhas de placa e amplificados pela infecção das células BHK com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1. A expressão de proteínas de HCV a partir dos vírus foi determinada por meio do teste de Western blot usando lisatos de célula infectadas por vírus e antissoros contra proteínas de HCV. O teste Western blot dos mesmos lisatos de célula usando antissoros contra VSV_{Ind} e VSV_{NJ} determinou o sorotipo e o fenótipo do gene M do vetor VSV expressando cada proteína HCV. As proteínas M mutantes de VSV_{Ind}(M_{M51R}) e VSV_{NJ}(M_{M48R-M51R}) migram ligeiramente mais rápido do que as proteínas do tipo selvagem M no gel SDS-PAGE.

Resultados

Com referência à figura 8B, vigorosa reativação das células CD8⁺T foi observada após a estimulação *ex vivo* com peptídeos HCV MHC classe I em uma coorte de camundongos (n=2) vacinados com VSV_{Ind}-M_{M51R} + HCV-CoreΔER, depois com VSV_{NJ}-M_{M48-51R} + HCV-CoreΔER, e seguida três semanas mais tarde por uma dose adicional de VSV_{Ind}-M_{M51R} + HCV-CoreΔER. Essa reativação mostrou-se específica para

- peptídeos HCV desde que um rato de controle imunizado com o vetor VSV sozinho não exibiu células CD8+T específicas para peptídeos HCV (conjunto de barras do lado esquerdo do painel). A reativação de células CD8+T específicas para dois epítomos do nucleocapsídeo VSV foi utilizada como controle positivo em todos os ratos.

TABELA 1: VACINAÇÕES PARA ENCONTRAR AS MELHORES COMBINAÇÕES DE INOCULAÇÃO VIRAL PARA INDUZIR AS MAIS FORTES RESPOSTAS IMUNES EM CAMUNDONGOS

Grupo ID Nº.	Dose 1 (1x10⁶ pfu/camun., IM)	Dose 2 (4 semanas após Dose 1, 1x10⁶ pfu/camun., IM)	Dose 3 (10 sem. após Dose 2, 5x10⁶ pfu/camun., IM)	Núm. de Animais
1-0	PBS	PBS	PBS	6
1-1	rVSV _{NJ} -M(WT)	rVSV _{NJ} -M(WT)	rVSV _{NJ} -M(WT)	6
1-2	rVSV _{NJ} -M(M48R-M51R)	rVSV _{NJ} -M(M48R-M51R)	rVSV _{NJ} -M(M48R-M51R)	6
1-3	rVSV _{Ind} -M(WT)	rVSV _{Ind} -M(WT)	rVSV _{Ind} -M(WT)	6
1-4	rVSV _{Ind} -M(M51R)	rVSV _{Ind} -M(M51R)	rVSV _{Ind} -M(M51R)	6
1-5	rVSV _{NJ} -M(WT)	rVSV _{Ind} -M(WT)	rVSV _{NJ} -M(WT)	6
1-6	rVSV _{NJ} -M(M48R-M51R)	rVSV _{Ind} -M(M51R)	rVSV _{NJ} -M(M48R-M51R)	2+6
1-7	rVSV _{Ind} -M(WT)	rVSV _{NJ} -M(WT)	rVSV _{Ind} -M(WT)	6
1-8	rVSV _{Ind} -M(M51R)	rVSV _{NJ} -M(M48R-M51R)	rVSV _{Ind} -M(M51R)	6

1-9	rVSV _{NJ} -M(WT)	rVSV _{NJ} -M(WT)/ _{Ind} G	rVSV _{NJ} -M(WT)	6
1-10	rVSV _{NJ} -M(M48R- M51R)	rVSV _{NJ} -M(M48R- M51R)/ _{Ind} G	rVSV _{NJ} -M(M48R- M51R)	6
1-11	rVSV _{Ind} -M(WT)	rVSV _{Ind} -M(WT)/ _{NJ} G	rVSV _{Ind} -M(WT)	6
1-12	rVSV _{Ind} -M(M51R)	rVSV _{Ind} - M(M51R)/ _{NJ} G	rVSV _{Ind} -M(M51R)	6

IM: intramuscular; Pfu: unidade formadora de placa; wks: semanas

REIVINDICAÇÕES

1. Plataforma de imunização para uso em uma estratégia de imunização prime-boost, **caracterizada** por a dita plataforma de imunização compreender:

a. uma vacina ou composição imunogênica compreendendo um vírus recombinante da estomatite vesicular (rVSV) de comprimento total de um sorotipo Indiana (rVSV_{Ind}), e

b. outra vacina ou composição imunogênica compreendendo um rVSV de um sorotipo New Jersey (rVSV_{NJ}), em que o rVSV_{Ind} expressa uma proteína M do sorotipo Indiana com uma metionina na posição 51 alterada para uma arginina (substituição M51 R), e o rVSV_{NJ} inclui um gene M mutante que expressa uma proteína M do sorotipo de Nova Jersey com uma metionina na posição 48 alterada para uma arginina, e uma metionina na posição 51 alterada para uma arginina (substituição M48R-M51 R).

2. Plataforma de imunização para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por os dois sorotipos rVSV expressarem uma ou mais proteínas de interesse.

3. Plataforma de imunização para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por os dois sorotipos rVSV expressarem uma ou mais proteínas do vírus da Hepatite C (HCV).

4. Plataforma de imunização para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por a vacina compreendendo o sorotipo rVSV Indiana ser usada como vacina primária (*prime*),

e a vacina que compreende o sorotipo rVSV New Jersey ser usada como vacina de reforço (*boost*) ou vice-versa.

5. Plataforma de imunização para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por as vacinas ou composições imunogênicas incluírem ainda um diluente adequado, um adjuvante, um veículo farmacêuticamente aceitável ou uma combinação dos mesmos.

6. Plataforma de imunização para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por a referida plataforma de imunização ser para uso na prevenção ou tratamento de uma infecção causada por um patógeno.

7. Plataforma de imunização para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por o patógeno ser selecionado a partir de vírus da hepatite C humana, Vírus da Imunodeficiência Humana, vírus do Nilo Ocidental, Hantavíruses, vírus Influenza, vírus Ebola, vírus da Dengue de febre hemorrágica, vírus da encefalite Japonesa, e SARS Coronavírus.

8. Plataforma de imunização para uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por a dita plataforma de imunização ser para uso na prevenção ou tratamento da hepatite C.

9. Kit **caracterizado** por compreender:

a. pelo menos uma dose de uma quantidade eficaz de uma vacina compreendendo um vírus recombinante da estomatite vesicular (rVSV) de comprimento total de um sorotipo Indiana

(rVSV_{Ind}), e

b. pelo menos uma dose de uma quantidade eficaz de uma vacina compreendendo um rVSV de comprimento total de outro sorotipo,

em que um sorotipo é Indiana (rVSV_{Ind}) e o outro sorotipo é New Jersey (rVSV_{NJ}), e em que o rVSV_{Ind} expressa uma proteína M do sorotipo Indiana tendo uma metionina na posição 51 alterada para uma arginina (substituição M51 R), e o rVSV_{NJ} incluir um gene M mutante que expressa uma proteína do sorotipo M de Nova Jersey com uma metionina na posição 48 alterada para uma arginina, e uma metionina na posição 51 alterada para uma arginina (substituição M48R-M51 R).

FIGURA 1

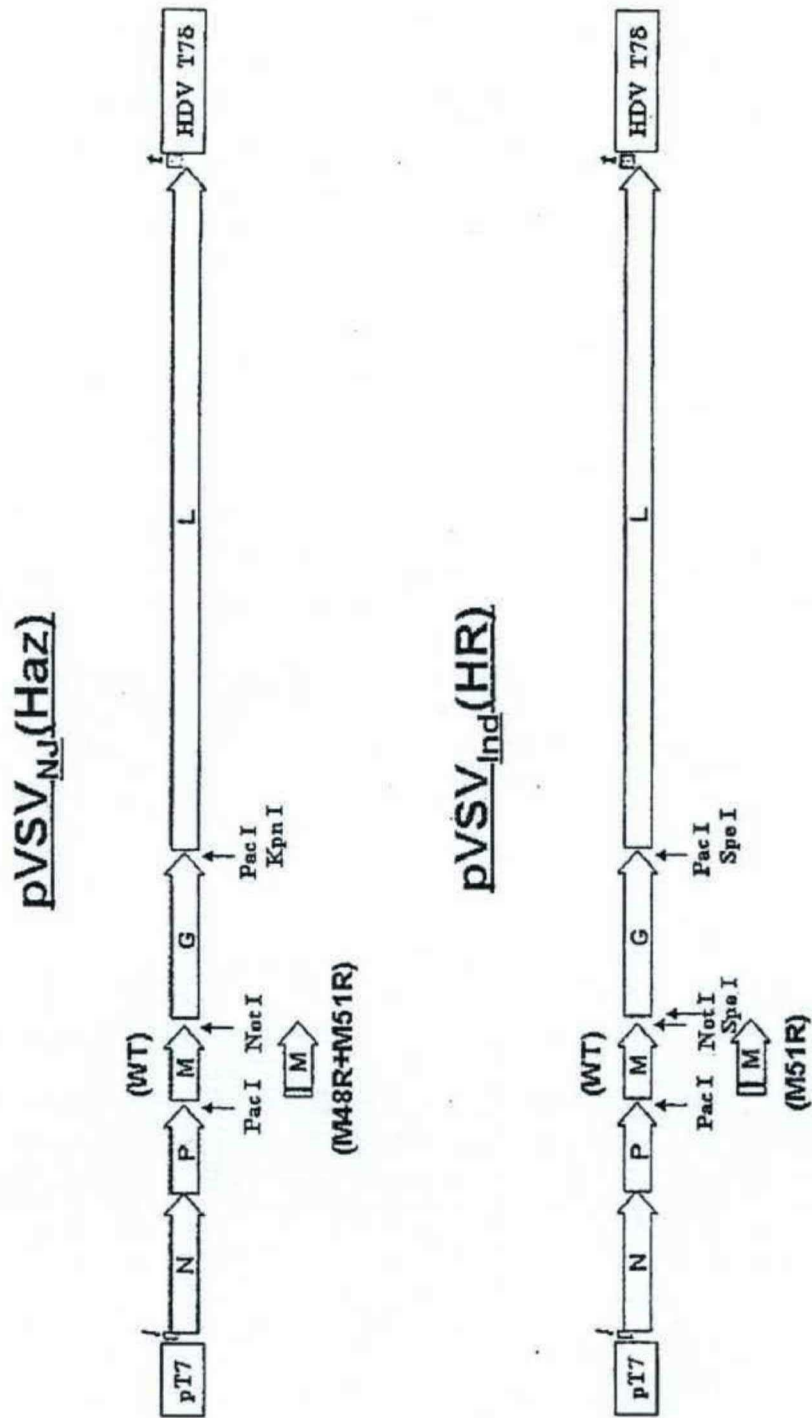
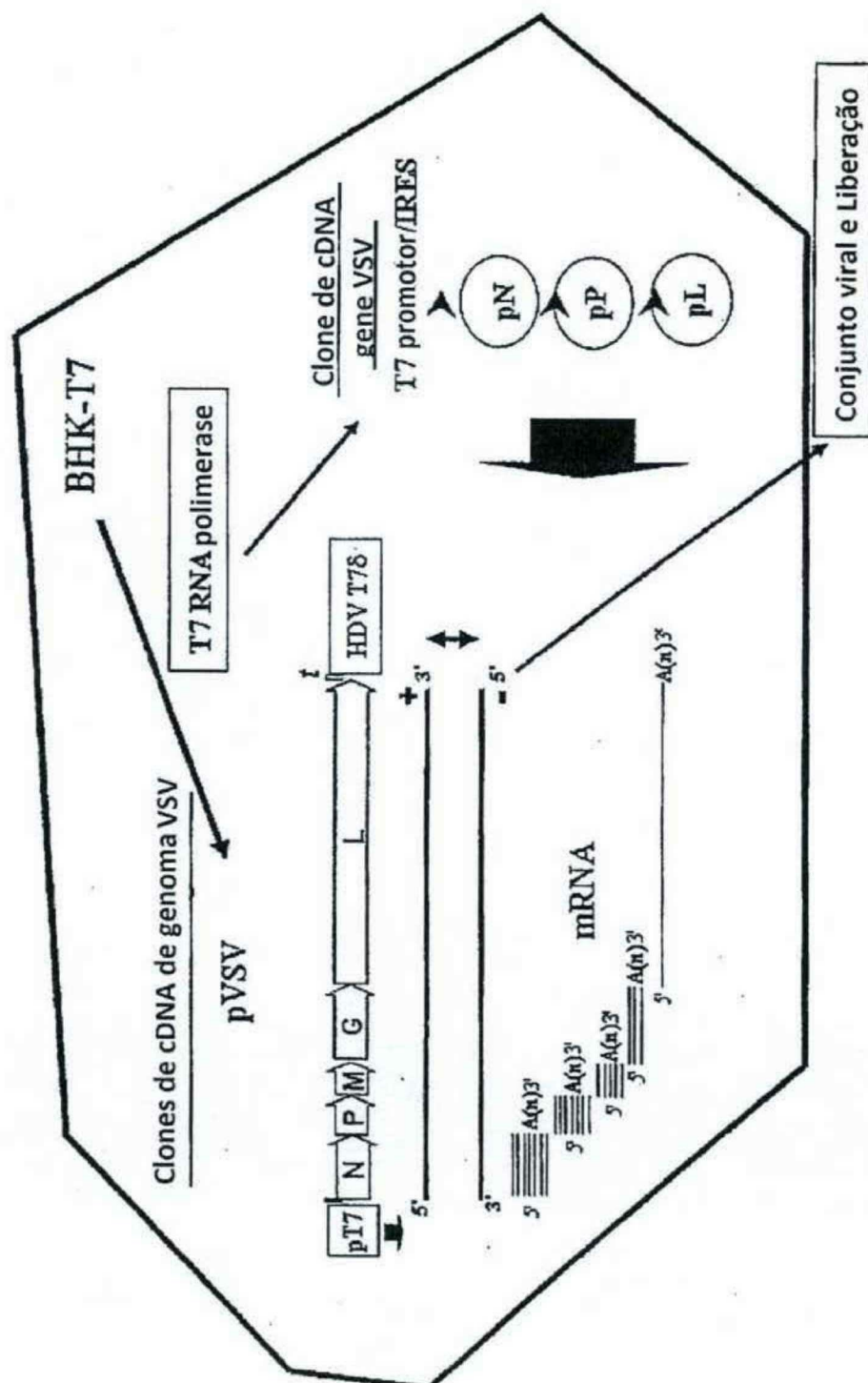
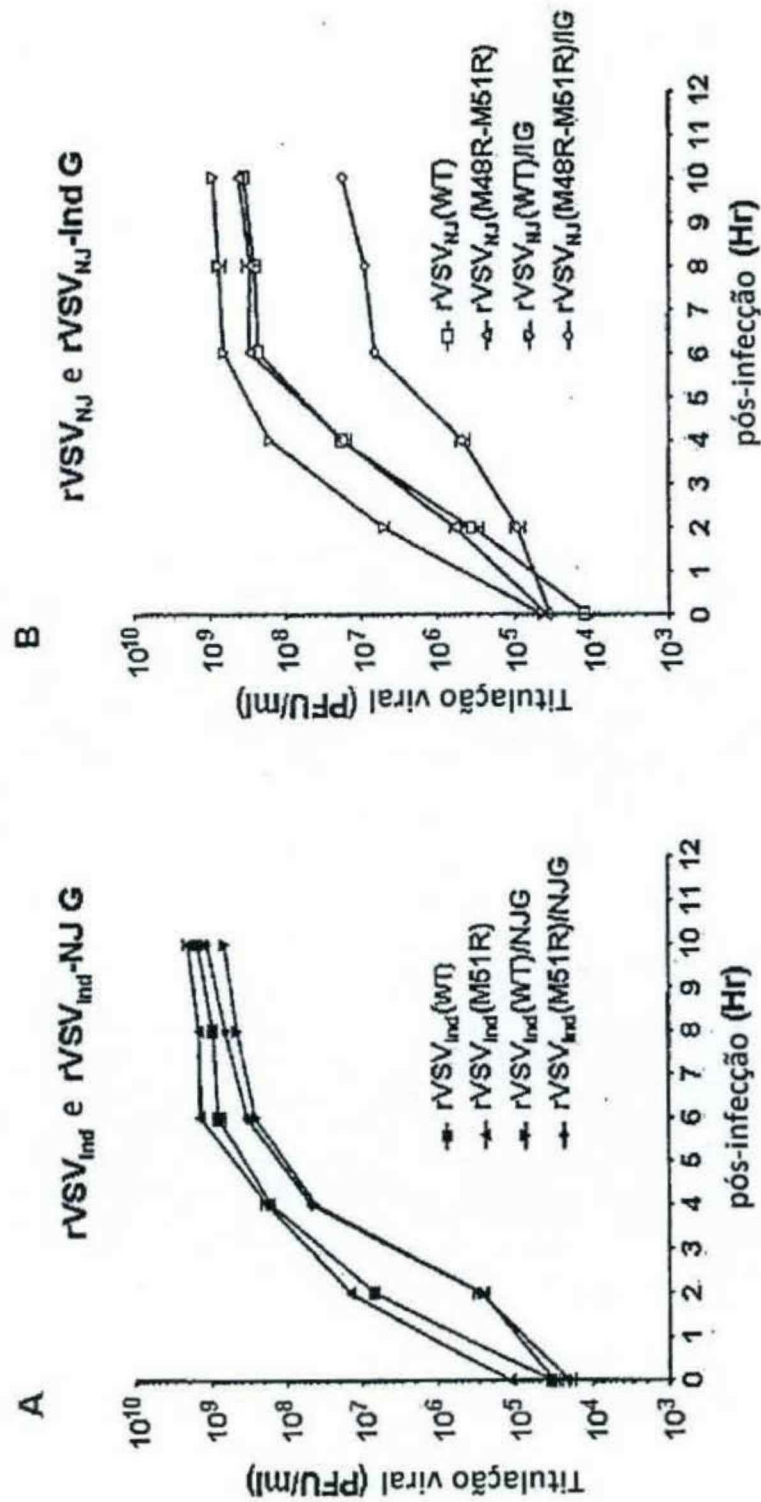


FIGURA 2



Cinética de Crescimento do gene rVSV W/O de interesse

FIGURA 3



Expressão de proteínas de VSV a partir de rVSV

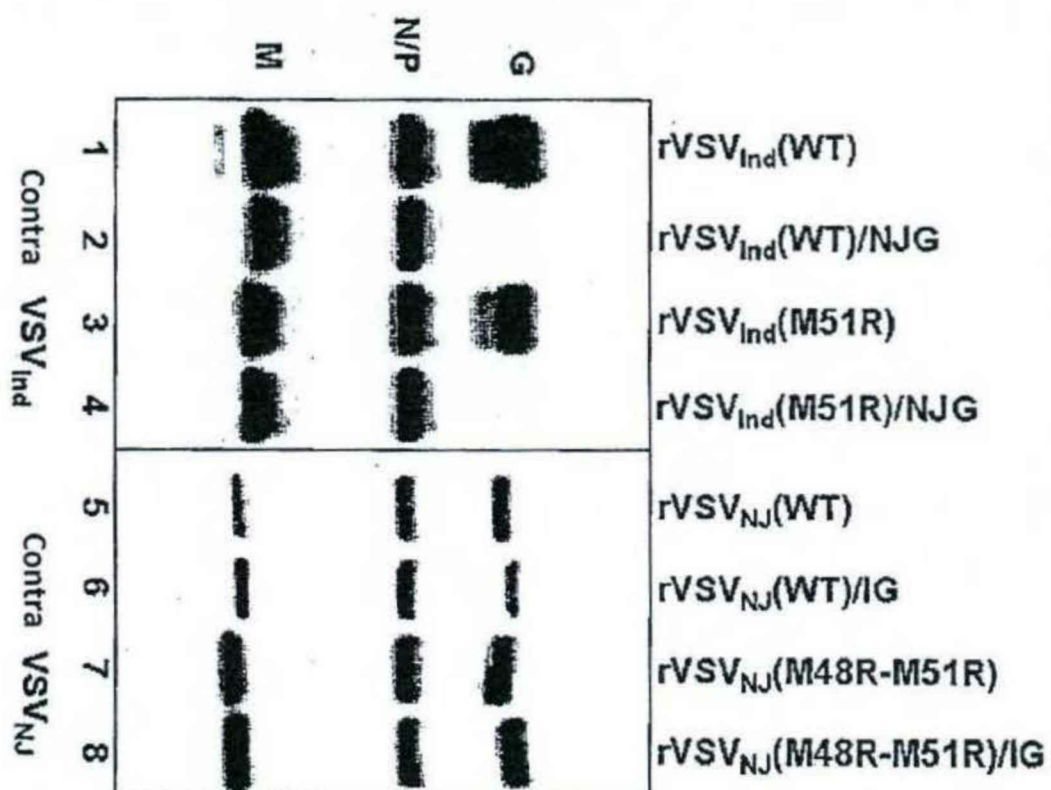


FIGURA 4

FIGURA 5

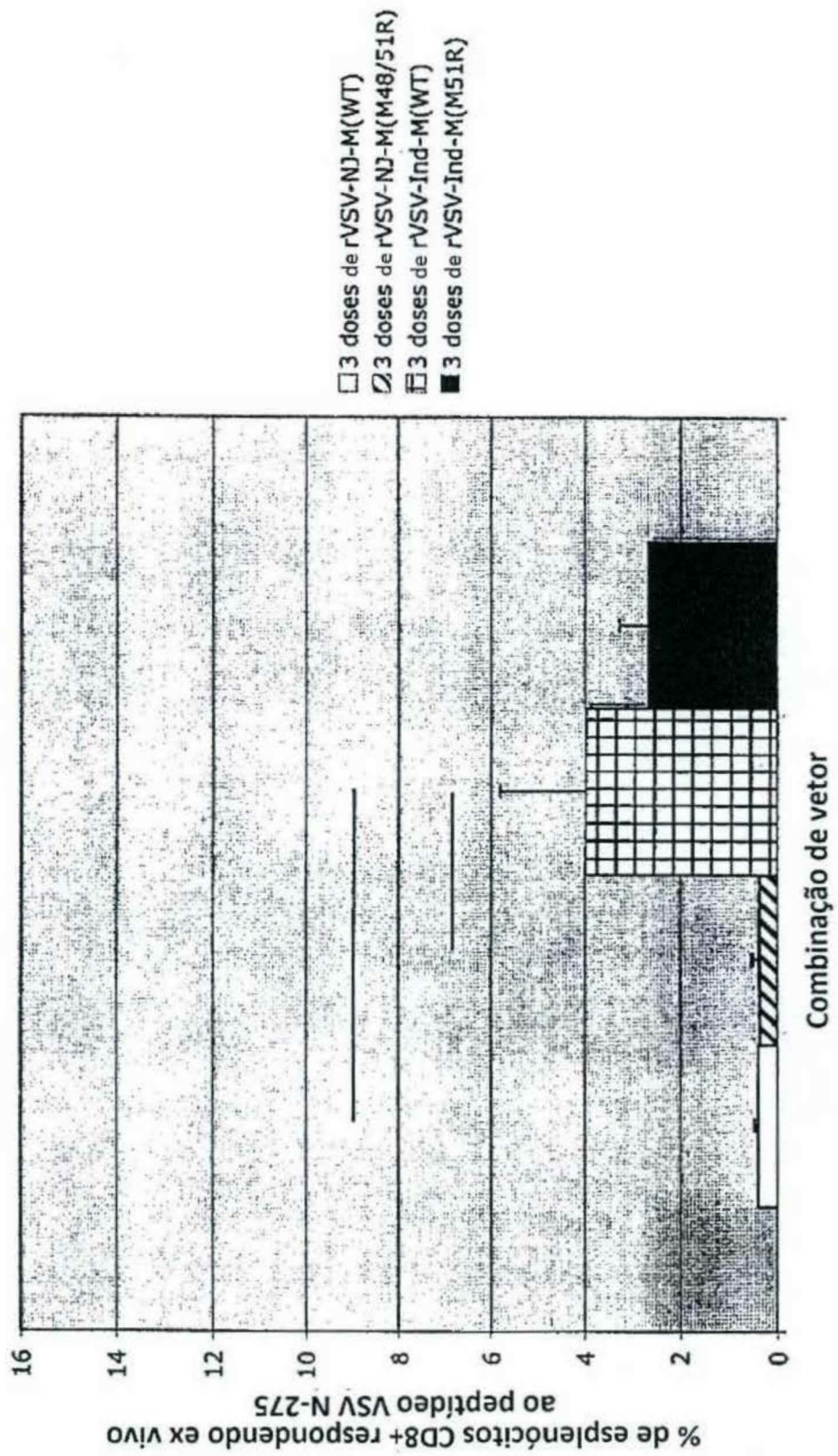


FIGURA 6

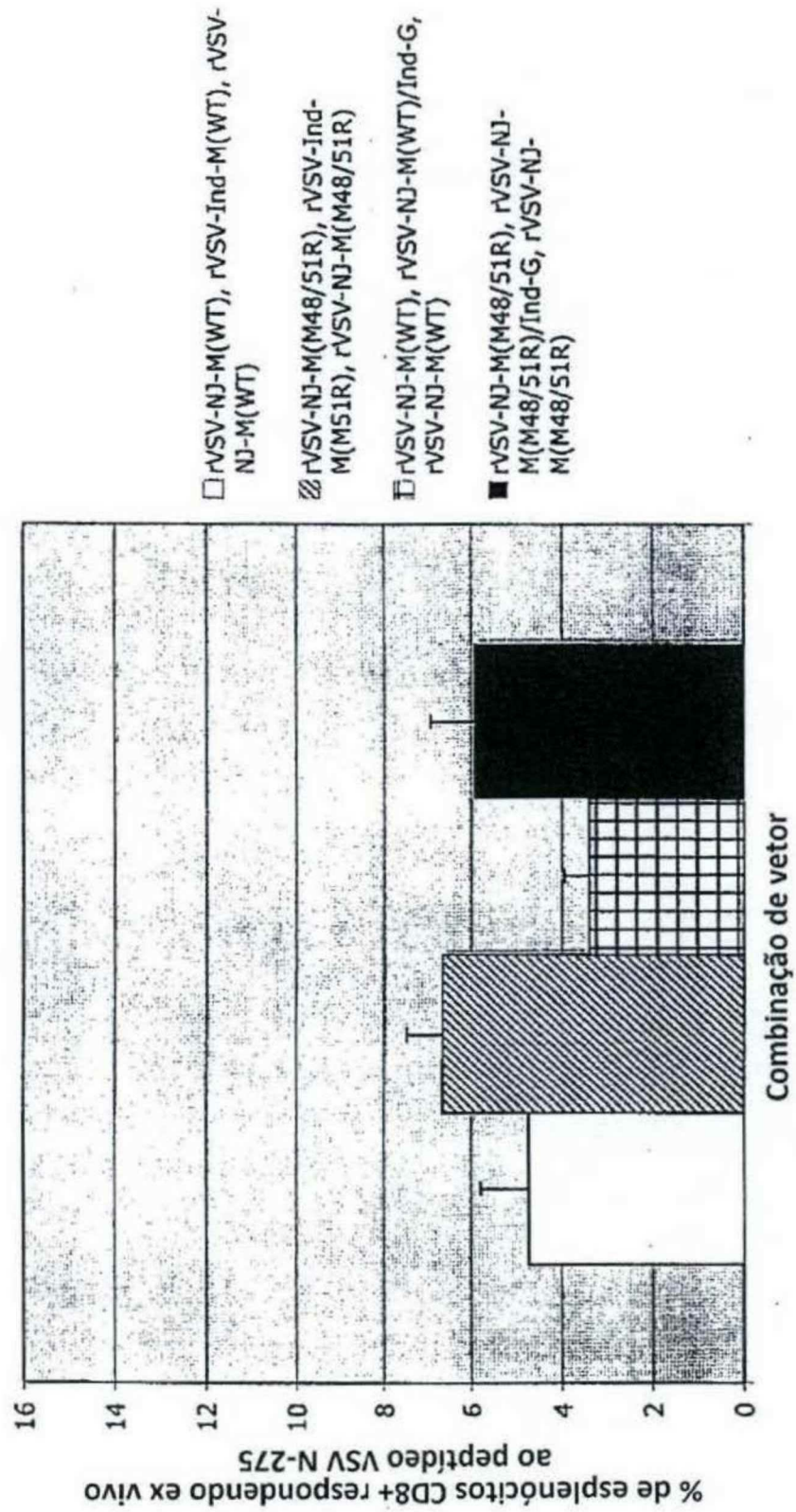


FIGURA 7

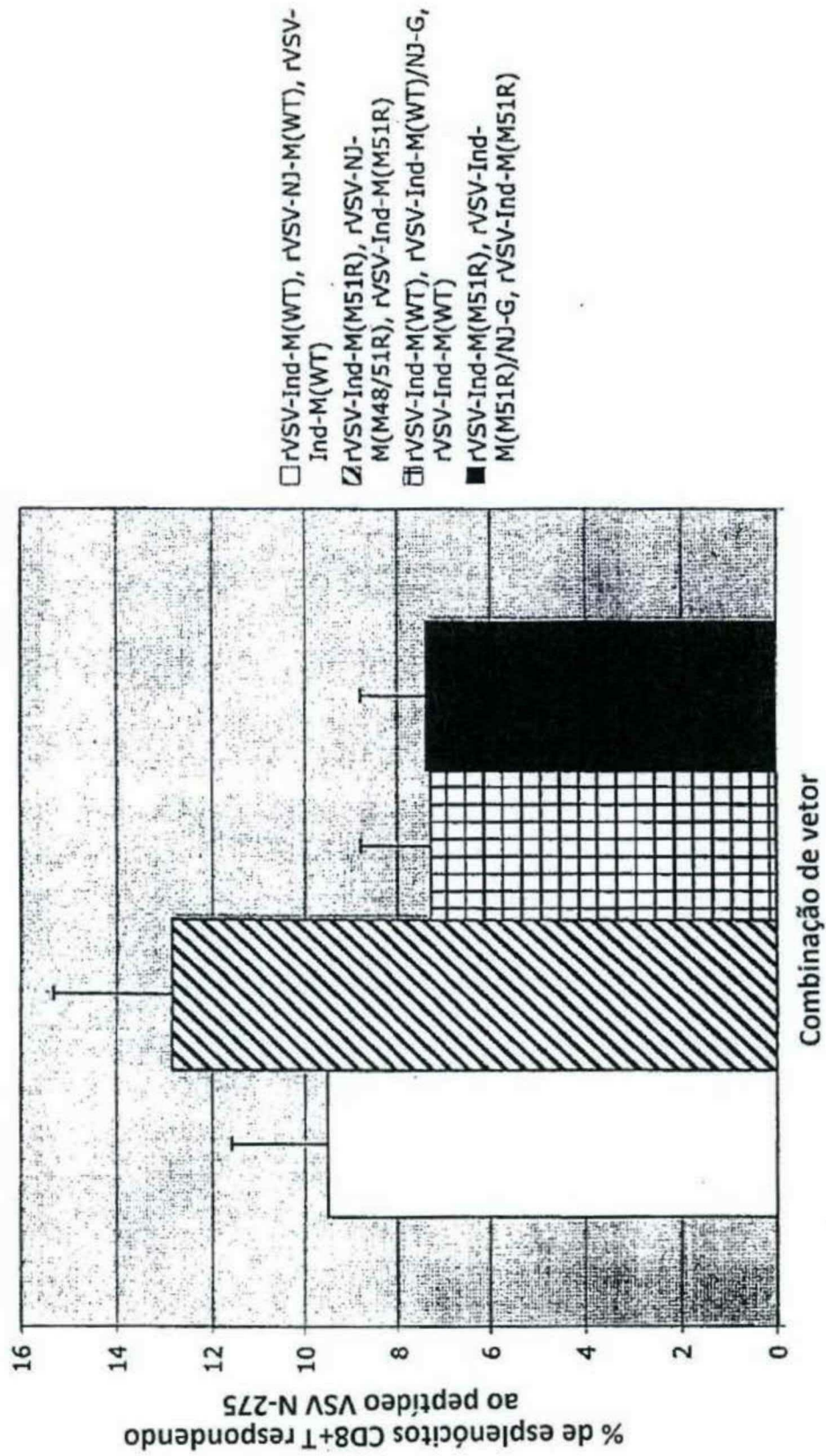


FIGURA 8A

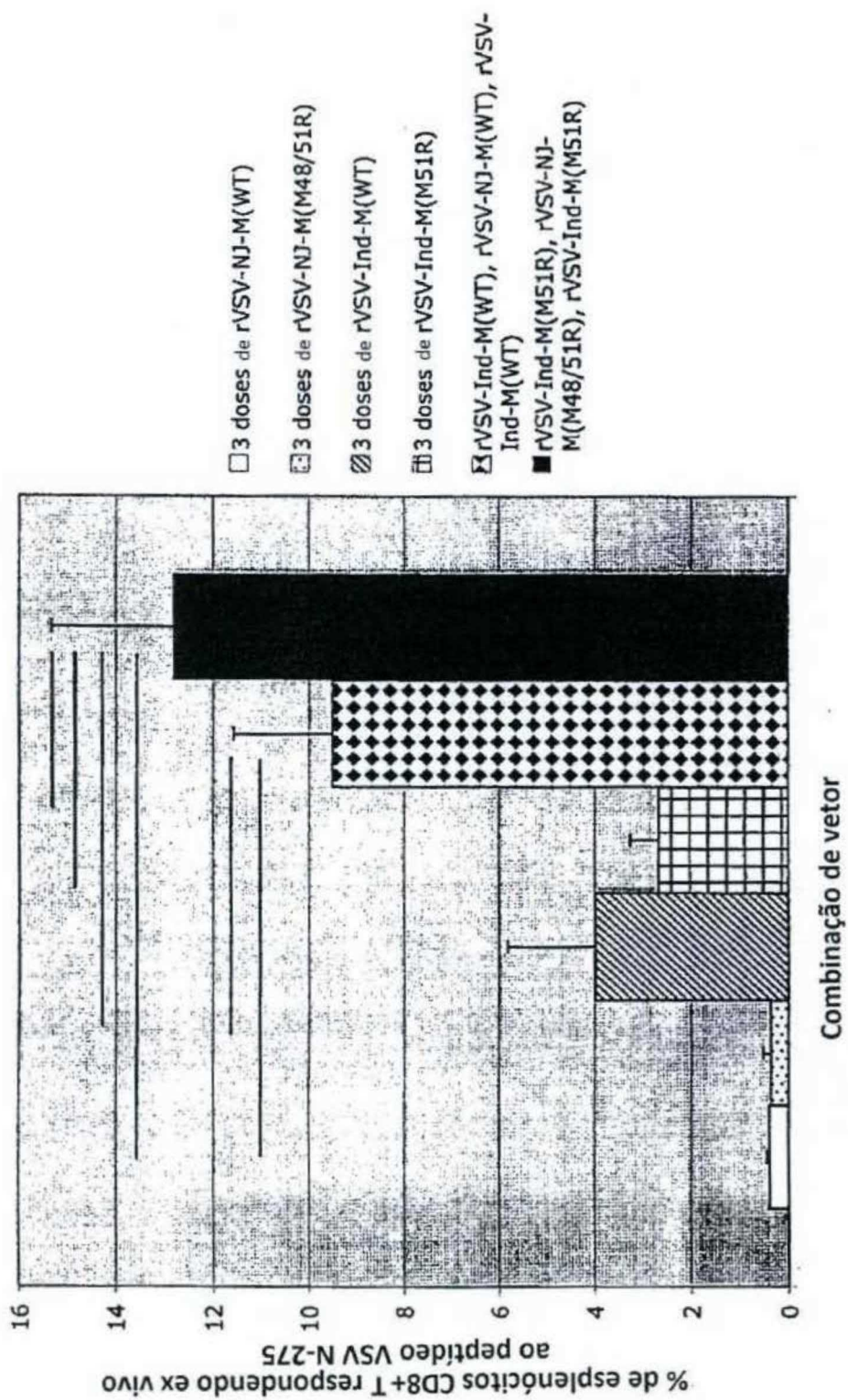


FIGURA 8B

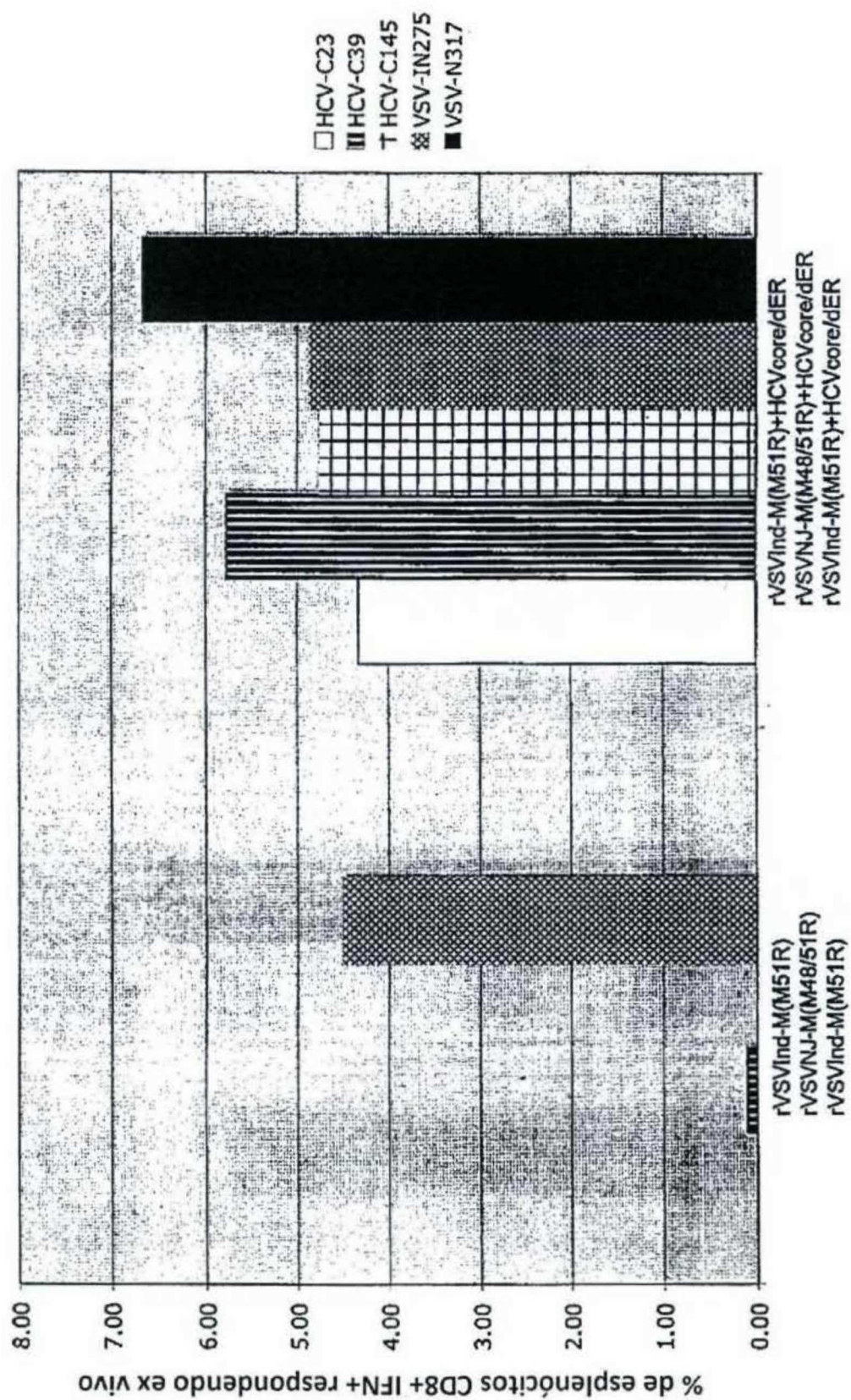


FIGURA 9

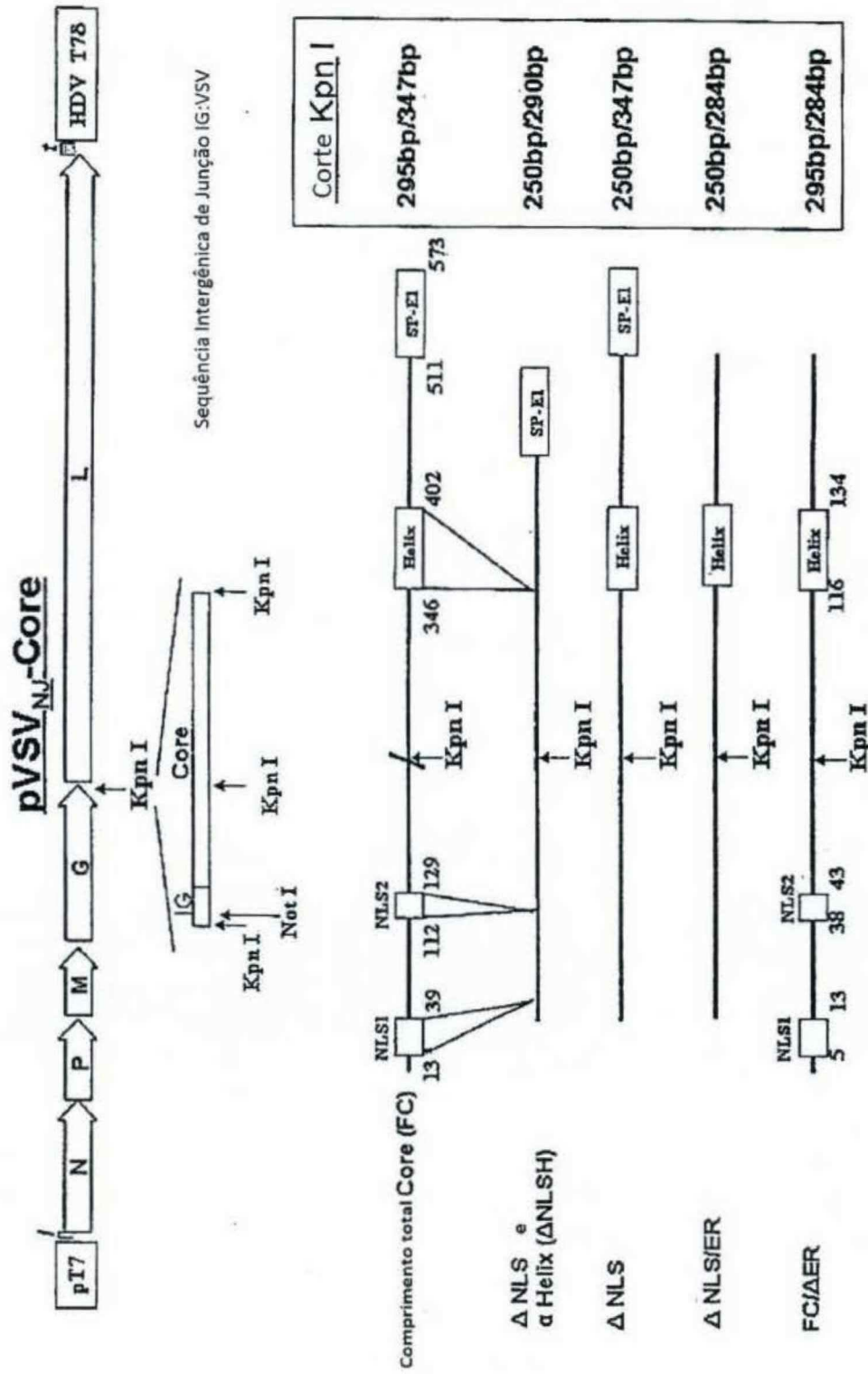


FIGURA 10

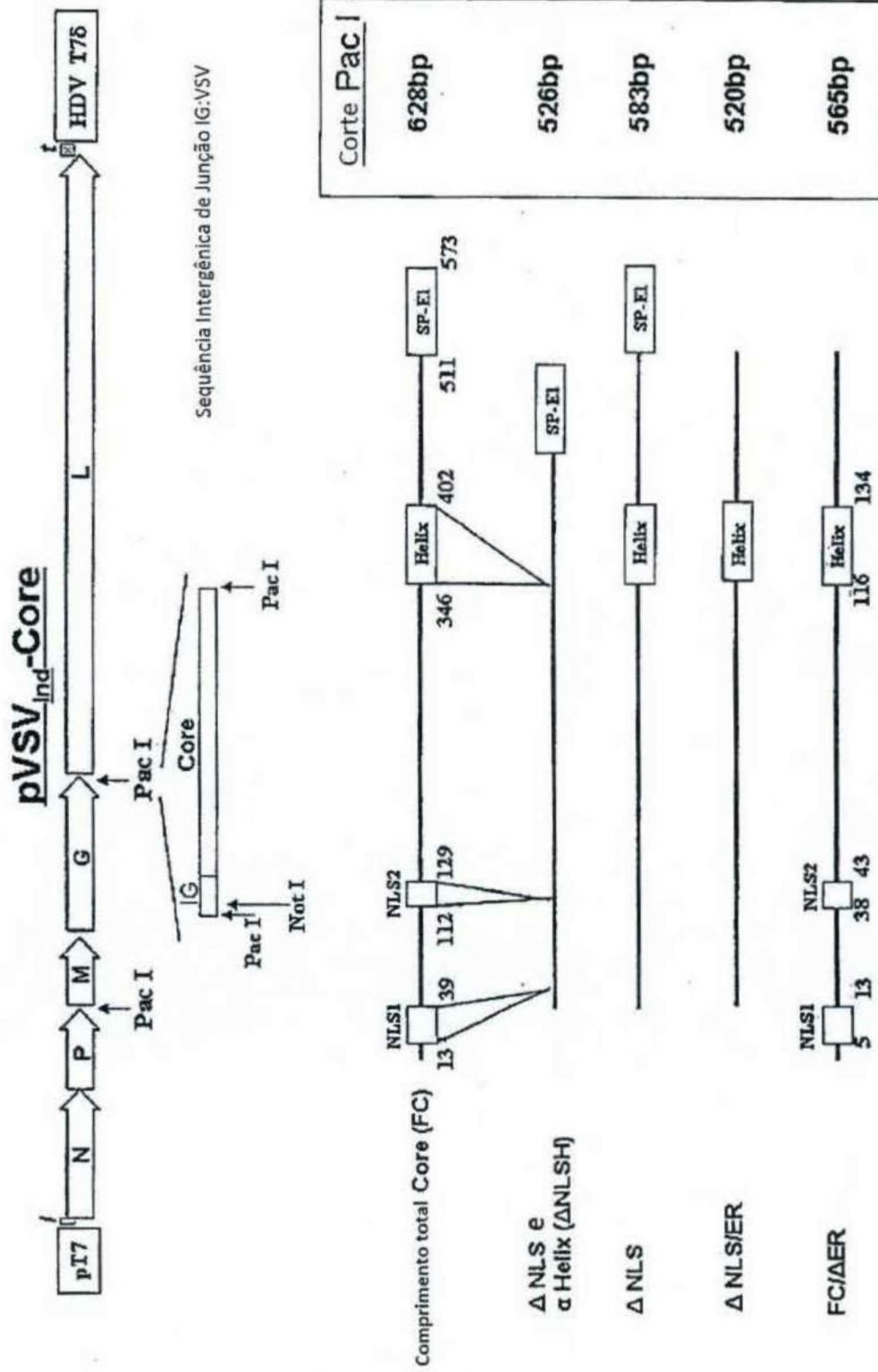


FIGURA 11

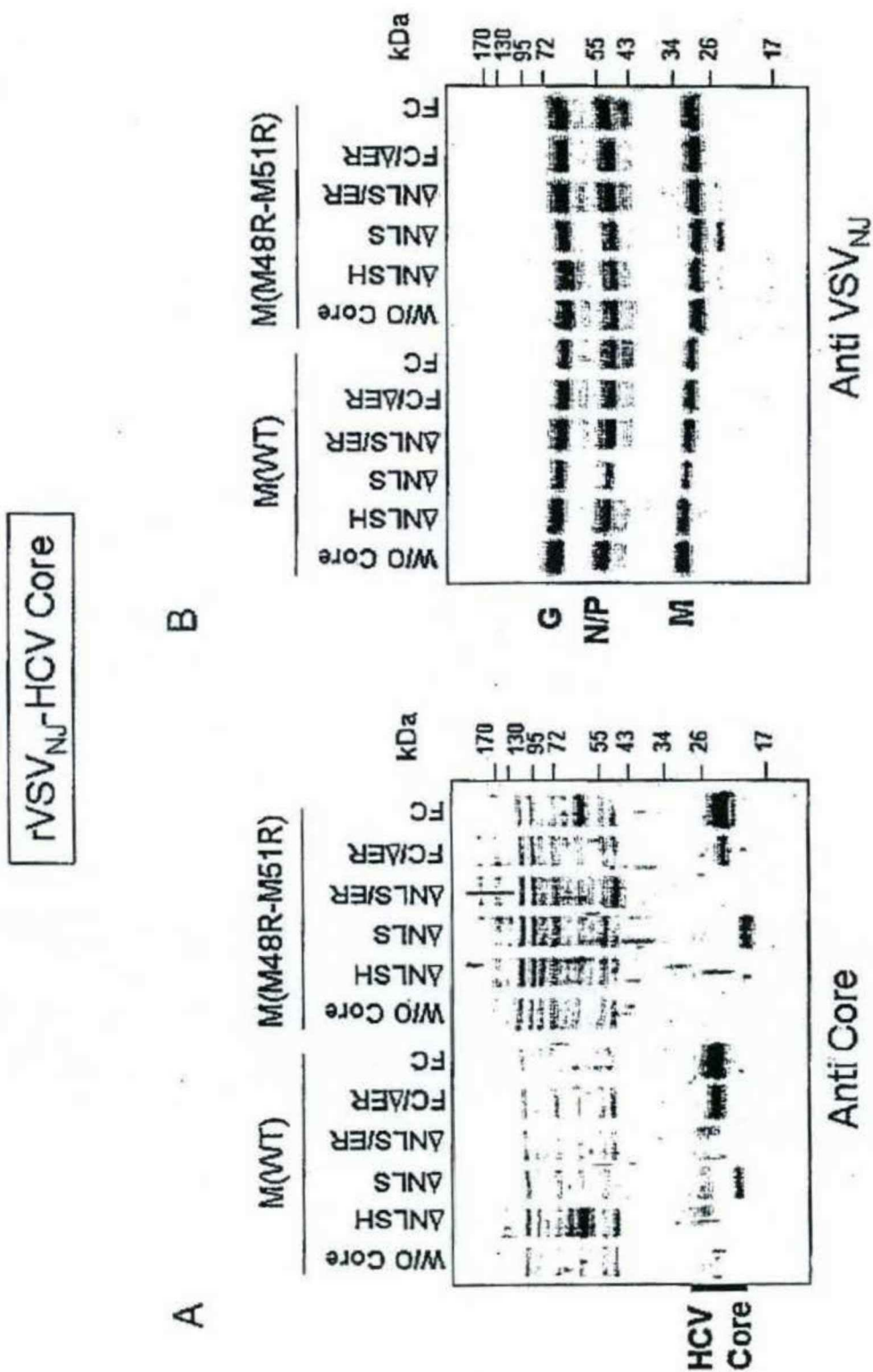


FIGURA 12

rVSV_{Ind}-HCV Core

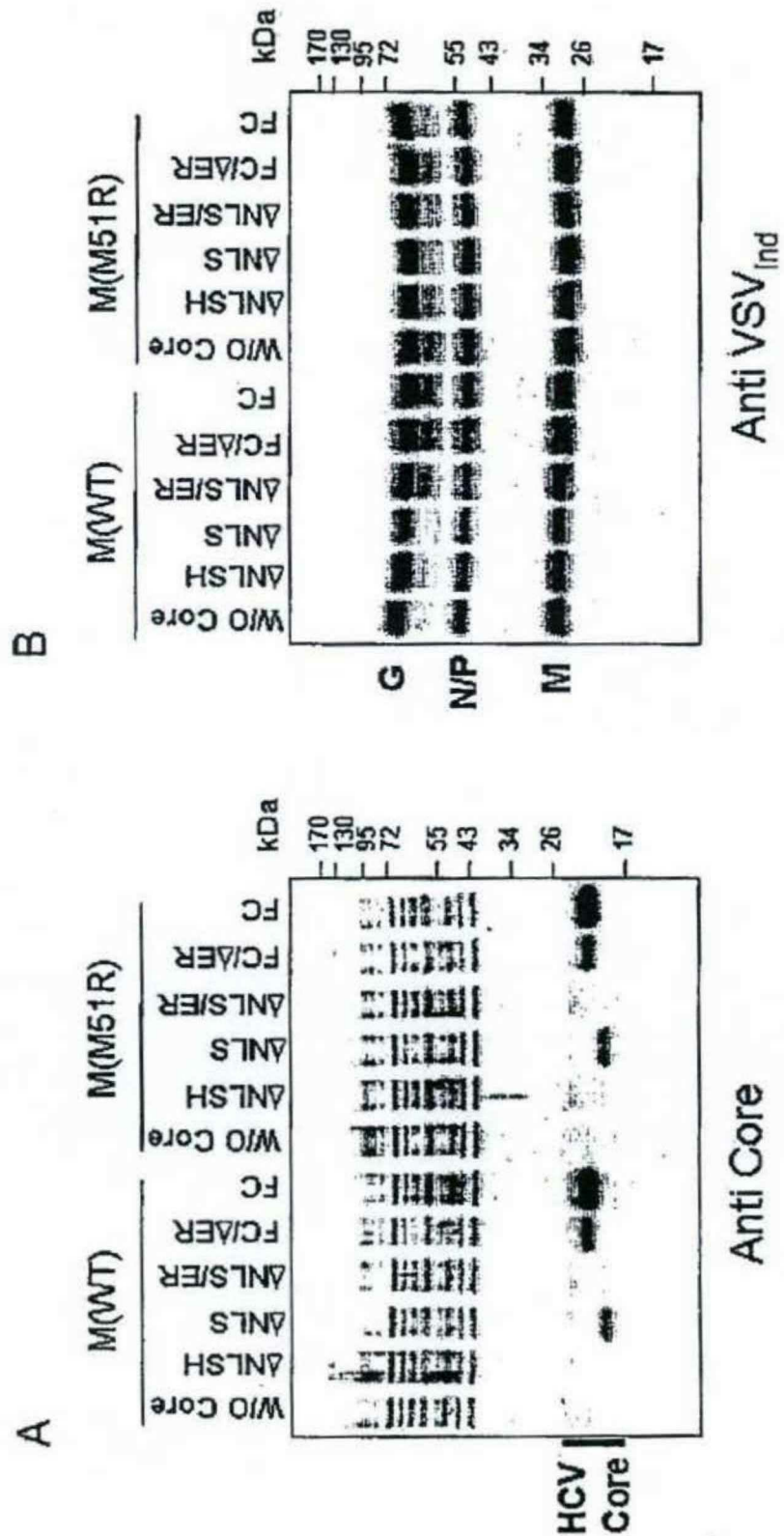


FIGURA 13

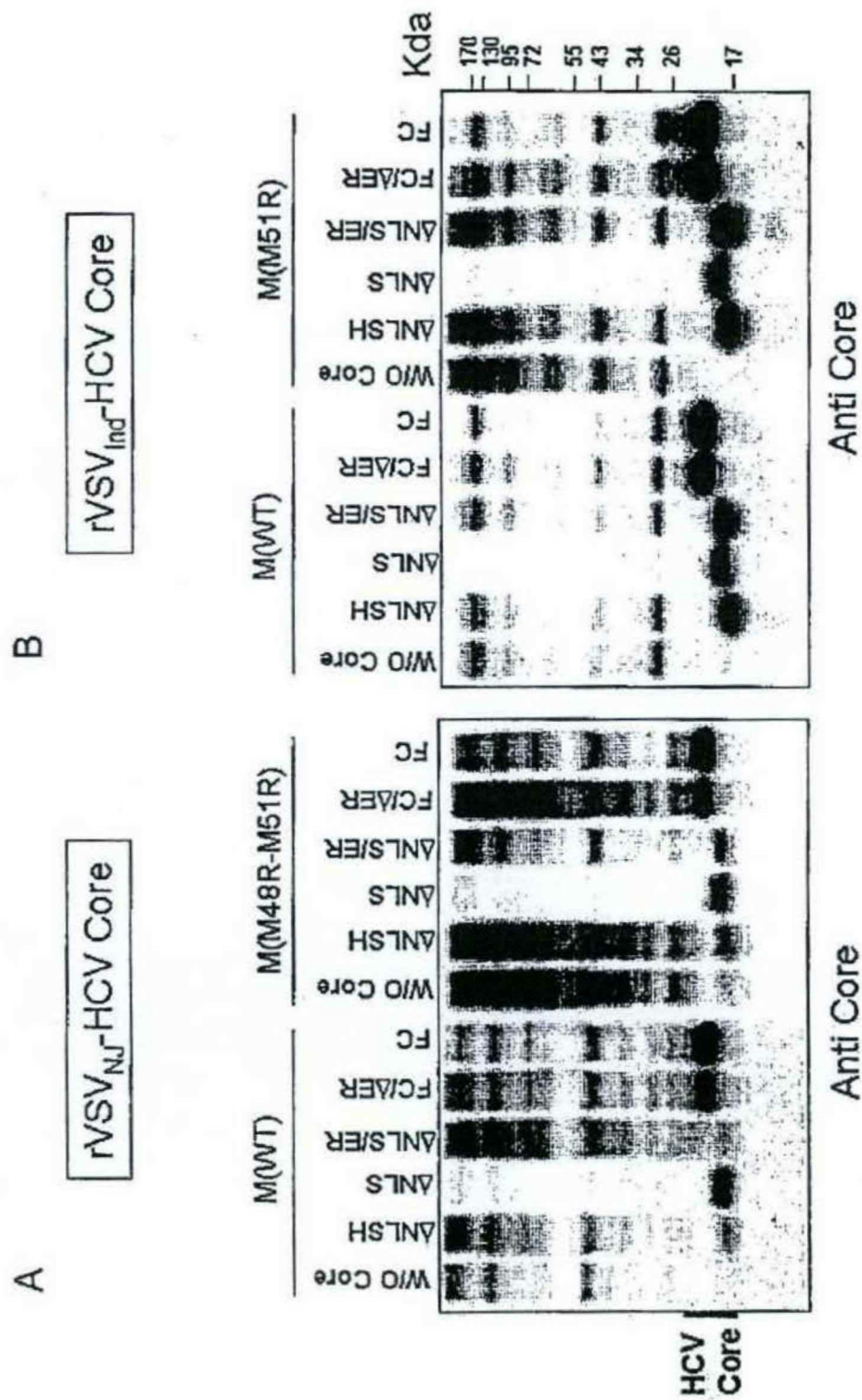
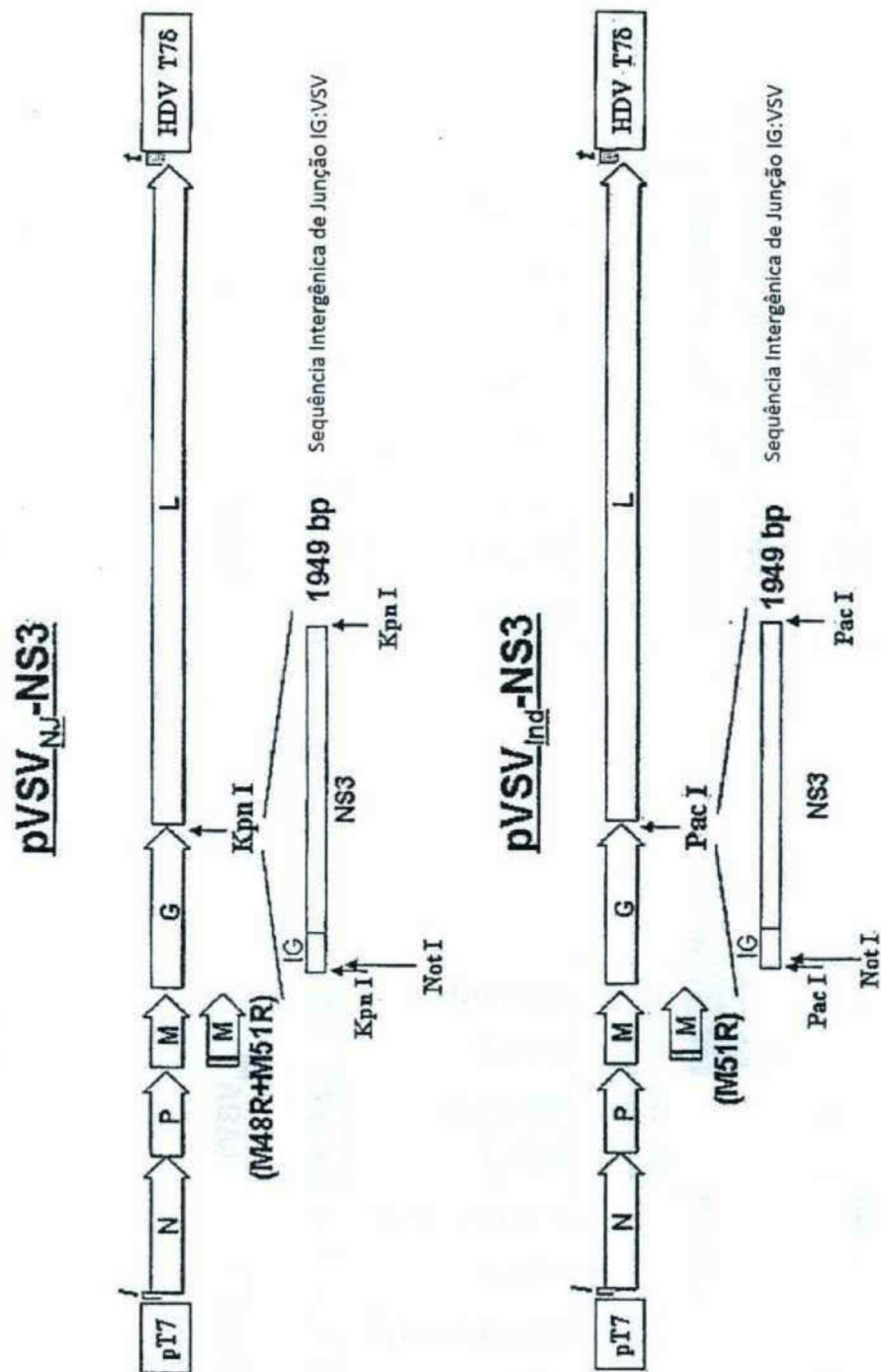


FIGURA 14



rVSV_{NJ}-NS3 and rVSV_{Ind}-NS3

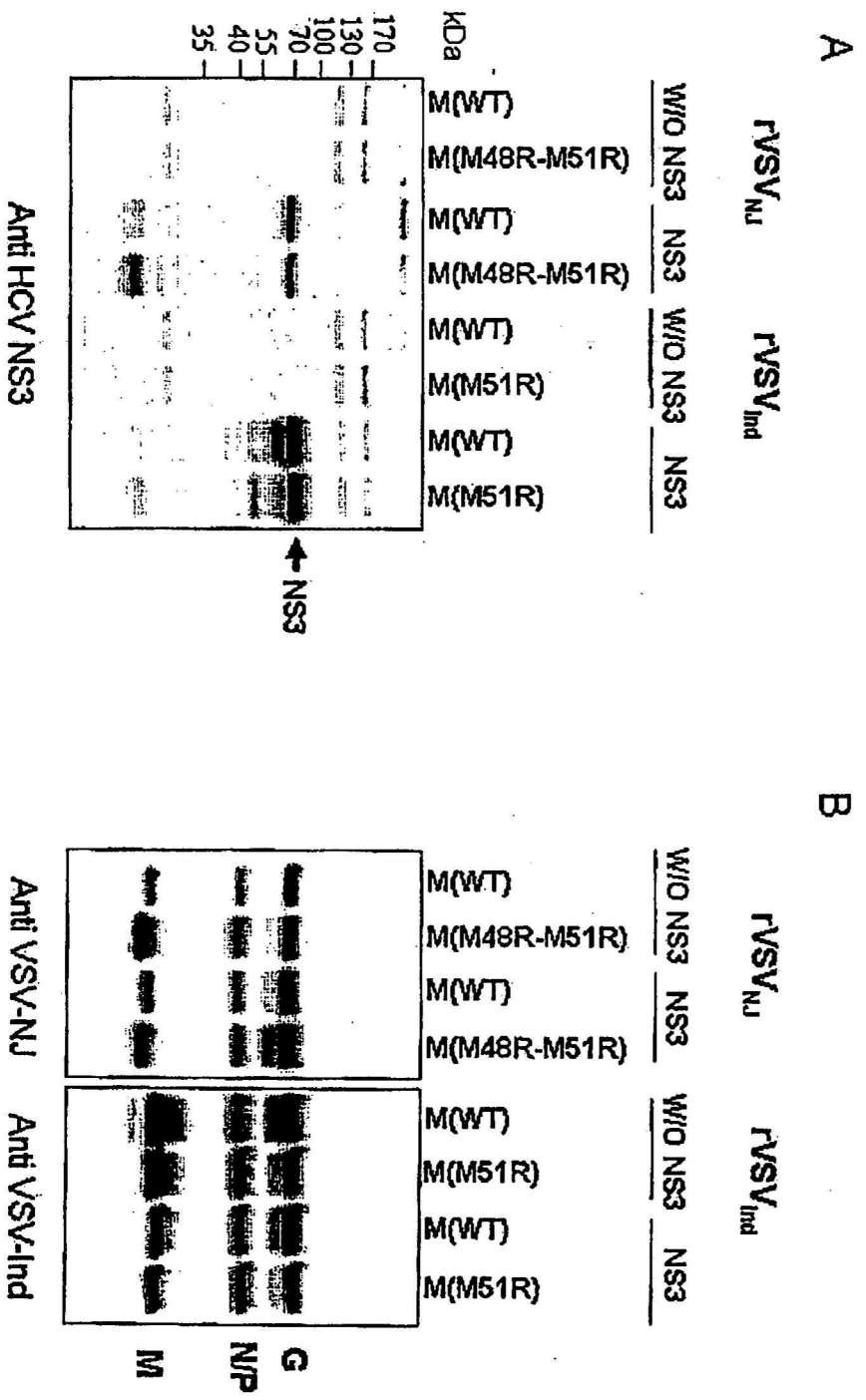


FIGURA 15

FIGURA 16

pVSV_{NJ} or Ind-NS5A and NS5B

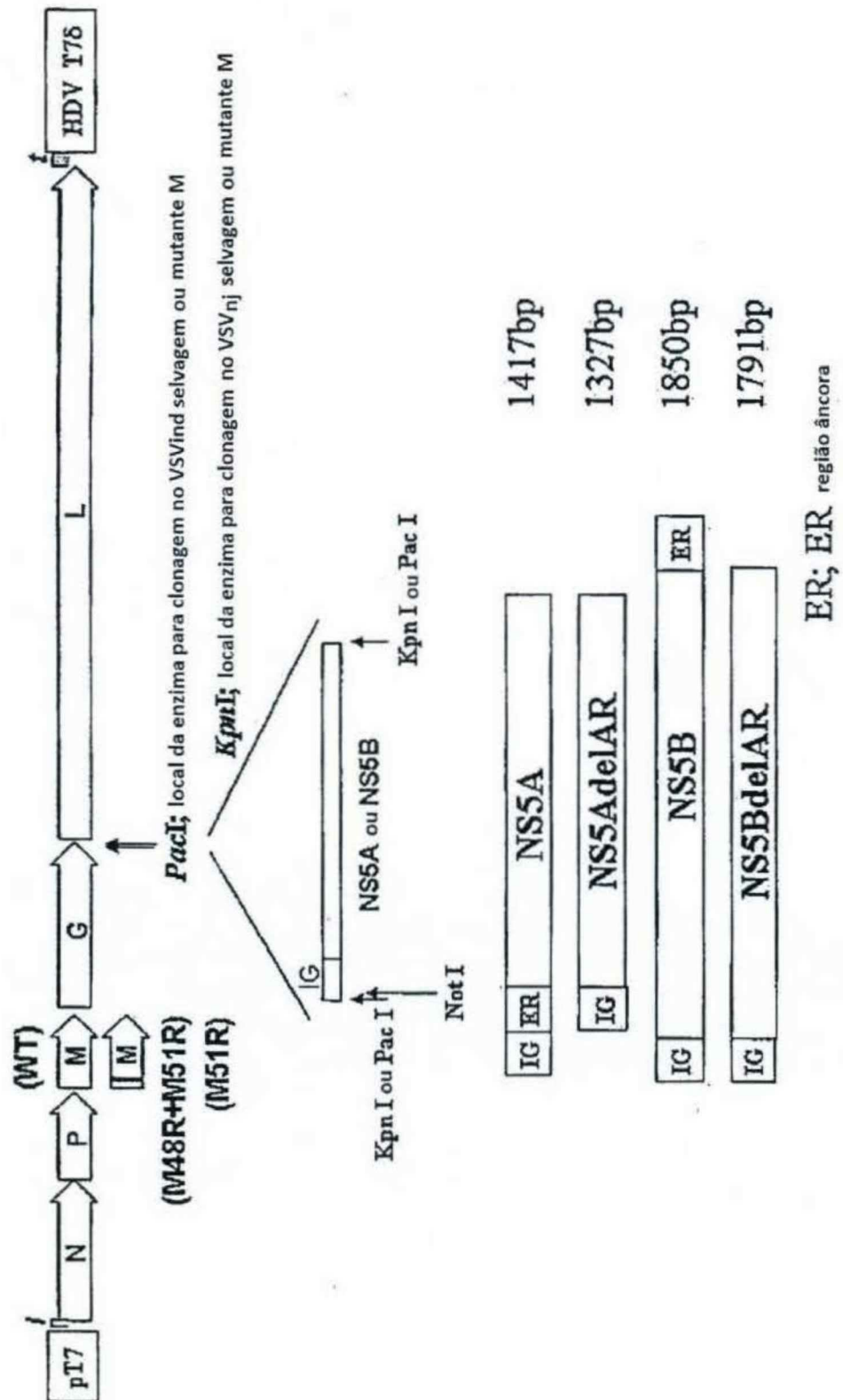


FIGURA 17

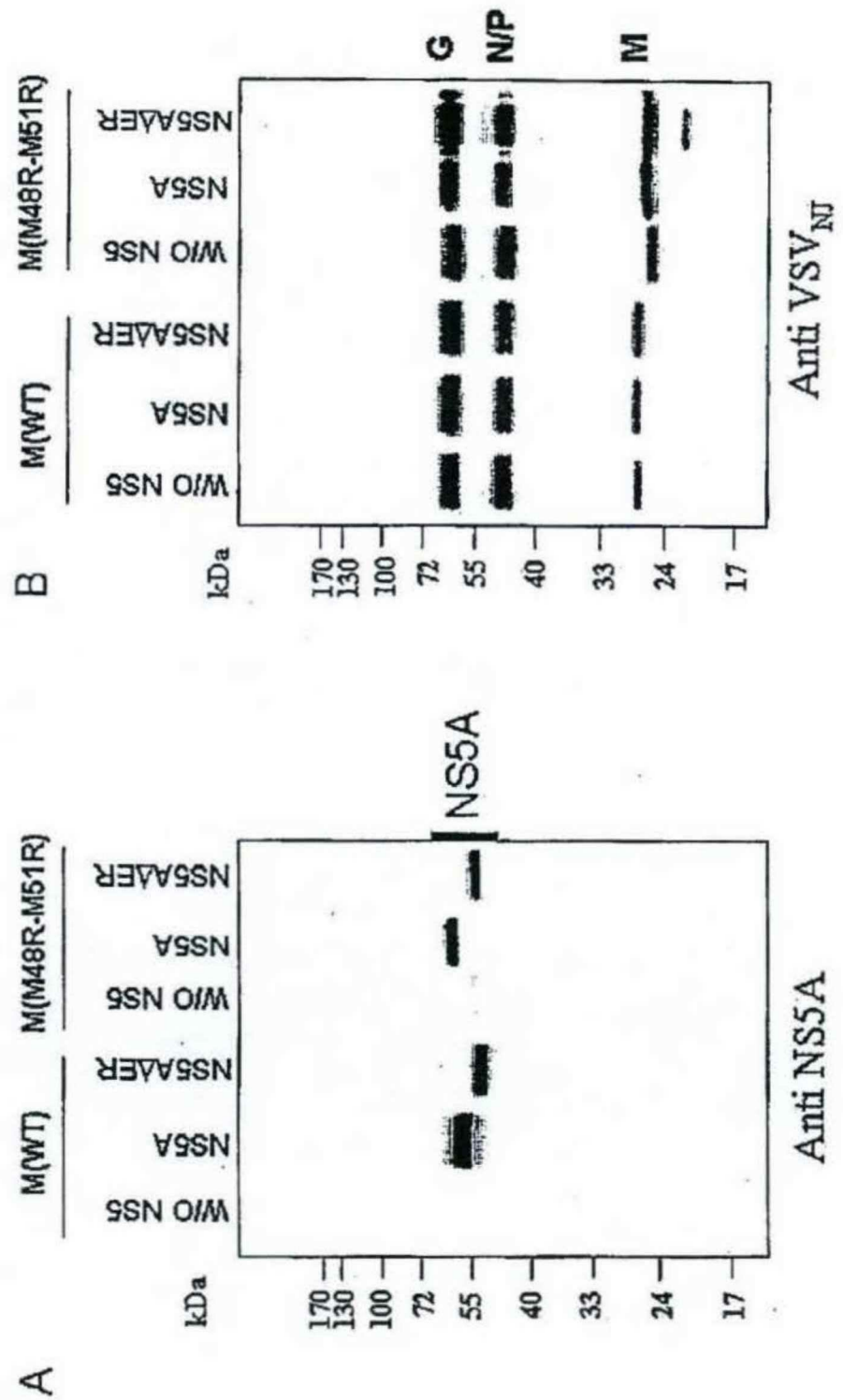
rVSV_{NJ}-NS5A

FIGURA 18

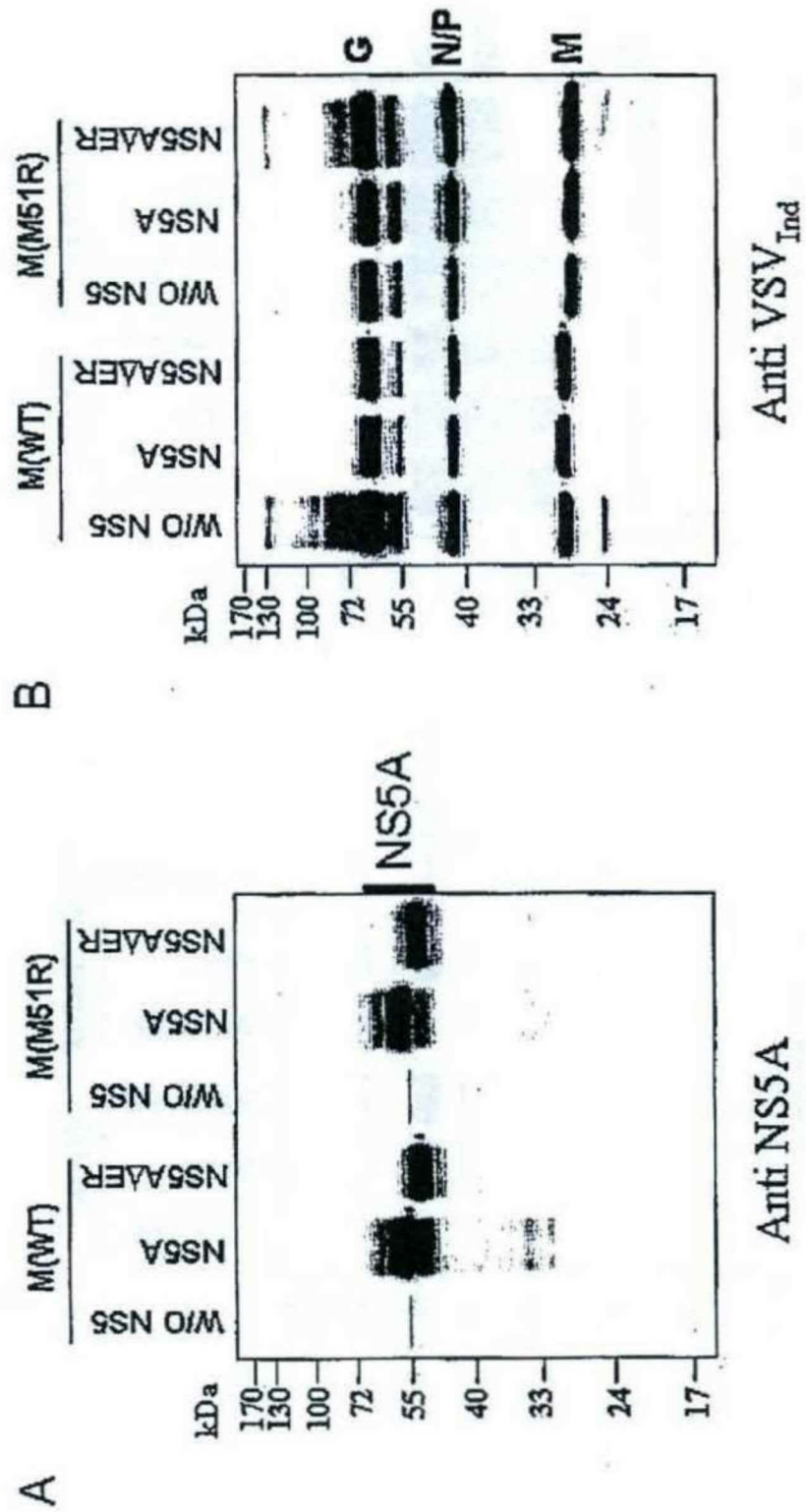
rVSV_{Ind}-NS5A

FIGURA 19

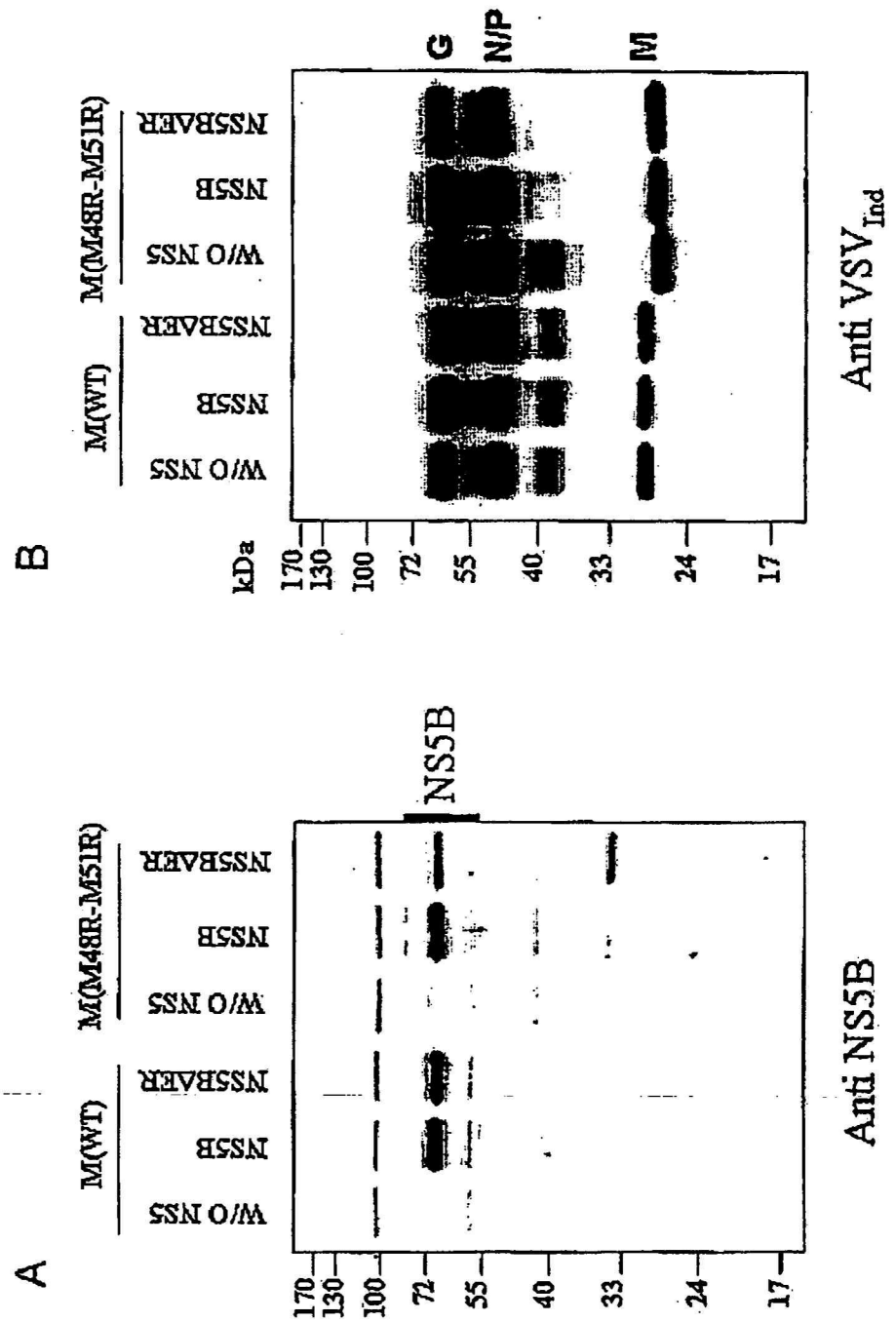
rVSV_{NJ}-NS5B

FIGURA 20

