



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

(21) BR 112019025310-6 A2



(22) Data do Depósito: 06/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

(54) **Título:** CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR PLASMIDIAL DE TRANSFERÊNCIA, CÉLULAS TRANSFORMADAS, PARTÍCULAS DE VÍRUS SARAMPO-VÍRUS ZIKA (MV-ZIKV), COMPOSIÇÃO OU CONJUNTO DE INGREDIENTES ATIVOS, E PROCESSO PARA RECUPERAR PARTÍCULAS DE VÍRUS SARAMPO-VÍRUS ZIKA (MV-ZIKV)

(51) **Int. Cl.:** A61K 39/12; A61K 39/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 07/06/2017 EP 17305676.3.

(71) **Depositante(es):** INSTITUT PASTEUR; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

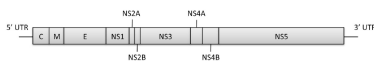
(72) **Inventor(es):** FREDERIC TANGY; ETIENNE SIMON-LORIERE.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2018064943 de 06/06/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/224573 de 13/12/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 29/11/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se aos vírus do sarampo recombinantes que expressam proteínas do vírus Zika e suas aplicações, particularmente na indução da proteção preventiva contra o vírus Zika. A presente invenção é direcionada ao vírus do sarampo recombinante (MV) que expressa pelo menos (i) o precursor da proteína de membrana (prM) de um vírus Zika (ZIKV) e a proteína do envelope (E) de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, e diz respeito às partículas infecciosas recombinantes do referido MV-ZIKV capazes de se replicarem em um hospedeiro após a administração, e diz respeito também às partículas semelhantes a vírus (VLPs) que contêm essas proteínas ZIKV em suas superfícies. A presente invenção fornece meios, particularmente ácidos nucleicos, vetores, células e sistemas de recuperação para produzir essas partículas infecciosas recombinantes e VLPs. A presente invenção também diz respeito ao uso dessas partículas infecciosas recombinantes e/ou VLPs, em particular sob a forma de uma composição, mais particularmente em uma formulação de vacina, para a prevenção de uma infecção por ZIKV ou para a proteção preventiva contra os desfechos clínicos da infecção pelo ZIKV.



“CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR PLASMIDIAL DE TRANSFERÊNCIA, CÉLULAS TRANSFORMADAS, PARTÍCULAS DE VÍRUS SARAMPO-VÍRUS ZIKA (MV-ZIKV), COMPOSIÇÃO OU CONJUNTO DE INGREDIENTES ATIVOS, E PROCESSO PARA RECUPERAR PARTÍCULAS DE VÍRUS SARAMPO-VÍRUS ZIKA (MV-ZIKV)”

[001] A presente invenção refere-se ao vírus do sarampo recombinante que expressa proteínas do vírus Zika e suas aplicações, particularmente na indução da proteção preventiva contra o vírus Zika. A presente invenção é direcionada ao vírus do sarampo (MV) recombinante que expressa pelo menos (i) o precursor da proteína de membrana (prM) de um vírus Zika (ZIKV) e a proteína do envelope (E) de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, e diz respeito às partículas infecciosas recombinantes do referido MV-ZIKV capazes de se replicarem em um hospedeiro após a administração, e diz respeito também às partículas semelhantes a vírus (VLPs) que contêm essas proteínas ZIKV em suas superfícies. A presente invenção fornece meios, em particular ácidos nucleicos, vetores, células e sistemas de recuperação para produzir essas partículas infecciosas recombinantes e VLPs. A presente invenção também se refere ao uso dessas partículas infecciosas recombinantes e/ou VLPs, em particular sob a forma de uma composição, mais particularmente em uma formulação de vacina, para a prevenção de uma infecção por ZIKV ou para a proteção preventiva contra resultados clínicos de infecção por ZIKV.

[002] O ZIKV é um flavivírus emergente transmitido por mosquitos. Embora tenha sido inicialmente isolado em 1947, até o momento não existem tratamentos específicos ou vacinas disponíveis contra a doença causada pelo ZIKV, tornando-a uma doença verdadeiramente negligenciada e emergente. A recente rápida disseminação do ZIKV em regiões anteriormente

não afetadas, como ilhas do Pacífico Sul e América Latina, forneceu fortes evidências epidemiológicas de que a infecção por esse vírus pode estar associada às complicações neurológicas em adultos e a um aumento de malformações cerebrais congênitas graves em recém-nascidos. Consequentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o recente surto de ZIKV uma emergência de saúde pública.

[003] O ZIKV foi inicialmente isolado de um macaco *rhesus* na floresta Zika em Uganda em 1947 (Gubler D.J., *et al.*, Eds. *Fields Virology*, 5^a ed. Filadélfia, PA: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2007: 1155–227; Dick G.W.A., *et al.* *TransR Soc Trop Med Hyg* 1952; 46: 509–20). A primeira infecção humana foi reportada na Nigéria em 1954 (Macnamara F.N. *TransR Soc Trop Med Hyg* 1954; 48: 139–45). Assim como os vírus da dengue e Chikungunya, o ZIKV adaptou-se de um ciclo de transmissão ancestral envolvendo primatas não humanos e um amplo espectro de espécies de mosquitos florestais como vetores para um ciclo urbano envolvendo seres humanos como reservatórios e os mosquitos *Aedes* amplamente distribuídos como vetores (Musso D., *et al.* *Lancet* 2015; 386: 243-44). Desde a década de 1950, o ZIKV só havia sido relatado como circulando esporadicamente na África e no Sudeste Asiático. Em 2007, o ZIKV foi isolado pela primeira vez no Pacífico, na ilha da Micronésia de Yap (Duffy M.R., *et al.* *N Engl J Med* 2009; 360: 2536-43). Entre outubro de 2013 e abril de 2014, a Polinésia Francesa experimentou o maior surto de Zika já registrado na época (Cao-Lormeau, V.M., *et al.* *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 20: 1085–86). Mais de 32.000 pacientes eram suspeitos de infecção por ZIKV. Entre 2014 e 2015, o ZIKV se espalhou para outras ilhas do Pacífico, de maneira notável nas Ilhas Cook e de Páscoa (Chile). Em março de 2015, o Brasil relatou a transmissão autóctone do ZIKV (Zanluca C, *et al.* *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110: 569–72) e 6 meses depois declarou um surto sem precedentes (Dyer O. *BMJ* 2015; 351: h6983)

com estimativas preliminares de 440.000 a 1,3 milhão de casos de infecção até dezembro de 2015 (*European Centre for Disease Prevention and Control*, 10 de dezembro de 2015). Em março de 2016, a infecção pelo ZIKV foi reportada em 43 países e territórios em todo o mundo.

[004] A atual epidemia de Zika é a maior epidemia já registrada para esse vírus (*Abushouk et al. An updated review of Zika virus, J. Clin. Virol.* 2016, 84, 53-58). Embora a infecção pelo ZIKV tenha sido geralmente associada a doenças leves, seu surgimento nas Américas coincidiu com um aumento acentuado nos pacientes que desenvolvem a síndrome de Guillain-Barré. Além disso, a infecção pelo ZIKV foi associada ao nascimento de bebês com complicações neurológicas, em particular a microcefalia congênita (OMS. *Guillain-Barré syndrome – El Salvador. Jan 21, 2016; ECDC. Rapid risk assessment. Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Dec 10, 2015; Soares de Araújo J, et al. Microcephaly in northeast Brazil: a review of 16 208 births between 2012 and 2015*), e foi demonstrado que quando as mulheres grávidas são expostas ao ZIKV durante o primeiro trimestre da gravidez, o risco de microcefalia para o recém-nascido aumenta em 50 vezes de 2/10.000 para 1/100 (*Cauchemez S, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. The Lancet* 2016). Em fevereiro de 2016, a OMS declarou a suspeita de ligação entre o ZIKV e distúrbios neurológicos e malformações neonatais uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional.

[005] Nesse contexto, em março de 2016, especialistas reunidos na OMS concordaram que o desenvolvimento de uma vacina preventiva é uma das principais prioridades para responder às epidemias pelo vírus Zika no futuro. Estratégias pragmáticas foram solicitadas para acelerar o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz. Devido ao vínculo

estabelecido entre a infecção pelo ZIKV e o aparecimento de microcefalia congênita em bebês nascidos de mães infectadas, pode-se argumentar que uma vacina contra o Zika deve ser adequada para uso em mulheres grávidas. Entretanto, nenhuma vacina licenciada é atualmente recomendada para uso durante a gravidez. Além disso, com a associação demonstrada da infecção pelo Zika com a síndrome de Guillain-Barré, a observação de possível transmissão sexual e aparecimento de defeitos no desenvolvimento que provavelmente aparecem muito cedo na gravidez, é muito provável que a vacina seja direcionada à população em geral. De qualquer forma, uma vacina contra o Zika terá que demonstrar um excelente perfil de segurança, principalmente no que se refere ao risco de neurotropismo.

[006] Para permitir o desenvolvimento acelerado de uma vacina contra o Zika, os inventores usaram uma das vacinas mais seguras e eficazes disponíveis, a vacina contra o sarampo vivo atenuado, como vetor de entrega de antígenos protetores do ZIKV para garantir a disponibilidade oportuna de uma vacina preventiva sempre que uma nova epidemia ocorra. Essa tecnologia da plataforma de entrega demonstrou prova de princípio em seres humanos e um histórico pré-clínico de rápida adaptabilidade e eficácia para uma variedade de patógenos. Além disso, o processo de fabricação dessas vacinas baseadas em vetores de sarampo foi otimizado para proporcionar maior rendimento e pureza do que o processo padrão de fabricação de vacinas contra sarampo. Ele usa equipamento padrão e, portanto, se presta a uma maior expansão, bem como à transferência de tecnologia para países de baixa e média renda.

[007] A vacinação contra o sarampo é usada há mais de 40 anos, foi administrada em mais de 1 bilhão de crianças e é aproximadamente 93% eficaz após uma administração e 97% após duas administrações. As cepas atenuadas de vacinas contra sarampo demonstraram ser geneticamente estáveis. A reversão à patogenicidade ou integração no genoma da célula

hospedeira é praticamente impossível e nunca foi observada. Aproveitando essas características, os inventores clonaram anteriormente o vírus da vacina Schwarz contra o sarampo atenuado e desenvolveram um método para manipular geneticamente esse vírus de RNA da fita negativa em um vetor quimérico ou recombinante versátil (Combredet, C. *et al.*, 2003, *J Virol*, 77 (21): 11546-11554).

[008] Uma vacina profilática contra o ZIKV, como em qualquer outro alvo, deve ser segura e eficaz. Além disso, a epidemiologia especial de um vírus rapidamente emergente, afetando países industrializados e em desenvolvimento, e a ameaça de infecções durante a gravidez, causando graves defeitos de nascimento, exigem uma série de recursos adicionais para uma vacina ideal contra o ZIKV.

[009] Suspeita-se fortemente que a infecção pelo ZIKV durante a gravidez cause defeitos congênitos. Embora as vacinas vivas sejam geralmente contraindicadas durante a gravidez, as infecções por sarampo não foram relacionadas a defeitos congênitos (Rasmussen S.A., *et al. Obstet Gynecol.* 2015 Jul;126 (1):163-70), e a aplicação acidental da vacina MMR durante a gravidez não se relacionou a defeitos congênitos do nascimento (Swamy G.K., *et al. Obstet Gynecol.* Jan 2015; 125 (1):212-26). Em contraste com a vacina contra o sarampo de acordo com a invenção, uma abordagem com vacina de Zika vivo atenuado levantaria preocupações de segurança muito significativas se aplicada acidentalmente durante a gravidez. Deve ser seriamente questionado se uma vacina contra o Zika destinada ao uso durante a gravidez pode ser desenvolvida e licenciada em qualquer prazo aceitável para interromper a atual epidemia. Em vez disso, uma vacina para adolescentes com problemas de segurança mínimos para uso acidental durante a gravidez parece ser a intervenção mais prática e realista para eliminar a doença induzida pelo Zika. Uma vacina à base de sarampo atenderia

exatamente esse perfil-alvo.

[010] A abordagem da invenção baseada no sarampo pode atender a todos os critérios relevantes de uma futura vacina contra o ZIKV pelo menos igualmente bem, ou melhor, que as abordagens alternativas. Particularmente, uma vacina contra o ZIKV baseada no vírus do sarampo, sem adjuvante, para crianças, adolescentes e viajantes representa um dos candidatos mais prováveis a serem desenvolvidos em um curto espaço de tempo, possui um excelente perfil de segurança e eficácia e características de produção e custo compatíveis com seu uso também em países com força econômica limitada.

[011] Para esse fim, um caminho de desenvolvimento sequencial foi definido pelos inventores. A primeira etapa foi a construção e caracterização do MV recombinante que expressa pelo menos as proteínas prM-E ou E de ZIKV como antígenos secretados solúveis. A caracterização inclui demonstração da expressão do antígeno Zika, características de crescimento estabelecidas em uma linhagem de células de produção e análise da estabilidade genética. A imunogenicidade pré-clínica e a eficácia protetora da vacina MV-Zika recombinante selecionada foram avaliadas em camundongos CD46-IFNAR suscetíveis à infecção pelo MV. O melhor candidato atualmente selecionado foi avaliado quanto à imunogenicidade e eficácia protetora no modelo de infecção por ZIKV em primatas não humanos.

[012] Os inventores conseguiram a produção de vacinas baseadas em MV replicativo, recombinante e infeccioso recombinadas com polinucleotídeos que codificam pelo menos os antígenos prM-E ou E de ZIKV, que são recuperados quando o vírus recombinante se replica no hospedeiro após a administração. A invenção refere-se assim a um ingrediente ativo da vacina viva contra o ZIKV baseada no vírus do sarampo amplamente utilizado, em particular o sarampo da vacina pediátrica da cepa Schwarz. Em um

exemplo de realização preferido, esta vacina viva MV-ZIKV recombinante produz VLPs de ZIKV por replicação em células infectadas.

[013] O MV é um RNA vírus de fita única de sentido negativo, não segmentado, envelopado, do gênero *Morbillivirus*, dentro da família *Paramyxoviridae*. Este vírus foi isolado em 1954 (Enders, J.F., e Peebles T.C.1954, *Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86: 277-286) e vacinas vivas atenuadas foram derivadas deste vírus desde então para fornecer cepas de vacina, em particular a partir da cepa Schwarz. As vacinas contra o sarampo foram administradas a centenas de milhões de crianças nos últimos 30 anos e comprovaram sua eficácia e segurança. Ela é produzida em larga escala em muitos países e é distribuída a baixo custo. Por todas essas razões, os inventores usaram MVs atenuados para gerar partículas de MV recombinantes que expressam de maneira estável os antígenos prM-E ou E do ZIKV, e são possivelmente capazes de expressar também VLPs.

[014] A invenção refere-se, portanto, a uma construção de ácido nucleico que compreende:

- (1) um polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) o precursor da proteína de membrana (prM) de um vírus Zika (ZIKV) e a proteína do envelope (E) de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma; e
- (2) uma molécula de cDNA que codifica uma fita de RNA(+) antígeno infecciosa, de comprimento total (completa) de um vírus do sarampo (MV);

em que o polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma está operacionalmente

ligado, em particular clonado na molécula de cDNA.

[015] Uma construção de ácido nucleico de acordo com a invenção é, particularmente, uma molécula de DNA purificada, obtida ou que pode ser obtida por recombinação de vários polinucleotídeos de origens diferentes, operacionalmente ligados entre si.

[016] A expressão “operacionalmente ligado” refere-se à ligação funcional existente entre os diferentes polinucleotídeos da construção de ácido nucleico da invenção, de modo que os referidos polinucleotídeos e diferentes construções de ácido nucleico sejam transcritos com eficiência e, se apropriado, traduzidos, especialmente em células ou linhagens de células, especialmente em células ou linhagens de células utilizadas como parte de um sistema de recuperação para a produção de partículas de MV infecciosas quiméricas da invenção ou em células hospedeiras, especialmente em células humanas.

[017] Em um exemplo de realização específico da invenção, a construção é preparada clonando um polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM de um ZIKV e a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, no cDNA que codifica uma fita de RNA(+) antígenômico infecciosa de comprimento total de um MV. Alternativamente, uma construção de ácido nucleico da invenção pode ser preparada usando etapas de síntese de fragmentos de ácido nucleico ou polimerização a partir de um molde, inclusive por PCR.

[018] Em um exemplo de realização específico da invenção, o polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma é clonado em uma ATU (Unidade de Transcrição Adicional) inserido no cDNA do MV. As sequências ATU são conhecidas pelos

técnicos hábeis no assunto e compreendem, para uso em etapas de clonagem em cDNA de MV, sequências de ação *cis* (ou *cis*-atuantes) necessárias para a expressão de um transgene dependente de MV, como um promotor do gene precedente, em cDNA de MV, o inserção representada pelo polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma e um cassete com múltiplos sítios de clonagem para inserção do referido polinucleotídeo.

[019] Quando utilizado para realizar a invenção, a ATU está vantajosamente localizada na sequência N-terminal da molécula de cDNA que codifica a fita de RNA(+) antigenômico completa do MV e está especialmente localizada entre os genes P e M desse vírus ou entre os genes H e L. Foi observado que a transcrição do RNA viral do VM segue um gradiente a partir da extremidade 5' para a extremidade 3'. Isso explica que, quando inserido na extremidade 5' da sequência codificante do cDNA, a ATU permitirá uma expressão mais eficiente da sequência de DNA heteróloga (por exemplo, o polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV, e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma) que ela contém.

[020] O polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, pode, portanto, ser inserido em qualquer região intergênica da molécula de cDNA do MV, particularmente em uma ATU. As construções particulares da invenção são aquelas ilustradas nos exemplos.

[021] Em um exemplo de realização preferido da invenção, o polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a

versão truncada da mesma é inserido na região intergênica dos genes P e M da molécula de cDNA do MV, em particular em uma ATU.

[022] Conforme utilizado na presente invenção, a expressão “codificação”, ou “codificante” define a capacidade das moléculas de ácido nucleico a serem transcritas e, quando apropriado, traduzidas para expressão do produto em células ou linhagens de células selecionadas. Conseqüentemente, a construção de ácido nucleico pode compreender elementos reguladores que controlam a transcrição das sequências codificantes, em particular promotores e sequências terminadoras da transcrição e possivelmente potenciadores/acentuadores (*enhancers*) e outros elementos *cis*-atuantes. Estes elementos reguladores podem ser heterólogos em relação às sequências polinucleotídicas do ZIKV.

[023] O termo “proteína” é usado de modo intercambiável com os termos “antígeno” ou “polipeptídeo”, e define uma molécula resultante de uma concatenação de resíduos de aminoácidos. Em particular, as proteínas divulgadas no pedido se originam do ZIKV e são proteínas estruturais que podem ser idênticas às proteínas nativas ou, alternativamente, que podem ser derivadas das mesmas por mutação, incluindo por substituição (particularmente, por resíduos de aminoácidos conservadores) ou pela adição de resíduos de aminoácidos ou por modificação secundária após a tradução ou por deleção de porções da(s) proteína(s) nativa(s), resultando em fragmentos com tamanho reduzido em relação à proteína nativa de referência. Os fragmentos são englobados na presente invenção, na medida em que eles possuem epítomos da proteína nativa adequados para suscitar uma resposta imunológica em um hospedeiro, em particular, em um hospedeiro humano, preferencialmente uma resposta que permita a proteção contra a infecção causada por ZIKV ou contra doenças associadas ao ZIKV. Os epítomos são, particularmente, epítomos do tipo B envolvidos na suscitação de uma resposta

imunológica humoral através da ativação da produção dos anticorpos em um hospedeiro ao qual a proteína foi administrada, ou no qual ela é expressa após a administração das partículas replicativas infecciosas da invenção. Os epítomos podem ser, alternativamente, do tipo de epítomos T envolvidos na suscitação da resposta imune mediada por célula (resposta CMI). Os fragmentos podem ter um tamanho que representa mais de 50% do tamanho da sequência de aminoácidos da proteína nativa do ZIKV, preferencialmente pelo menos 90% ou 95%. Alternativamente, os fragmentos podem ser polipeptídeos curtos com pelo menos 10 resíduos de aminoácidos, que abrigam epítomo(s) da proteína nativa. Os fragmentos, sob este aspecto, também incluem poli epítomos, conforme definido no presente documento.

[024] Em um exemplo de realização específico da invenção, a referida construção de ácido nucleico está de acordo com a regra dos seis (6) do genoma do MV, ou seja, o polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, tomada em conjunto com a molécula de cDNA que codifica a fita de RNA(+) antigenômico infecciosa de comprimento total do MV, consiste em vários nucleotídeos que é um múltiplo de seis.

[025] A organização do genoma dos vírus do sarampo e seus processos de replicação e transcrição foram totalmente identificados no estado da técnica, e estão especialmente divulgados em Horikami S.M. e Moyer S.A. *Curr. Top. Microbial. Immunol.* (1995) 191, 35-50 ou em Combredet C. *et al* (*Journal of Virology*, Novembro de 2003, p 11546-11554), para a cepa de vírus de vacina Schwarz ou para vírus de RNA de sentido negativo amplamente considerado, em Neumann G. *et al* (*Journal of General Virology* (2002) 83, 2635-2662).

[026] A “regra dos seis” é expressa no fato de que o número total

de nucleotídeos presentes em um ácido nucleico representando o genoma do RNA fita (+) do MV ou nas construções de ácido nucleico compreendendo o mesmo é um múltiplo de seis. A “regra dos seis” tem sido reconhecida no estado da técnica como um requisito em relação ao número total de nucleotídeos no genoma do vírus do sarampo, que permite a replicação eficiente ou otimizada do RNA genômico do MV. Nos exemplos de realização da presente invenção que definem uma construção de ácido nucleico que atende à regra dos seis, a referida regra se aplica à construção de ácido nucleico especificando o cDNA que codifica o genoma do RNA fita (+) do MV completo e todas as sequências inseridas, quando tomadas individualmente ou coletivamente. Sob este aspecto, a regra dos seis se aplica individualmente ao cDNA que codifica a sequência de nucleotídeos da fita de RNA antigenômico (+) infecciosa completa do vírus do sarampo, e possivelmente o polinucleotídeo clonado no referido cDNA e que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV, e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma.

[027] Em um exemplo de realização específico da invenção, a construção de ácido nucleico compreende os seguintes polinucleotídeos de 5' para 3':

- (a) um polinucleotídeo que codifica a proteína N do MV,
- (b) um polinucleotídeo que codifica a proteína P do MV,
- (c) o polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma;
- (d) um polinucleotídeo que codifica a proteína M do MV,
- (e) um polinucleotídeo que codifica a proteína F do MV,
- (f) um polinucleotídeo que codifica a proteína H do MV; e

(g) um polinucleotídeo que codifica a proteína L do MV, em que os referidos polinucleotídeos estão operacionalmente ligados na construção de ácido nucleico e estão sob o controle das sequências reguladoras de transcrição e replicação viral, tal como o líder MV e as sequências *trailer*.

[028] As expressões “proteína N”, “proteína P”, “proteína M”, “proteína F”, “proteína H” e “proteína L” referem-se, respectivamente, à nucleoproteína (N), à fosfoproteína (P), à proteína matriz (M), à proteína de fusão (F), à proteína hemaglutinina (H) e à proteína grande da RNA polimerase (L) de um vírus do sarampo. Esses componentes foram identificados na técnica anterior e são especialmente divulgados em Fields, *Virology* (Knipe & Howley, 2001).

[029] Em um exemplo de realização preferido da invenção, o vírus do sarampo é uma cepa de vírus atenuado.

[030] Uma “cepa atenuada” do vírus do sarampo é definida como uma cepa que é avirulenta ou menos virulenta do que a cepa original/parental no mesmo hospedeiro, mantendo ao mesmo tempo a imunogenicidade e, possivelmente, a adjuvância, quando administrado em um hospedeiro, ou seja, preservando os epítomos imunodominantes de célula T e B e, possivelmente, a adjuvância, como a indução de proteínas coestimulatórias de células T ou da citocina IL-12.

[031] Uma cepa atenuada de um vírus do sarampo, portanto, refere-se a uma cepa que sofreu passagens seriadas nas células selecionadas e que, possivelmente, foi adaptada em outras células para produzir cepas de semeadura adequadas para a preparação das cepas de vacina, abrigando um genoma estável que não permita a reversão para a patogenicidade e nem a integração nos cromossomos hospedeiros. Como exemplo específico de cepa “atenuada”, uma cepa aprovada para uma vacina é uma cepa atenuada

adequada para a invenção quando ela atende aos critérios definidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), ou seja, quando ela atende aos critérios de segurança, eficácia, qualidade e reprodutibilidade, após rigorosas revisões dos dados laboratoriais e clínicos (www.fda.gov/cber/vaccine/vacappr.htm).

[032] Cepas particulares que podem ser usadas para implementar a presente invenção e especialmente para derivar o cDNA de MV da construção de ácido nucleico são a cepa Schwarz, cepa Zagreb, cepa AIK-C e cepa Moraten. Todas estas cepas foram descritas na técnica anterior e o acesso a elas é particularmente fornecido como vacinas comerciais.

[033] De acordo com um exemplo de realização específico da invenção, a molécula de cDNA é colocada sob o controle de sequências de controle da expressão heterólogas. A inserção de tal controle para a expressão do cDNA é favorável quando a expressão desse cDNA é desejada em tipos celulares que não permitem a transcrição completa do cDNA com as suas sequências de controle nativas.

[034] De acordo com um exemplo de realização específico da invenção, a sequência controle de expressão heteróloga compreende o promotor T7 e as sequências terminadoras T7. Essas sequências estão respectivamente localizadas a 5' e 3' da sequência codificante da fita de RNA(+) antigenômico completa do MV e das sequências adjacentes ao redor dessa sequência codificante.

[035] Em um exemplo de realização específico da invenção, a molécula de cDNA, que é definida acima, é modificada, ou seja, ela compreende sequências nucleotídicas ou motivos.

[036] Em um exemplo de realização preferido, a molécula de cDNA da invenção compreende ainda, em sua extremidade 5', adjacente ao primeiro nucleotídeo da sequência de nucleotídeos que codifica a fita de RNA(+) antigenômico completa da cepa de vacina do MV aprovada, uma

porção GGG seguida por uma sequência de ribozima com motivo tipo cabeça de martelo (*hammerhead*) e que compreende, em sua extremidade 3', adjacente ao último nucleotídeo da referida sequência de nucleotídeos que codifica a fita de RNA(+) antígenômico completa, a sequência de uma ribozima. A ribozima do vírus da hepatite delta (δ) é adequada para realizar a invenção.

[037] A porção GGG colocada na extremidade 5', adjacente ao primeiro nucleotídeo da sequência codificante acima, melhora a eficiência de transcrição da referida sequência codificante do cDNA. Como um requisito para a montagem adequada das partículas virais do sarampo está o fato de que o cDNA que codifica o RNA antígenômico (+) está de acordo com a regra dos seis, quando a porção GGG é adicionada, uma ribozima também é adicionada na extremidade 5' da sequência codificante do cDNA, 3' a partir da porção GGG, a fim de permitir a clivagem do transcrito no primeiro nucleotídeo codificante da fita de RNA(+) antígenômico completa do MV.

[038] Em exemplo de realização particular da invenção, a fim de preparar a construção de ácido nucleico da invenção, a preparação de uma molécula de cDNA que codifica o RNA antígenômico (+) completo de um MV divulgada na técnica anterior é alcançada por métodos conhecidos. O referido cDNA fornece especialmente o vetor genoma quando ele é inserido em um vetor, tal como um plasmídeo.

[039] Uma molécula de cDNA particular adequada para a preparação da construção de ácido nucleico da invenção é aquela obtida usando a cepa Schwarz do vírus do sarampo. Portanto, o cDNA usado na presente invenção pode ser obtido, conforme divulgado no documento WO 2004/000876, ou ele pode ser obtido a partir do plasmídeo pTM-MVSchw depositado pelo Instituto Pasteur na Coleção Nacional Francesa de Culturas de Micro-organismos (*Collection Nationale de Culture des Microorganismes* – CNCM) sob número 1-2889, em 12 de junho de 2002, cuja sequência é

divulgada no documento W02004/000876, incorporado na presente invenção por referência. O plasmídeo pTM-MV Schw foi obtido a partir de um plasmídeo *Bluescript* e compreende o polinucleotídeo que codifica a fita de RNA (+) do vírus do sarampo completo da cepa Schwarz colocada sob o controle do promotor da RNA polimerase T7. Ele tem 18967 nucleotídeos e uma sequência representada como SEQ ID NO: 1. As moléculas de cDNA (também designadas como cDNA do vírus do sarampo ou cDNA do MV, por conveniência) de outras cepas de MV, podem ser obtidas da mesma forma a partir do ácido nucleico purificado a partir de partículas virais do MV atenuado, como aquelas descritas no presente documento.

[040] O cDNA usado na presente invenção também pode ser obtido a partir do plasmídeo pTM2-MV Schw-gfp depositado pelo Instituto Pasteur na Coleção Nacional Francesa de Culturas de Micro-organismos (*Collection Nationale de Culture des Microorganismes – CNCM*), 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, França, sob o número I-2890 em 12 de junho de 2002. Ele possui 19795 nucleotídeos e uma sequência representada como SEQ ID NO: 2. Este plasmídeo contém a sequência que codifica o marcador eGFP que pode ser deletado.

[041] A construção de ácido nucleico da invenção é adequada e destina-se à preparação de vírus do sarampo–vírus Zika (MV-ZIKV) replicativo, infeccioso e recombinante e, conseqüentemente, a referida construção de ácido nucleico é destinada à inserção em um vetor de genoma de transferência que, como resultado, compreende a molécula de cDNA do vírus do sarampo, especialmente da cepa Schwarz, para a produção do referido MV-ZIKV e rendimento pelo menos (i) da proteína prM do ZIKV e proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, em particular as VLPs de ZIKV. O plasmídeo pTM-MV Schw ou o plasmídeo pTM2-MV Schw é adequado para preparar o vetor de transferência,

pela inserção do(s) polinucleotídeo(s) ZIKV necessário(s) para a expressão de pelo menos; (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E de o ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma. As partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes podem ser recuperadas a partir de células auxiliares de recuperação ou em células de produção e podem opcionalmente ser recuperadas com VLP que expressa os antígenos de ZIKV divulgados de acordo com a invenção.

[042] A invenção também está relacionada a um vetor de transferência, que é usado para a preparação de partículas de MV-ZIKV recombinantes quando resgatadas de células auxiliares. Vantajosamente, o vetor de transferência da invenção é um vetor plasmidial de transferência adequado para transfecção das referidas células auxiliares ou células de produção, compreendendo a construção de ácido nucleico da invenção e, em particular, é um plasmídeo obtido a partir de um plasmídeo *Bluescript*, como o pMV- ZIKV.

[043] Em um exemplo de realização específico da invenção, o vetor plasmidial de transferência tem a sequência de SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166 ou SEQ ID NO: 167, preferencialmente tem a sequência de SEQ ID NO: 165.

[044] A invenção também envolve o uso do vetor de transferência para transformar células adequadas para a recuperação de partículas virais de MV-ZIKV, particularmente para transfectar ou para transduzir tais células, respectivamente, com plasmídeos, ou com vetores virais que carregam a construção de ácido nucleico da invenção, com as ditas células sendo selecionadas pela sua capacidade de expressar as proteínas do vírus do sarampo necessárias para a replicação, transcrição e encapsidação apropriadas do genoma recombinante do vírus que corresponde à construção de ácido nucleico da invenção em partículas de MV-ZIKV replicantes,

infecciosas e recombinantes.

[045] Em um exemplo de realização preferido, a invenção diz respeito às células transformadas compreendendo inserido em seu genoma a construção de ácido nucleico de acordo com a invenção ou compreendendo o vetor plasmidial de transferência de acordo com a invenção, em que as referidas células são, em particular, células eucarióticas, como células aviárias, em particular células CEF, células de mamíferos, como células HEK293 ou células de levedura.

[046] Dessa forma, os polinucleotídeos estão presentes nas referidas células, que codificam proteínas que incluem, particularmente, as proteínas N, P e L de um vírus do sarampo (ou seja, proteínas de MV nativas ou variantes funcionais das mesmas capazes de formar complexos de ribonucleoproteína (RNP)), preferencialmente como proteínas estavelmente expressas pelo menos para as proteínas N e P funcionais na transcrição e na replicação das partículas virais de MV-ZIKV. As proteínas N e P podem ser expressas nas células a partir de um plasmídeo que compreende as suas sequências codificantes, ou podem ser expressas de uma molécula de DNA inserida no genoma da célula. A proteína L pode ser expressa a partir de um plasmídeo diferente. Ela pode ser expressa transitoriamente. A célula auxiliadora também é capaz de expressar uma RNA polimerase adequada para permitir a síntese do RNA recombinante derivado da construção de ácido nucleico da invenção, possivelmente como uma RNA polimerase estavelmente expressa. A RNA polimerase pode ser a polimerase do fago T7, ou sua forma nuclear (nlsT7).

[047] Em um exemplo de realização, o clone do cDNA de um vírus do sarampo é da mesma cepa de MV que da proteína N e/ou a proteína P e/ou a proteína L. Em outro exemplo de realização, o clone do cDNA de um MV é de uma cepa diferente do que a da proteína N e/ou proteína P e/ou proteína

L.

[048] Assim, a invenção refere-se a um processo para a preparação de partículas do vírus do sarampo (MV) infecciosas e recombinantes, compreendendo:

- 1) transferir, particularmente transfectar, a construção de ácido nucleico da invenção ou o vetor de transferência contendo tal construção de ácido nucleico em uma linhagem de célula auxiliar que também expressa as proteínas necessárias para a transcrição, replicação e encapsidação da sequência de RNA(+) antigenômico do MV a partir de seu cDNA e sob condições que permitem a montagem das partículas virais, e
- 2) recuperar as partículas de MV-ZIKV infecciosas recombinantes que expressam pelo menos (i) a proteína prM de um ZIKV e a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada desta; ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada desta proteína.

[049] De acordo com um exemplo de realização específico, esse processo compreende:

- 1) transfectar células auxiliares com uma construção de ácido nucleico de acordo com a invenção e com um vetor de transferência, em que as referidas células auxiliares são capazes de expressar funções auxiliares para expressar uma RNA polimerase, e para expressar as proteínas N, P e L de um vírus MV;
- 2) cocultivar as referidas células auxiliares transfectadas da etapa 1) com células passadas apropriadas para a passagem da cepa atenuada do MV, do qual o cDNA se

origina;

- 3) recuperar as partículas de MV-ZIKV infecciosas recombinantes que expressam pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma; ou (ii) a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma.

[050] De acordo com outro exemplo de realização específico, o método para a produção do vírus MV-ZIKV infeccioso recombinante compreende:

- 1) recombinar uma célula ou uma cultura de células que produz de maneira estável uma RNA polimerase, a proteína N de um MV e a proteína P de um MV, com uma construção de ácido nucleico da invenção e com um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma proteína L de um MV, e
- 2) recuperar o vírus MV-ZIKV infeccioso a partir da referida célula recombinante ou da cultura de células recombinantes.

[051] Em um exemplo de realização específico do referido processo, são produzidos MV recombinantes, que expressam pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, em particular as VLPs de ZIKV que expressam a(s) mesma(s) proteína(s) do ZIKV.

[052] De preferência, a invenção se refere a um processo para recuperar partículas do vírus do sarampo-vírus Zika (MV-ZIKV) infecciosas recombinantes que expressam pelo menos (i) o precursor da proteína de membrana (prM) de um ZIKV e a proteína do envelope (E) de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão

truncada da mesma e VLPs de ZIKV expressando a(s) mesma(s) proteína(s) ZIKV, compreendendo:

- 1) cotransfectar as células auxiliares, particularmente as células auxiliares HEK293, que expressam estavelmente a RNA polimerase T7, e as proteínas N e P do sarampo com (i) um vetor plasmidial de transferência de acordo com a presente invenção e com (ii) um vetor, especialmente um plasmídeo, que codifica a L polimerase do MV;
- 2) cultivar as referidas células auxiliares co-transfectadas sob condições que permitam a produção do vírus MV-ZIKV recombinante;
- 3) propagar o vírus recombinante assim produzido pelo cocultivo das referidas células auxiliares da etapa 2) com células que permitam a referida propagação, tal como células Vero;
- 4) recuperar as partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes que expressam pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma; ou (ii) a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma, e VLPs de ZIKV expressando a(s) mesma(s) proteína(s) de ZIKV.

[053] De acordo com um exemplo de realização específico do referido processo, o vetor plasmidial de transferência tem a sequência de SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166 ou SEQ ID NO: 167, preferencialmente tem a sequência de SEQ ID NO: 165.

[054] Conforme utilizado na presente invenção, “recombinação” significa introduzir pelo menos um polinucleotídeo em uma célula, por exemplo, sob a forma de um vetor, com o referido polinucleotídeo se integrando (total ou

parcialmente) ou não se integrando no genoma da célula (tal como definido acima).

[055] De acordo com um exemplo de realização específico, a recombinação pode ser obtida com um primeiro polinucleotídeo, o qual é a construção de ácido nucleico da invenção. A recombinação pode, também ou alternativamente, englobar a introdução de um polinucleotídeo, que é um vetor que codifica uma proteína grande (proteína L) da RNA polimerase de um vírus do sarampo (MV), cuja definição, natureza e estabilidade de expressão foram descritos no presente documento.

[056] De acordo com a invenção, a célula ou as linhagens celulares, ou uma cultura de células produzindo de maneira estável uma RNA polimerase, uma nucleoproteína (N) de um vírus do sarampo e uma fosfoproteína do cofator da polimerase (P) de um vírus do sarampo é uma célula ou linhagem celular, tal como definido no presente relatório descritivo, ou uma cultura de células, conforme definido no presente relatório descritivo, ou seja, também são células recombinantes, na medida em que elas foram modificadas pela introdução de um ou mais polinucleotídeos, conforme definido acima. Em um exemplo de realização particular da invenção, a célula ou a linhagem celular ou a cultura de células, produzindo de maneira estável a RNA polimerase, as proteínas N e P, não produz a proteína L de um vírus do sarampo, ou não produz de maneira estável a proteína L de um vírus do sarampo, por exemplo, permitindo a sua expressão ou produção transitória.

[057] A produção de partículas recombinantes de MV-ZIKV replicantes e infecciosas da invenção pode envolver uma transferência de células transformadas, conforme descrito no presente documento. O termo “transferência”, conforme utilizado na presente invenção, refere-se ao plaqueamento das células recombinantes em um tipo diferente de células, e particularmente em monocamadas de um tipo diferente de células. Essas

últimas células são competentes para sustentar a replicação e a produção do vírus MV-ZIKV infeccioso, ou seja, respectivamente a formação de vírus infecciosos dentro da célula e, possivelmente, a liberação desses vírus infecciosos para fora das células. Essa transferência resulta no cocultivo das células recombinantes da invenção com células competentes, conforme definido na sentença anterior. A transferência acima pode ser uma etapa adicional, ou seja, opcional, quando as células recombinantes não são uma cultura produtora de vírus eficiente, ou seja, quando o vírus MV-ZIKV infeccioso não pode ser eficientemente recuperado a partir dessas células recombinantes. Essa etapa é introduzida após a recombinação adicional das células recombinantes da invenção com a construção de ácido nucleico da invenção e, opcionalmente, um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma proteína grande da RNA polimerase (L) de um vírus do sarampo.

[058] Em um exemplo de realização específico da invenção, uma etapa de transferência é necessária, uma vez que as células recombinantes, geralmente escolhidas pela sua capacidade de recombinar facilmente, não são eficientes o suficiente na sustentação e produção do vírus MV-ZIKV recombinante infeccioso. No referido exemplo de realização, a célula, linhagem de células ou cultura de células da etapa (1) dos métodos definidos acima é uma célula, linhagem de células ou cultura de células recombinante, de acordo com a invenção.

[059] As células adequadas para a preparação das células recombinantes da invenção são células procarióticas ou eucarióticas, particularmente células de animais ou vegetais, e mais particularmente células de mamíferos, tal como células humanas ou células de mamíferos não humanos, ou células de aves ou células de levedura. Em um exemplo de realização específico, as células, antes da recombinação de seus genomas, são isoladas a partir de uma cultura primária ou de uma linhagem celular. As

células da invenção podem ser células em divisão ou células que não se encontram em divisão.

[060] De acordo com um exemplo de realização preferido, as células auxiliares são derivadas da linhagem celular do rim embrionário humano 293, depositada na ATCC sob o N^o. CRL-1573. De modo particular, a linhagem de células 293 é a linhagem celular divulgada no documento WO 2008/078198, e é referida nos exemplos a seguir.

[061] De acordo com outro aspecto desse processo, as células adequadas para passagem são as células CEF. As células CEF podem ser preparadas a partir de ovos de galinha fertilizados, tal como é obtido da EARL Morizeau, 8 rue Moulin, 28190 Dangers, França, ou de qualquer outro produtor de ovos de galinha fertilizados.

[062] O processo que é divulgado de acordo com a presente invenção é usado vantajosamente para a produção de partículas de MV-ZIKV replicantes e infecciosas e opcionalmente VLPs expressando antígenos ZIKV apropriadas para uso como composições de imunização.

[063] Assim, a invenção refere-se a uma composição imunogênica cujo princípio ativo compreende partículas de MV-ZIKV replicantes e infecciosas recuperadas a partir da construção de ácido nucleico da invenção e, particularmente, obtidas pelo processo divulgado.

[064] A construção de ácido nucleico da invenção e o MV-ZIKV da invenção codificam ou expressam pelo menos (i) a proteína prM de um ZIKV e a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma.

[065] Por “proteína de um ZIKV” entende-se uma “proteína” conforme definido na presente invenção, cuja sequência é idêntica a uma contraparte em uma cepa de ZIKV, incluindo um polipeptídeo que é um polipeptídeo nativo maduro ou precursor de uma proteína de ZIKV ou é um

fragmento do mesmo ou um mutante do mesmo, conforme definido na presente invenção. Na presente invenção, uma “proteína de um ZIKV” é em particular um antígeno (prM ou E ou seus derivados, conforme divulgada na presente invenção) projetada usando uma sequência de consenso para o ZIKV. Em particular, o referido antígeno é projetado usando a sequência consensual de aminoácidos do vírus Zika, como a observada em circulação a partir de 2015 em diante, principalmente para incluir a alteração S139N que gerou um novo potencial sítio de glicosilação de N na prM que estava ausente na linhagem africana, e a alteração V763M em E. Assim, os inventores incluíram esta mutação S139N que estava presente em todas as sequências de linhagens asiáticas, mas não incluíam mutações únicas em isolados particulares. Os inventores observaram que a sequência de aminoácidos da cepa asiática BeH818995 (GenBank: KU365777) correspondia à sequência de aminoácidos consensual dos vírus Zika, como observada em circulação a partir de 2015 em diante.

[066] Em particular, um fragmento ou um mutante possui pelo menos 50%, pelo menos 80%, em particular com vantagem pelo menos 90% ou preferencialmente pelo menos 95% de identidade de sequência de aminoácidos com uma proteína do capsídeo ou do envelope do ZIKV que ocorre naturalmente. A identidade da sequência de aminoácidos pode ser determinada por alinhamento por um técnico no assunto usando alinhamentos manuais ou usando os diversos programas de alinhamento disponíveis. Os fragmentos ou mutantes de proteínas ZIKV da invenção podem ser definidos em relação às sequências de aminoácidos particulares ilustradas na presente invenção.

[067] De acordo com um exemplo de realização preferido, a invenção também diz respeito a modificações e otimização do polinucleotídeo para permitir uma expressão eficiente de pelo menos (i) prM de ZIKV e proteína

E de ZIKV ou a versão truncada da mesma; ou (ii) a proteína E de ZIKV ou a versão truncada da mesma, na superfície de partículas infecciosas quiméricas de MV-ZIKV no hospedeiro, em particular no hospedeiro humano.

[068] De acordo com esse exemplo de realização, a otimização da sequência polinucleotídica pode funcionar evitando os domínios *cis*-atuantes das moléculas de ácidos nucleicos: as TATA-boxes, os sítios *chi* e os sítios de entrada ribossomais; trechos com sequências ricas em AT ou ricas em GC; os elementos de sequência ARE, INS ou CRS; as sequências de repetição e as estruturas secundárias de RNA; sítios doadores e aceptores de *splice* críptico e pontos de ramificação.

[069] Os polinucleotídeos otimizados também podem ser códon-otimizados para a expressão em um tipo celular específico. Essa otimização permite aumentar a eficiência da produção de partículas infecciosas quiméricas nas células, sem afetar a(s) proteína(s) expressa(s).

[070] Em um exemplo de realização específico da invenção, o polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma foi otimizado para a utilização preferencial de códons (*codon usage*) de *Macaca* ou foi otimizado para a utilização preferencial de códons de humanos.

[071] A otimização do polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma pode ser realizada por modificação da posição de oscilação nos códons sem afetar a identidade do resíduo de aminoácido traduzido do referido códon em relação ao original.

[072] A otimização também é realizada para evitar sequências semelhantes à edição do vírus sarampo. A edição da transcrição do vírus do

sarampo é um processo que ocorre em particular na transcrição codificada pelo gene P do vírus do sarampo. Esta edição, pela inserção de resíduos G adicionais em um sítio específico no transcrito P, dá origem a uma nova proteína truncada em comparação com a proteína P. A adição de apenas um único resíduo G resulta na expressão da proteína V, que contém um terminal carboxila único (Cattaneo R *et al.*, *Cell*. 1989, 10 de março; 56 (5):759-64).

[073] Em um exemplo de realização específico da invenção, as sequências do tipo edição de sarampo foram excluídas do referido polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma. As seguintes sequências do tipo edição do vírus do sarampo podem ser modificadas: AAAGGG, AAAAGG, GGGAAA, GGGGAA, TTAAA, AAAA, bem como suas sequências complementares: TTCCCC, TTTCCC, CCTTTT, CCCCTT, TTAA, TTTT. Por exemplo, a sequência AAAGGG pode ser modificada em AAAGGC, a sequência AAAAGG pode ser modificada em AGAAGG ou em TAAAGG ou em GAAAGG, e a sequência GGGAAA em GCGAAA.

[074] Em um exemplo de realização específico da invenção, as sequências nucleotídicas nativas e códon-otimizadas do polinucleotídeo que codifica peptídeos/proteínas/antígeno particulares, bem como as sequências de aminoácidos desses peptídeos/proteínas/antígeno da invenção são as sequências divulgadas como SEQ ID NOs: 3-164 e mencionadas na Tabela 1 abaixo. Essas sequências também estão representadas nas Figuras 3A-3D.

[075] Em um exemplo de realização específico da invenção, o vetor plasmidial de transferência pTM2-MV Schw_A1_Zikasp_ZikaprME tem a sequência otimizada da SEQ ID NO: 165, o vetor plasmidial de transferência pTM2-MV Schw_insert 4 tem a sequência nativa de SEQ ID NO: 166 e o vetor plasmidial de transferência pTM2-MV Schw_insert 5 tem a sequência nativa de

SEQ ID NO: 167, conforme mencionado na Tabela 1 abaixo.

[076] Em um exemplo de realização específico da invenção, as sequências nucleotídicas nativas e códon-otimizadas do polinucleotídeo que codifica peptídeos/proteínas/antígeno particulares, bem como as sequências de aminoácidos desses peptídeos/proteínas/antígeno da invenção são as sequências divulgadas como SEQ ID NOs: 168-171 e mencionadas na Tabela 1 abaixo. A inserção 4 (SEQ ID NO: 169) é semelhante à Zikasp_Zika_prMEd404 (SEQ ID NO: 54), mas com um sp mais curto em 5'. A inserção 5 (SEQ ID NO: 171) é semelhante à Zikasp'_ZikaEd445 (SEQ ID NO: 75), mas com duas pequenas diferenças em 5'.

TABELA 1

SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS NATIVAS E CÓDON-OTIMIZADAS DO POLINUCLEOTÍDEO QUE CODIFICA PEPTÍDEOS/PROTEÍNAS PARTICULARES, BEM COMO SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DESSES PEPTÍDEOS/PROTEÍNAS UTILIZADAS NA PRESENTE INVENÇÃO.

Nome do Composto, ou seja, peptídeo/proteína/antígeno (abreviação)	SEQ ID NO da sequência nucleotídica nativa do polinucleotídeo codificante do composto	SEQ ID NO da sequência nucleotídica códon-otimizada do polinucleotídeo codificante do composto	SEQ ID NO da sequência de aminoácidos do composto
Peptídeo sinal da cápside de ZIKV (sp)	3	4	5
Peptídeo sinal da proteína de membrana de ZIKV (sp')	6	7	8
Peptídeo sinal da cápside de JEV (JEVsp)	9	10	11
Peptídeo sinal da proteína de fusão de MV (MVsp)	12	13	14
Peptídeo sinal modificado da proteína de fusão de MV (MVsp')	15	16	17
Precursor da proteína de membrana (prM) de ZIKV	18	19	20
Proteína E completa de ZIKV	21	22	23
Proteína E de ZIKV truncada na posição do aminoácido 456 (Ed456)	24	25	26

Nome do Composto, ou seja, peptídeo/proteína/antígeno (abreviação)	SEQ ID NO da sequência nucleotídica nativa do polinucleotídeo codificante do composto	SEQ ID NO da sequência nucleotídica códon-otimizada do polinucleotídeo codificante do composto	SEQ ID NO da sequência de aminoácidos do composto
Proteína E de ZIKV truncada na posição do aminoácido 445 (Ed445)	27	28	29
Proteína E de ZIKV truncada na posição do aminoácido 404 (Ed404)	30	31	32
Região de haste E de ZIKV	33	34	35
Domínio intermediário entre as regiões de haste E e âncora E de ZIKV	36	37	38
Região âncora E de ZIKV	39	40	41
Transmembrana (TM) e cauda intracitoplasmática da proteína F de MV	42	43	44
Proteína Zikasp_ZikaprME (A1)	45	46	47
Proteína Zikasp_Zika_prMEd456 (A2)	48	49	50
Proteína Zikasp_Zika_prMEd445 (A3)	51	52	53
Proteína Zikasp_Zika_prMEd404 (A4)	54	55	56
Proteína Zikasp_ZikaE (A5)	57	58	59
Proteína Zikasp_ZikaEd456 (A6)	60	61	62
Proteína Zikasp_ZikaEd445 (A7)	63	64	65
Proteína Zikasp_ZikaEd404 (A8)	66	67	68
Proteína Zikasp'_ZikaE (A9)	69	70	71
Proteína Zikasp'_ZikaEd456 (A10)	72	73	74
Proteína Zikasp'_ZikaEd445 (A11)	75	76	77
Proteína Zikasp'_ZikaEd404 (A12)	78	79	80
Proteína JEVsp_ZikaprME (B1)	81	82	83
Proteína JEVsp_Zika_prMEd456 (B2)	84	85	86
Proteína JEVsp_Zika_prMEd445 (B3)	87	88	89
Proteína JEVsp_Zika_prMEd404 (B4)	90	91	92
Proteína JEVsp_ZikaE (B5)	93	94	95
Proteína JEVsp_ZikaEd456 (B6)	96	97	98

Nome do Composto, ou seja, peptídeo/proteína/antígeno (abreviação)	SEQ ID NO da sequência nucleotídica nativa do polinucleotídeo codificante do composto	SEQ ID NO da sequência nucleotídica códon-otimizada do polinucleotídeo codificante do composto	SEQ ID NO da sequência de aminoácidos do composto
Proteína JEVsp_ZikaEd445 (B7)	99	100	101
Proteína JEVsp_ZikaEd404 (B8)	102	103	104
MVsp_ZikaprME (C1)	105	106	107
MVsp_Zika_prMEd456 (C2)	108	109	110
MVsp_Zika_prMEd445 (C3)	111	112	113
MVsp_Zika_prMEd404 (C4)	114	115	116
MVsp_ZikaE (C5)	117	118	119
MVsp_ZikaEd456 (C6)	120	121	122
MVsp_ZikaEd445 (C7)	123	124	125
MVsp_ZikaEd404 (C8)	126	127	128
MVsp_ZikaprME_MVTMintracyto (C9)	129	130	131
MVsp_Zika_MVTMintracytoE (C10)	132	133	134
MVsp'_ZikaprME (D1)	135	136	137
MVsp'_Zika_prMEd456 (D2)	138	139	140
MVsp'_Zika_prMEd445 (D3)	141	142	143
MVsp'_Zika_prMEd404 (D4)	144	145	146
MVsp'_ZikaE (D5)	147	148	149
MVsp'_ZikaEd456 (D6)	150	151	152
MVsp'_ZikaEd445 (D7)	153	154	155
MVsp'_ZikaEd404 (D8)	156	157	158
MVsp'_ZikaprME_MVTMintracyto (D9)	159	160	161
MVsp'_Zika_MVTMintracytoE (D10)	162	163	164

Nome do vetor plasmidial de transferência	SEQ ID NO
pTM2-MVSchw_A1_Zikasp_ZikaprME (sequência otimizada)	165
pTM2-MVSchw_insert 4 (sequência nativa)	166
pTM2-MVSchw_insert 5 (sequência nativa)	167

Nome do composto, ou seja, peptídeo/proteína/antígeno (abreviação)	SEQ ID NO da sequência nucleotídica nativa do polinucleotídeo que codifica o composto	SEQ ID NO da sequência de aminoácidos do composto
<i>Insert 4</i>	168	169
<i>Insert 5</i>	170	171

[077] Em um exemplo de realização específico da invenção, o referido ZIKV é da linhagem africana, em particular da cepa africana ArB1362 (GenBank: KF383115) ou do isolado africano IbH_30656 (GenBank: HQ234500), ou da linhagem asiática, em particular da cepa asiática BeH818995 (GenBank: KU365777), de preferência ZIKV é das cepas que circulam no Pacífico e nas Américas desde 2013.

[078] Em outro exemplo de realização específico da invenção, o referido ZIKV corresponde a várias linhagens de vírus ZIK, incluindo as cepas que circulavam no Pacífico e nas Américas desde 2013.

[079] Em um exemplo de realização preferido da invenção, a proteína prM do ZIKV possui uma sequência de aminoácidos que é uma sequência de aminoácidos de consenso representativa das sequências prM de uma seleção de várias cepas de ZIKV, inclusive da linhagem asiática, em particular da cepa BeH818995. A proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma possui uma sequência de aminoácidos que é uma sequência de aminoácidos de consenso representativa das sequências E de uma seleção de várias cepas de ZIKV, inclusive da linhagem asiática, em particular da cepa BeH818995 de ZIKV.

[080] Em um exemplo de realização específico da invenção, o referido polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, codifica ainda (iii) o peptídeo sinal do capsídeo do ZIKV (sp) ou o peptídeo sinal do capsídeo de um JEV (JEVsp) ou o peptídeo sinal da proteína de fusão do MV (MVsp) ou o peptídeo sinal modificado da proteína de fusão do MV (MVsp') e o peptídeo sinal do proteína de membrana do ZIKV (sp'), ou

o referido polinucleotídeo que codifica pelo menos (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, codifica ainda (iii) o peptídeo sinal do capsídeo do ZIKV (sp) ou o peptídeo sinal da proteína de membrana do ZIKV

(sp') ou o peptídeo sinal do capsídeo de um JEV (JEVsp) ou o peptídeo sinal da proteína de fusão de MV (MVsp) ou o peptídeo sinal modificado da proteína de fusão de MV (MVsp').

[081] Em um exemplo de realização preferido da invenção, o referido polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, codifica ainda (iii) o peptídeo sinal do capsídeo do ZIKV e o peptídeo sinal da proteína de membrana do ZIKV, ou

o referido polinucleotídeo que codifica pelo menos (ii) a proteína E do ZIKV ou versão truncada da mesma, também codifica (iii) o peptídeo sinal do capsídeo do ZIKV ou o peptídeo sinal da proteína de membrana do ZIKV.

[082] Em um exemplo de realização particular da invenção, o polinucleotídeo que codifica a proteína E codifica a proteína E completa (de comprimento total) ou sua forma solúvel sem os dois domínios transmembrana C-terminais da proteína E completa.

[083] Em um exemplo de realização preferido da invenção, o polinucleotídeo que codifica a versão truncada da proteína E é selecionado a partir do grupo que consiste em; (i) o polinucleotídeo que codifica a proteína E truncada na posição de aminoácido 456 da proteína E completa do ZIKV, ou seja, a proteína E sem a região âncora e o domínio intermediário entre as regiões haste e âncora, (ii) o polinucleotídeo que codifica a proteína E truncada na posição 445 da proteína E completa do ZIKV, ou seja, a proteína E sem a região âncora, o domínio intermediário entre as regiões haste e âncora e um fragmento da segunda hélice que compõe a região haste; e (iii) o polinucleotídeo que codifica a proteína E truncada na posição 404 da proteína E completa do ZIKV, ou seja, a proteína E sem a região haste, o domínio intermediário entre as regiões haste e âncora e a região âncora.

[084] Em um exemplo de realização preferido da invenção, o

polinucleotídeo codifica a proteína prM do ZIKV cuja sequência é a SEQ ID NO: 20, e o polinucleotídeo codifica a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma cuja sequência é selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 32.

[085] Em um exemplo de realização preferido da invenção, o polinucleotídeo que codifica a proteína prM do ZIKV possui a sequência de SEQ ID NO: 19, e o polinucleotídeo que codifica a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma possui uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28 e SEQ ID NO: 31.

[086] Em um exemplo de realização particular da invenção, a referida construção de ácido nucleico compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 45-164 e 168-171.

[087] Em um exemplo de realização preferido da invenção, a referida construção de ácido nucleico compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 168 e SEQ ID NO: 170, e preferencialmente tem a sequência de SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55 ou SEQ ID NO: 76, mais preferencialmente tem a sequência de SEQ ID NO: 46.

[088] Em um exemplo de realização preferido da invenção, a construção de ácido nucleico compreende a sequência a partir do nucleotídeo da posição 83 até o nucleotídeo da posição 18404 na sequência de SEQ ID NO: 165, ou a sequência a partir do nucleotídeo na posição 83 até o nucleotídeo na posição 18074 da sequência de SEQ ID NO: 166, ou a sequência a partir do nucleotídeo na posição 83 até o nucleotídeo na posição 17702 da sequência de SEQ ID NO: 167.

[089] A invenção também diz respeito a partículas de vírus do sarampo-vírus Zika (MV-ZIKV) replicantes, infecciosas e recombinantes, que compreendem em seu genoma uma construção de ácido nucleico de acordo com a invenção.

[090] Em um exemplo de realização específico da invenção, as referidas partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes são resgatadas de uma linhagem de células auxiliares que expressam uma RNA polimerase reconhecida pela referida linhagem de células, por exemplo, uma RNA polimerase T7, uma nucleoproteína (N) de MV, uma fosfoproteína (P) de MV e, opcionalmente, uma proteína grande da RNA polimerase (proteína L) de MV, e que é adicionalmente transfectada com o vetor plasmidial de transferência de acordo com a invenção.

[091] As referidas partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes são produzidas por um método que compreende a expressão da construção de ácido nucleico de acordo com a invenção em uma célula hospedeira compreendendo uma RNA polimerase reconhecida pela referida célula hospedeira, por exemplo, uma RNA polimerase T7, uma nucleoproteína (N) de MV, uma fosfoproteína (P) de MV e, opcionalmente, uma proteína grande da RNA polimerase (L) de MV.

[092] De acordo com um exemplo de realização particular da invenção, as referidas partículas compreendem em seu genoma uma sequência polinucleotídica compreendendo uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 168 e SEQ ID NO: 170, de preferência tem a sequência SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55 ou SEQ ID NO: 76, mais preferencialmente tem a sequência SEQ ID NO: 46.

[093] As pelo menos (i) proteína prM obtida do ZIKV e a proteína

E do ZIKV ou versão truncada da mesma ou (ii) a proteína E do ZIKV ou versão truncada da mesma também são capazes de se automontar em partículas semelhantes a vírus (VLPs) ZIK, com as partículas MV-ZIKV.

[094] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “partícula vírus-símile” ou “partícula semelhante a vírus” (VLP, do inglês *virus-like particle*) refere-se a uma estrutura que em pelo menos um atributo se assemelha a um vírus, mas que não demonstra ser infeccioso como tal. As VLPs de acordo com a invenção não carregam informações genéticas que codificam as proteínas das VLPs, em geral, as VLPs não possuem um genoma viral e, portanto, não são infecciosas e não são replicativas. De acordo com a presente invenção, as VLPs podem ser produzidas em grandes quantidades e são expressas em conjunto com partículas de MV-ZIKV infecciosas recombinantes. Tais VLPs são VLPs de ZIKV.

[095] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a partículas de MV-ZIKV infecciosas recombinantes que expressam pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma; ou (ii) a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma, em particular por referência às suas sequências de ácido nucleico e polipeptídicas. O MV-ZIKV infeccioso recombinante expressa vantajosamente pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, como VLPs.

[096] A invenção também se refere a uma composição ou um conjunto de ingredientes ativos compreendendo as partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes de acordo com a invenção e um veículo farmacologicamente aceitável.

[097] A invenção também diz respeito à associação, em uma composição, de VLPs compreendendo pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do

ZIKV ou a versão truncada da mesma, com partículas de MV-ZIKV-MV replicantes, infecciosas e recombinantes.

[098] De acordo com um exemplo de realização preferido da invenção, o vetor MV recombinante é projetado de tal maneira e o processo de produção envolve células de modo que as partículas virais produzidas nas células auxiliares transfectadas ou transformadas com o referido vetor, originadas de uma cepa MV adaptada para vacinação, possibilitam a produção de MV replicante, infeccioso e recombinante e a produção de ZIKV-VLPs para uso em composições imunogênicas, preferencialmente composições protetoras ou mesmo vacinais.

[099] De modo vantajoso, o genoma das partículas de MV-ZIKV infecciosas e recombinantes da invenção é competente para replicação. Pelo termo “competente para replicação” entende-se um ácido nucleico que, quando transduzido em uma linhagem de células auxiliar que expressa as proteínas N, P e L de um MV, pode ser transcrito e expresso a fim de produzir novas partículas virais.

[100] A replicação do vírus recombinante da invenção obtido usando cDNA de MV para a preparação do genoma recombinante de MV-ZIKV também pode ser alcançada *in vivo* no hospedeiro, particularmente no hospedeiro humano ao qual o MV-ZIKV recombinante é administrado.

[101] A invenção também diz respeito a uma composição ou um conjunto de ingredientes ativos compreendendo as partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes de acordo com a invenção, em associação com ZIKV-VLPs que expressam a(s) mesma(s) proteína(s) ZIKV que as referidas partículas de MV-ZIKV.

[102] De acordo com um exemplo de realização preferido da invenção, a referida composição ou conjunto de ingredientes ativos é usada na obtenção de uma resposta imune, em particular uma resposta imune protetora,

contra o ZIKV pela obtenção de anticorpos direcionados contra a(s) proteína(s) de ZIKV, e/ou de uma resposta imune celular, em um hospedeiro, particularmente em um hospedeiro humano com tal necessidade.

[103] A referida composição ou conjunto de ingredientes ativos, portanto, pode compreender um veículo adequado para administração, por exemplo, um veículo farmacologicamente aceitável para um hospedeiro, especialmente um hospedeiro humano e pode compreender adicionalmente, mas não necessariamente, adjuvantes para melhorar a resposta imune em um hospedeiro. Os inventores mostraram realmente que a administração dos ingredientes ativos da invenção pode provocar uma resposta imune sem a necessidade de adjuvante.

[104] De acordo com um exemplo de realização particular da invenção, a referida composição ou conjunto de ingredientes ativos compreende um veículo farmacologicamente aceitável.

[105] A invenção refere-se, de modo particular, a uma composição, particularmente uma composição imunogênica, preferencialmente uma composição de vacina para administração em crianças, adolescentes ou viajantes.

[106] Em um exemplo de realização particular, a referida composição ou vacina é usada para proteção preventiva contra cepas africanas e asiáticas de ZIKV.

[107] A referida composição ou vacina é utilizada para proteção contra a infecção pelo ZIKV ou contra os desfechos clínicos da infecção pelo ZIKV (proteção contra a doença pelo ZIKV) em um tratamento profilático. Tal composição de vacina possui princípios vantajosamente ativos (ingredientes ativos) que compreendem partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes resgatadas do vetor conforme definido na presente invenção opcionalmente associadas às VLPs que compreendem as mesmas proteínas

do ZIKV.

[108] No contexto da invenção, os termos “associado” ou “em associação” referem-se à presença, em uma composição única, de partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes e as proteínas do ZIKV mencionadas acima, particularmente as VLPs, geralmente como entidades fisicamente separadas.

[109] A invenção também diz respeito às partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes em associação com as proteínas de ZIKV mencionadas acima, particularmente em associação com ZIKV-VLPs expressando as proteínas do ZIKV, ou a composição ou conjunto de acordo com a invenção, para uso no tratamento ou prevenção de uma infecção causada pelo ZIKV em um sujeito, particularmente em um ser humano.

[110] A invenção também se refere às partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes de acordo com a invenção em associação com as proteínas ZIKV mencionadas acima, em particular em associação com as ZIKV-VLPs que expressam as mesmas proteínas ZIKV, para uso em um esquema de administração e de acordo com um regime de dosagem que suscita uma resposta imune, vantajosamente uma resposta imune protetora, contra a infecção pelo ZIKV ou doença induzida, particularmente em um hospedeiro humano.

[111] O esquema de administração e o regime de dosagem podem exigir uma única administração de uma dose selecionada de partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes de acordo com a invenção em associação com as proteínas de ZIKV mencionadas acima, particularmente em associação com as ZIKV-VLPs que expressam as mesmas proteínas do ZIKV.

[112] Alternativamente, pode-se exigir várias doses de administração em um regime de vacinação por “dose inicial-reforço” (*prime-*

boost). A dose inicial e de reforço podem ser alcançadas com ingredientes ativos idênticos consistindo nas referidas partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes em associação com as proteínas de ZIKV mencionadas acima, em particular em associação com as ZIKV-VLPs que expressam as mesmas proteínas do ZIKV.

[113] Alternativamente, as administrações de início e de reforço podem ser alcançadas com diferentes ingredientes ativos, envolvendo as referidas partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes em associação com as proteínas ZIKV mencionadas acima, em particular em associação com as ZIKV-VLPs que expressam as mesmas proteínas do ZIKV, em pelo menos um das etapas de administração e outros imunógenos ativos do ZIKV, como as proteínas ZIKV mencionadas acima ou as ZIKV-VLPs que expressam as mesmas proteínas ZIKV, em outras etapas de administração.

[114] A administração de partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes de acordo com a invenção em associação com ZIKV-VLPs que expressam as mesmas proteínas do ZIKV provoca uma resposta imune, e de modo especial, provoca anticorpos que reagem cruzadamente com várias cepas de ZIKV. Consequentemente, foi demonstrado que a administração dos ingredientes ativos de acordo com a invenção, quando preparada com as sequências codificantes de uma cepa específica de ZIKV, pode provocar uma resposta imune contra um grupo de cepas do ZIKV.

[115] Considerando o conhecimento disponível das doses de vacinas adequadas para outros patógenos (tais como o HBV ou HPV) que envolvem a administração de partículas semelhantes a vírus (VLP) e também das vacinas de MV humanas conhecidas, os inventores determinaram que a recuperação de ZIKV-VLPs com o vírus MV-ZIKV recombinante permite propor a administração de doses baixas eficazes dos ingredientes ativos. De fato, considerando que o vírus MV-ZIKV recombinante possibilita a produção de

cerca de 10^4 ZIKV-VLPs por partícula de MV-ZIKV replicante, infecciosa e recombinante, e considerando que as doses atualmente conhecidas para as vacinas MV humanas estão na faixa de 10^3 a 10^5 TCID₅₀, uma dose adequada do vírus MV-ZIKV recombinante a ser administrada pode estar na faixa de 0,1 a 10ng, particularmente de 0,2 a 6 ng e, possivelmente, tão baixa quanto 0,2 a 2 ng. Para fins de comparação, as doses das VLPs administradas no caso das vacinas VHB ou HPV estão na faixa de 10 µg, o que significa que uma dose de vacina MV-ZIKV recombinante poderia compreender cerca de 2.000, ou até de 5.000 a 10.000 vezes menos VLPs.

[116] De acordo com um exemplo de realização específico da invenção, a composição imunogênica ou vacina definida no presente documento também pode ser utilizada para proteção contra uma infecção pelo vírus do sarampo.

[117] Outras características e vantagens da invenção serão evidentes a partir dos exemplos a seguir e também serão ilustradas nas figuras.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[118] Figura 1. Representação esquemática do genoma do vírus Zika.

[119] Figura 2. Árvores filogenéticas dos principais flavivírus patogênicos humanos com base nas sequências de aminoácidos da proteína E (esquerda) e da proteína polimerase NS5 (direita). JEV, vírus da encefalite japonesa; MVEV, vírus da encefalite do vale Murray; POWV, vírus Powassan; SLEV, vírus da encefalite de Saint Louis; TBEV, vírus da encefalite transmitida por carrapatos; YFV, vírus da febre amarela; WNV, vírus do Nilo Ocidental.

[120] Figura 3. Representação esquemática de antígenos do vírus Zika. Os domínios de proteínas estão desenhados em escala. Zika, vírus Zika; JEV, vírus da encefalite japonesa; MV, vírus do sarampo. A. 12 variantes

do antígeno do Zika, onde o peptídeo sinal nativo do capsídeo (sp) ou da proteína de membrana (sp') do vírus do Zika é usado. B. 8 variantes do antígeno JEV-Zika quimérico, em que é usado um peptídeo sinal do capsídeo do JEV. C. 10 variantes do antígeno MV-Zika, onde é utilizado o peptídeo sinal da proteína de fusão do MV (MVsp). D. 10 variantes do antígeno MV Zika, onde é usado um peptídeo sinal modificado da proteína de fusão da MV (MVsp').

[121] Figura 4. Representação esquemática do vetor MV. Os genes do MV estão indicados: N (nucleoproteína), PVC (fosfoproteína e proteínas V/C), M (matriz), F (fusão), H (hemaglutinina), L (polimerase), T7 (promotor da RNA polimerase T7), hh (ribozima com motivo tipo cabeça de martelo (*hammerhead*)), T7t (terminador da RNA polimerase T7), δ (ribozima do vírus da hepatite delta), setas vermelhas (unidades adicionais de transcrição (ATU)).

[122] Figura 5. Imunização única em camundongos. A) Resposta do anticorpo Zika medida no soro de camundongos por ELISA um mês após uma única imunização. MV-prMEd404 (sequência nativa, *insert 4*); MV-ssEd445 (sequência nativa, *insert 5*). B) Sobrevida dos camundongos imunizados após desafio com vírus Zika. C) Viremia do vírus Zika em soros de camundongos imunizados (determinados por RT-qPCR) em diferentes dias após o desafio. D) *Elispot* IFN-gama detectado em esplenócitos de camundongos uma semana após a imunização com MV-Zika ou vírus de controle MVSchw. Os *elispots* são detectados contra MV (Schwarz), vírus Zika (Zika) e Concanavalina A como controle.

[123] Figura 6. Imunização por estratégia “dose inicial-reforço” (*prime-boost*) em camundongos. A) Resposta do anticorpo Zika medida no soro de camundongos por ELISA nos dias 30, 45 e 55 após duas imunizações. B) Detecção de anticorpos neutralizantes do vírus Zika nos soros de camundongos imunizados com duas injeções de MV-prM Ed404 (sequência

nativa, *insert 4*), MV-ssEd445 (sequência nativa, *insert 5*). C) Sobrevida de camundongos imunizados após desafio com baixa dose de vírus Zika. D) Viremia do vírus Zika em soros de camundongos imunizados (determinados por RT-qPCR) em diferentes dias após o desafio.

[124] Figura 7. MV recombinante expressando o antígeno prME completo de Zika (construção A1) produz VLPs de Zika. As células Vero foram infectadas com três clones diferentes de rMV-Zika_A1 (1, 2, 3) por 48 horas. Os lisados celulares e o meio foram coletados. O meio sobrenadante foi clarificado por centrifugação a baixa velocidade (1.500 rpm) e depois concentrado por ultracentrifugação em uma camada de sacarose a 20% por 3 horas (36.000 rpm). Todo o material foi analisado por *western blot* para detectar a proteína E de Zika (50 kD) com anticorpo monoclonal 4G2 panflavi. (A) Lisados celulares, (B) Meio concentrado, (C) Meio não concentrado e controles positivo e negativo. O controle positivo é um lisado de células Vero transfectadas por 48 horas com o plasmídeo pcDNA5 que expressa o antígeno A1 de Zika. A proteína E positiva recuperada no painel B após a ultracentrifugação demonstra que VLPs de alta densidade foram produzidas no sobrenadante das células Vero infectadas.

[125] Figura 8. Ensaio de expressão do antígeno do vírus Zika. Células HEK293T foram transfectadas com cada construção códon-otimizada e os lisados e meio celular foram coletados após 48 h. O meio sobrenadante foi clarificado por centrifugação a baixa velocidade (1.500 rpm) e, em seguida, a fração foi concentrada por ultracentrifugação em uma camada de sacarose a 20% por 3 horas (36.000 rpm). Todo o material foi analisado por *western blot* para detectar a proteína E de vírus Zika (~50 kD) com anticorpo 4G2 panflavivírus. (L) lisados celulares, (S) meio não concentrado e (U) meio ultracentrifugado.

[126] Figura 9. Expressão do antígeno A1 do vírus Zika a partir

do vetor do sarampo e curva de crescimento do MV-Zika-A1 recombinante. (A) A análise de imunofluorescência mostrou grandes sincícios em células Vero infectadas por 24 horas com MV-Zika-A1 (a proteína E do vírus Zika foi detectada com o anticorpo 4G2 pan-flavivírus). (B) Replicação do vírus MV-Zika-A1 recombinante em células Vero a 32°C após infecção com uma multiplicidade de infecção de 0,01 (os títulos foram determinados por diluição limitante e pelo método de Karber).

[127] Figura 10. Resposta do anticorpo ao ZIKV em camundongos CD46-IFNAR^{-/-} imunizados. Os títulos de anticorpos contra EDIII ZIKV foram determinados usando ELISA indireto em soros de camundongos coletados após a estratégia de vacinação *prime - boost* com MV-ZIKV-A1, MV-prMEd404 (sequência nativa, *insert 4*), MV-ssEd445 (sequência nativa, *insert 5*), MV-ZIKV-A12 ou controle MV-Schwarz vazio. As leituras dos poços revestidos com antígenos simulados foram subtraídas dos poços com ZIKV-EDIII e os títulos de IgG específicos para ZIKV foram calculados como o recíproco da maior diluição de um soro individual, dando uma absorbância de 0,5. Uma forte resposta de anticorpo contra o ZIKV foi induzida em camundongos imunizados com valores ligeiramente mais altos para A1 (altamente reprodutível) e A12 (com maior variabilidade).

[128] Figura 11. Títulos de anticorpos neutralizantes para ZIKV em camundongos CD46-IFNAR^{-/-} imunizados. Os títulos de anticorpos neutralizantes contra ZIKV foram determinados usando testes de neutralização por redução de placa (PRNT₅₀) em soros de camundongos coletados após a última imunização de reforço (*boost*) com MV-ZIKV-A1, MV-prMEd404 (sequência nativa, *insert 4*), MV-ssEd445 (sequência nativa, *insert 5*), MV-ZIKV-A12 ou controle com MV-Schwarz vazio e antes do desafio. Os títulos neutralizantes mais fortes foram observados com a construção MV-ZIKV-A1.

[129] Figura 12. Proteção de camundongos CD46-IFNAR^{-/-}

imunizados a partir do desafio não letal com ZIKV. Os camundongos imunizados por duas vezes com MV-ZIKV-A1, MV-ZIKV-A12 ou controle vazio com MV-Schwarz foram desafiados com 10^3 ffu (unidade formadora de foco) de ZIKV (linhagem asiática - sul-americana, isolada em dezembro de 2015) um mês após a última imunização. As cargas virais foram determinadas por RT-qPCR. LOD indica o limite de detecção da RT-qPCR. Os camundongos imunizados com a construção MV-ZIKV-A1 foram todos protegidos da viremia enquanto que os camundongos imunizados com MV-ZIKV-A12 ou com controle MV-Schwarz vazio foram infectados.

[130] Figura 13. Proteção de camundongos CD46-IFNAR^{-/-} imunizados a partir do desafio letal com ZIKV. Os camundongos imunizados por duas vezes com MV-ZIKV-A1, MV-ZIKV-A12 ou controle vazio com MV-Schwarz foram desafiados com 10^3 ffu de ZIKV (cepa adaptada para camundongo a partir da linhagem africana) um mês após a última imunização. Os animais foram monitorados quanto a morbidade e mortalidade por 15 dias. Todos os animais imunizados com MV-ZIKV-A1 sobreviveram sem apresentar sinais de doença, enquanto todos os ratos de controle morreram no dia 8.

EXEMPLOS

GERAÇÃO DE VACINAS CANDIDATAS

[131] Experimentos anteriores com diferentes flavivírus (dengue, Nilo Ocidental, encefalite japonesa, encefalite transmitida por carrapatos) demonstraram amplamente que as proteínas do envelope da superfície flaviviral (E) são capazes de suscitar anticorpos neutralizantes protetores que permitem reduzir a infectividade do vírus. O genoma do ZIKV consiste em uma molécula de RNA de sentido positivo de fita simples de ~ 10800 kb de comprimento, com 2 regiões não codificantes (5' e 3' NCR) e um único quadro de leitura aberto que codifica uma poliproteína que é clivada em três partes estruturais (capsídeo (C), precursora da membrana (prM), envelope (E)) e sete

proteínas não estruturais (NS) (Figura 1). A proteína E (53 kDa) é a principal proteína de superfície do vírion envolvida em vários aspectos do ciclo viral, mediando a ligação às células-alvo e a fusão à membrana.

[132] Os inventores escolheram, portanto, expressar a proteína E do vírus Zika. Diversas formas de proteína E foram selecionadas a fim de expressar proteínas secretadas solúveis ou proteínas ancoradas na superfície de VLPs. Os seguintes antígenos do vírus Zika foram clonados e expressos a partir de um plasmídeo de expressão de mamífero em células humanas: prM-E e diferentes formas de E com ou sem a região haste ou âncora. Estas proteínas contêm a sequência peptídica sinal original do vírus Zika E ou uma sequência peptídica sinal heteróloga da proteína de fusão de JEV ou MV. Essas proteínas contêm o sítio de clivagem da sinalase localizado entre as sequências prM e E (Figuras 3A, 3B, 3C, 3D).

SELEÇÃO E CONCEPÇÃO DE ANTÍGENOS

[133] Os antígenos do vírus Zika foram selecionados com base em trabalhos anteriores que sugerem que os antígenos do envelope dos flavivírus podem ser capazes de induzir anticorpos neutralizantes e respostas de células T. Entretanto, a seleção de um antígeno adequado deve levar em consideração a evolução do vírus ao longo do tempo e a variedade de cepas existentes do vírus. Para este fim, os inventores reconstruíram a filogenia de membros representativos da família dos flavivírus, incluindo o vírus Zika, utilizando apenas a região de aminoácidos da poliproteína de flavivírus correspondente ao gene do envelope (E). Diferentemente das análises filogenéticas baseadas no genoma completo, ou na polimerase (NS5) dos flavivírus, onde o parente mais próximo do vírus Zika são vírus neurotrópicos como o vírus da encefalite de Saint-Louis, os inventores notaram que o Zika E parecia mais próximo do DENV E (Figura 2) (*Barba-Spaeth, et al. Nature* 2016, 536, 48-53). Os inventores procederam então à identificação dos diferentes

domínios de membrana (M) do Zika, seu precursor (prM) e proteínas E através de modelagem de homologia estrutural com base nos dados disponíveis em DENV (Ekins *et al. Illustrating and homology modeling the proteins of the Zika virus, F1000Research*, 2016, 5: 275). Os inventores também identificaram os peptídeos de sinal na extremidade do gene do Capsídeo (C), logo a montante de prM, usando novamente a modelagem de homologia com o vírus da dengue como referência, bem como algoritmos publicamente disponíveis para a predição de sequências de peptídeos sinal (<http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; <http://www.predisi.de/>). Os inventores optaram por incluir a sequência de peptídeo sinal para induzir a exportação e secreção do antígeno candidato, tanto prM-E completa, quanto apenas E fora das células. Para o antígeno E, os inventores também previram o peptídeo sinal no final de M, logo a montante de E, e projetaram versões do antígeno usando esse sinal nativo (Figura 3A). Além disso, os inventores também projetaram antígenos quiméricos nos quais o peptídeo sinal nativo do vírus Zika foi substituído pelo peptídeo sinal presente no final do JEV C (Figura 3B) ou pelo peptídeo sinal presente no N-terminal da proteína de fusão (F) de MV (Figura 3C), com a hipótese de que essas sequências forneceria exportação aprimorada dos antígenos candidatos. Os inventores projetaram uma versão adicional do antígeno quimérico, incluindo o peptídeo sinal de F a partir do MV, onde foram removidos dois aminoácidos correspondentes à junção entre o final do peptídeo sinal de F e o início do próprio F (Figura 3D).

[134] Em segundo lugar, os inventores também projetaram variações mais curtas dos antígenos, removendo fragmentos C-terminais da proteína E correspondentes aos domínios previstos da haste e/ou âncora, incluindo a região intermediária entre a haste e a âncora (como previsto quando comparado ao DENV). O objetivo dessas modificações que reduzem o

tamanho dos antígenos era de gerar antígenos capazes de formar VLPs. Para uma terceira variante, os inventores removeram a porção âncora, o domínio intermediário entre a âncora e a haste, bem como um fragmento da segunda hélice que compõe a haste, desta vez em modelagem de homologia com WNV (variante Ed445).

[135] Finalmente, os inventores projetaram antígenos prM-E e E quiméricos usando o peptídeo sinal da proteína F de MV e substituindo a âncora E do Zika pela transmembrana (TM) e cauda intracitoplasmática da proteína F do MV (Figuras 3C e 3D).

[136] Para a sequência de seleção do próprio antígeno, os inventores analisaram todas as sequências publicamente disponíveis do vírus Zika (linhagens asiáticas e africanas), bem como as sequências não publicadas geradas pelos inventores, a partir da epidemia na América do Sul e no Pacífico. Com base nos dados epidemiológicos que relatam uma associação de síndromes congênitas e afecções neurológicas em adultos apenas com a linhagem asiática, os inventores projetaram um antígeno usando a sequência de aminoácidos consensual do vírus Zika, como observado em circulação a partir de 2015 e em diante, principalmente para incluir a alteração S139N que gerou um novo potencial sítio de glicosilação de N na prM que estava ausente na linhagem africana e a alteração V763M na proteína E.

[137] As sequências foram códon-otimizadas para expressão em *Homo sapiens* e adaptadas para a clonagem do vetor de sarampo e para a “regra dos seis” (número total de nucleotídeos divisíveis por 6). As regiões muito ricas (> 80%) ou muito pobres (<30%) de GC foram evitadas para aumentar a estabilidade do RNA, um alto valor CAI (0,97) foi obtido para aumentar a eficácia da tradução, as seguintes sequências cis-atuantes foram evitadas: as TATA-boxes, os sítios *chi* e os sítios de entrada ribossomal; trechos com sequências ricas em AT ou ricas em GC; os elementos ARE, INS,

CRS; as sequências de repetição e as estruturas secundárias de RNA; sítios doadores e aceptores de *splice* críptico e pontos de ramificação. As seguintes sequências de edição do vírus do sarampo foram evitadas sempre que possível: AAAGGG, AAAAGG, GGGAAA, GGGGAA, TTAAA, AAAA, e também suas sequências complementares na mesma fita: TTCCCC, TTTCCC, CCTTTT, CCCTT, TTTAA, TTTT. Os sítios de restrição enzimática *Bss*HII, *Bs*WI foram evitados internamente e inseridos em ambas as extremidades para fins de clonagem.

EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

[138] As sequências de antígeno otimizadas foram clonadas no plasmídeo de expressão em mamífero pcDNA5 e transfectadas em células HEK293. O tamanho e o nível de expressão de cada antígeno foram caracterizados após o *Western blotting* usando anticorpos apropriados para detecção.

EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS EM VETOR DO SARAMPO

[139] As sequências de antígeno otimizadas de Zika foram inseridas no vetor MV em diferentes unidades de transcrição adicionais, de acordo com o nível de expressão desejado. Após o sequenciamento dos plasmídeos vetor do sarampo que expressam os diferentes antígenos do Zika, os vetores recombinantes replicantes foram gerados por genética reversa usando um sistema baseado em células previamente desenvolvido (Combredet, C. *et al.*, 2003, *J Virol*, 77 (21): 11546 -11554), e os vírus resgatados foram amplificados e titulados em células Vero. Os vírus recombinantes foram cultivados em células Vero para documentar a expressão de proteínas do Zika detectadas em sobrenadantes e em células usando *Western Blot* e coloração de imunofluorescência indireta com anticorpos apropriados. A presença de VLPs do vírus Zika (em vetores que expressam prM/E) foi identificada após a ultracentrifugação do meio de cultura e *western*

blot (Figura 7). O processamento correto de antígenos nas células infectadas foi verificado por *Western Blot*. Os vetores com a melhor capacidade de expressão dos antígenos do Zika foram isolados por diluição seriada e clonagem em placa única antes da amplificação em células Vero.

CAPACIDADE DE CRESCIMENTO DO VÍRUS VACINA RECOMBINANTE

[140] A capacidade de crescimento dos vírus de vacina selecionados foi comparada com o padrão MV Schwarz. A análise da curva de crescimento foi realizada em cultura de células Vero usando diferentes multiplicidades de infecção e titulação.

ESTABILIDADE DO VÍRUS DE VACINA RECOMBINANTE

[141] Os melhores vetores de vacina selecionados foram testados quanto à sua estabilidade genética por passagens em série com mais de 10 passagens em cultura de células Vero, seguida de *Western blot* para expressão do antígeno e análise completa do sequenciamento.

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO PRIMEIRO MV-ZIKA RECOMBINANTE EM

CAMUNDONGOS

IMUNIZAÇÃO ÚNICA

[142] Os dois vetores recombinantes MV-prMEd404 (sequência nativa, *insert 4*) e MV-ssEd445 (sequência nativa, *insert 5*) foram avaliados em camundongos CD46/IFNAR suscetíveis à infecção por sarampo. Os camundongos foram imunizados com uma ou duas injeções intraperitoneais com unidades infecciosas definidas do vírus de vacina e os anticorpos funcionais e as respostas imunes mediadas por células foram analisadas usando ensaios padrão e especificamente desenvolvidos. Os anticorpos de ligação ao vírus Zika foram determinados por ELISA e os anticorpos neutralizantes com o teste de neutralização por redução de placas (PRNT, sigla do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*) específico. As respostas de células T foram analisadas pelo ensaio *Elispot* usando peptídeos específicos

do vírus Zika para estimulação *ex vivo* de células esplênicas. Os vetores de vacina foram então testados quanto à eficácia protetora: camundongos imunizados foram desafiados com uma dose letal do vírus Zika. Um desafio dose-resposta foi previamente estabelecido em camundongos CD46/IFNAR, mostrando que doses entre 10^2 e 10^6 unidades formadoras de foco (ffu) da cepa africana HD78788 do vírus Zika (adaptada para camundongo) matam eficientemente esses camundongos.

[143] Em um primeiro experimento, foram imunizados 6 camundongos por grupo com uma única injeção intraperitoneal de 10^6 TCID₅₀ (dose infecciosa para 50% da cultura de tecidos) de MV-prMEd404 (sequência nativa, *insert 4*), MV-ssEd445 (sequência nativa, *insert 5*) ou MVSchw vazio como controle. O sangue foi coletado antes da imunização e no dia 30 após a imunização, e os títulos ELISA do vírus Zika foram determinados (Figura 5A).

[144] Os camundongos imunizados foram então desafiados no dia 30 por injeção intraperitoneal de 10^6 ffu da cepa africana HD78788 do vírus Zika (adaptado para camundongo). A morbidade e mortalidade foi controlada durante 12 dias (Figura 5B) e a viremia do vírus Zika foi determinada no soro por qRT-PCR (Figura 5C).

[145] Para determinar a resposta de células T à vacina, outro grupo de camundongos CD46/IFNAR foi imunizado com MV-prMEd404 (*insert 4*) ou MVSchw vazio e os baços foram coletados 8 dias após a imunização. O ensaio *Elispot* foi realizado em esplenócitos recém-extraídos usando o vírus MVSchw ou Zika para reestimular células T ou concanavalina A como controle (Figura 5D).

IMUNIZAÇÃO COM A ESTRATÉGIA “DOSE INICIAL-REFORÇO” (PRIME-BOOST)

[146] Em um segundo conjunto de experimentos, grupos de camundongos CD46/IFNAR foram imunizados com duas injeções intraperitoneais sucessivas de 10^6 TCID₅₀ de MV-prMEd404 (sequência nativa,

insert 4), MV-ssEd445 (sequência nativa, *insert 5*) ou MVSchw vazio como controle. O sangue foi coletado antes da imunização e no dia 30 após a imunização, e os títulos de ELISA do vírus Zika foram determinados (Figura 6A). Os anticorpos neutralizantes foram determinados em soros coletados no dia 50 usando um teste de neutralização específico do vírus Zika (Figura 6B). Os camundongos imunizados foram então desafiados no dia 60 por injeção intraperitoneal de 10^6 ffu da cepa africana HD78788 do vírus Zika (adaptado para camundongo). A morbidade e mortalidade foi controlada durante 12 dias (Figura 6C) e a viremia do vírus Zika foi determinada no soro por qRT-PCR nos dias 2, 4 e 6 pós-infecção (Figura 5C).

AValiação PRÉ-CLÍNICA EM PRIMATAS NÃO HUMANOS (PNHs)

Validação da cepa ZIKV usada no estudo de desafio em PNH

[147] Como pouco se sabe sobre a fisiopatologia do ZIKV em macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*), dois animais foram inoculados em um ensaio preliminar com três doses do vírus Zika tipo selvagem (10^4 , 10^5 e 10^6 pfu) para avaliar o estoque viral e a clínica associada em macacos. Esses dois animais foram submetidos ao mesmo seguimento que os animais vacinados e estimulados, mas por um período de 6 meses. Os seguintes pontos foram abordados: Virologia (qRT-PCR; avaliação clínica (Prurido, Febre); Contagem de células sanguíneas (Linfócitos, Monócitos, Granulócitos, Plaquetas); Bioquímica (ASAT (AST), ALAT (ALT), PCR); resposta imune não específica (inata e inflamatória) e resposta imune específica: citocinas/quimiocinas por luminex, perfil de células NK, B e T (citometria de fluxo de 14 cores), anticorpos (neutralização, ligação) em amostras de soros seriais, resposta funcional de células T e células de memória (*ELISpot*, ICS). A liberação do vírus no fluido biológico (saliva, lágrimas, fluidos genitais) foi avaliada por qRT-PCR e/ou por métodos de isolamento em vários pontos de tempo.

Estudo de imunogenicidade da vacina em PNH

[148] Os macacos foram imunizados com uma ou duas injeções subcutâneas no intervalo de 3 meses com unidades infecciosas definidas do vírus de vacina. As respostas imunes, humoral e mediada por células, foram determinadas em diferentes momentos após a imunização. Os macacos foram então desafiados com doses infecciosas de ZIKV. Viremia infecciosa e os sinais clínicos foram determinados. Para esta tarefa, vinte e um macacos cinomolgos adultos foram selecionados como negativos para anticorpos antinflavivírus e antissarampo; Dois grupos de 7 animais foram vacinados com uma dose única ou um regime de dose inicial-reforço com o melhor vírus MV-ZIKV recombinante selecionado (MV-prMEd404 nativo). A imunidade (humoral e associada a células) foi explorada e a virologia foi seguida por até 1 mês após a vacinação. Os parâmetros clínicos e biológicos são avaliados em paralelo com um terceiro grupo de 7 animais vacinados com a cepa MVSchw vazio de controle, seguindo o esquema de vacinação inicial-reforço. O título de neutralização do anticorpo foi determinado.

ESTUDO DA EFICÁCIA DA VACINA EM PNH

[149] Os PNHs imunizados foram desafiados com ZIKV dois meses após a imunização. O nível de viremia do ZIKV (qRT-PCR) foi analisado no sangue, saliva e lágrimas. A inflamação e a resposta imune foram avaliadas no plasma (anticorpo neutralizante, citocinas).

ENSAIOS DE EXPRESSÃO

[150] Os ensaios de expressão foram realizados para todas as construções geradas (Figura 8) e mostraram uma forte expressão para várias delas. Foi detectado sinal na fração ultracentrifugada, que era compatível com a geração de partículas semelhantes a vírus, em quantidades variáveis para alguns antígenos candidatos, notadamente A1 e A12. Esses dois antígenos foram clonados no vetor sarampo e demonstraram uma expressão de alto

nível, conforme mostrado por imunofluorescência (Figura 9A). O vetor recombinante MV-ZIKV-A1 replicou de maneira semelhante ao vírus MV Schwarz padrão, embora com um título final mais baixo (Figura 9B).

[151] Testados quanto à sua imunogenicidade em camundongos CD46/IFNAR, os vetores MV-ZIKV-A1 e MV-ZIKV-A12 provocaram fortes respostas imunes após um regime de vacinação de dose inicial/reforço (*prime-boost*) com intervalo de 1 mês, comparável aos vetores MV-prMEd404 e MV-ssEd445, conforme detectado por ELISA (Figura 10). Entretanto, diferentes quantidades de anticorpos neutralizantes foram induzidas (Figura 11). Apenas o candidato MV-ZIKV-A1 induziu uma forte resposta neutralizante (2 logs mais forte). Isso se correlacionou com a proteção completa conferida aos camundongos por imunização com MV-ZIKV-A1 (Figura 12) contra viremia, bem como a proteção contra um desafio letal (Figura 13).

[152] Em conclusão, este estudo demonstrou que o antígeno A1 completo do vírus Zika expresso em vetor MV foi capaz de fornecer proteção estéril contra um desafio infeccioso e letal nos animais imunizados, correlacionando-se com forte indução de anticorpos neutralizantes.

REIVINDICAÇÕES

1. CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, caracterizada por compreender:

(1) um polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) o precursor da proteína de membrana (prM) de um vírus Zika (ZIKV), e a proteína do envelope (proteína E) de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma; ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma; e

(2) uma molécula de cDNA que codifica uma fita de RNA(+) antígeno infecciosa, completa de um vírus do sarampo (MV);

em que o polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV, e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma; ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, está operacionalmente ligado, em particular clonado na molécula de cDNA.

2. CONSTRUÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo polinucleotídeo de (1) e a molécula de cDNA de (2) juntos consistirem em um número de nucleotídeos que é múltiplo de seis.

3. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizada por compreender os seguintes polinucleotídeos de 5' para 3':

(a) um polinucleotídeo que codifica a proteína N do MV;

(b) um polinucleotídeo que codifica a proteína P do MV;

(c) o polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma; ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma;

(d) um polinucleotídeo que codifica a proteína M do MV;

(e) um polinucleotídeo que codifica a proteína F do MV;

(f) um polinucleotídeo que codifica a proteína H do MV; e

(g) um polinucleotídeo que codifica a proteína L do MV;

em que os referidos polinucleotídeos estão operacionalmente ligados na construção de ácido nucleico e estão sob o controle das sequências reguladoras de transcrição e de replicação viral, tal como o líder MV e as sequências *trailer*.

4. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo referido vírus do sarampo ser um vírus de cepa atenuada selecionado a partir do grupo que consiste nas cepas Schwarz, Zagreb, AIK-C e Moraten.

5. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo referido polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma ter sido otimizado para a utilização preferencial de códons de *Macaca* ou ter sido otimizado para a utilização preferencial de códons de humanos.

6. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelas *sequências de edição do sarampo* terem sido excluídas do referido polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV, e a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma.

7. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo referido ZIKV ser da linhagem africana, em particular da cepa africana ArB1362 (GenBank: KF383115) ou isolado a partir da cepa africana IbH_30656 (GenBank: HQ234500), ou a partir da cepa asiática, em particular a partir da cepa asiática BeH818995 (GenBank: KU365777).

8. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo referido polinucleotídeo que codifica pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV, e a proteína E do ZIKV ou a versão

truncada da mesma, codificar ainda (iii) o peptídeo sinal do capsídeo do ZIKV e o peptídeo sinal da proteína de membrana do ZIKV, ou

o referido polinucleotídeo que codifica pelo menos (ii) a proteína E do ZIKV ou versão truncada da mesma, codificar ainda (iii) o peptídeo sinal do capsídeo do ZIKV ou o peptídeo sinal da proteína de membrana do ZIKV.

9. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo polinucleotídeo que codifica a proteína E e codificar a proteína E completa (de comprimento total) ou a sua forma solúvel sem os dois domínios transmembrana C-terminais da proteína E completa.

10. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo polinucleotídeo que codifica a versão truncada da proteína E ser selecionado a partir do grupo que consiste em; (i) o polinucleotídeo que codifica a proteína E truncada na posição de aminoácido 456 da proteína E completa do ZIKV; (ii) o polinucleotídeo que codifica a proteína E truncada na posição de aminoácido 445 da proteína E completa do ZIKV; e (iii) o polinucleotídeo que codifica a proteína E truncada na posição de aminoácido 404 da proteína E completa do ZIKV.

11. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo polinucleotídeo codificar a proteína prM do ZIKV cuja sequência é de SEQ ID NO: 20, e codificar a proteína E do ZIKV ou a versão truncada da mesma cuja sequência é selecionada a partir do grupo que consiste nas sequências de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 32.

12. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo polinucleotídeo que codifica a proteína prM do ZIKV possuir a sequência de SEQ ID NO: 19, e o polinucleotídeo que codifica a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma possuir uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste nas

sequências de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28 e SEQ ID NO: 31.

13. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo ácido nucleico compreender uma sequência selecionada a partir do grupo consiste nas sequências de SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 168 e SEQ ID NO: 170, e preferencialmente tem a sequência de SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55 ou SEQ ID NO: 76, mais preferencialmente tem a sequência de SEQ ID NO: 46.

14. CONSTRUÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada por compreender a sequência a partir do nucleotídeo da posição 83 até o nucleotídeo da posição 18404 da sequência de SEQ ID NO: 165, ou a sequência a partir do nucleotídeo na posição 83 até o nucleotídeo na posição 18074 da sequência de SEQ ID NO: 166, ou a sequência a partir do nucleotídeo na posição 83 até o nucleotídeo na posição 17702 da sequência de SEQ ID NO: 167.

15. VETOR PLASMIDIAL DE TRANSFERÊNCIA, caracterizado por compreender a construção de ácido nucleico, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

16. VETOR, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pela sequência ser de SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166 ou SEQ ID NO: 167, preferencialmente SEQ ID NO: 165.

17. CÉLULAS TRANSFORMADAS, caracterizadas por compreenderem a construção de ácido nucleico, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, inserida em seus genomas; ou compreendendo o vetor plasmidial de transferência, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 16, sendo que as referidas células são particularmente células eucarióticas, tal como células aviárias, em particular

células CEF, células de mamíferos ou células de levedura.

18. PARTÍCULAS DE VÍRUS SARAMPO-VÍRUS ZIKA (MV-ZIKV), replicantes, infecciosas e recombinantes, caracterizadas por compreenderem uma construção de ácido nucleico, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, como genomas.

19. PARTÍCULAS, de acordo com a reivindicação 18, caracterizadas por serem resgatadas de uma linhagem de células auxiliares que expressam uma RNA polimerase reconhecida pela referida linhagem de células, por exemplo, uma RNA polimerase T7, uma nucleoproteína (N) de MV, uma fosfoproteína (P) de MV e, opcionalmente, uma proteína grande da RNA polimerase (proteína L) de MV, e que é adicionalmente transfectada com o vetor plasmidial de transferência, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 16.

20. PARTÍCULAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 19, caracterizadas por compreenderem em seu genoma uma sequência polinucleotídica compreendendo uma sequência selecionada do grupo que consiste nas sequências de SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 168 e SEQ ID NO: 170, e de preferência ter a sequência de SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55 ou SEQ ID NO: 76, e mais preferencialmente ter a sequência de SEQ ID NO: 46.

21. COMPOSIÇÃO OU CONJUNTO DE INGREDIENTES ATIVOS, caracterizado por compreender as partículas de MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 18 a 20, em associação com as partículas semelhantes a vírus (VLPs) ZIKV que expressam a(s) mesma(s) proteína(s) de ZIKV que as referidas Partículas MV-ZIKV e um veículo farmacologicamente aceitável.

22. COMPOSIÇÃO OU CONJUNTO DE INGREDIENTES

ATIVOS, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por ser para uso na indução de uma resposta imune protetora contra o ZIKV pela indução de anticorpos direcionados contra a(s) proteína(s) de ZIKV e/ou pela indução de uma resposta imune celular, em um hospedeiro, em particular um hospedeiro humano com tal necessidade.

23. PARTÍCULAS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, caracterizadas por estarem associadas às ZIKV-VLPs que expressam a(s) mesma(s) proteína(s) de ZIKV, ou à composição ou conjunto de ingredientes ativos, conforme definidos na reivindicação 21, para uso na prevenção de uma infecção por ZIKV em um sujeito ou na prevenção de desfechos clínicos de infecção por ZIKV em um sujeito, particularmente em humanos.

24. PROCESSO PARA RECUPERAR PARTÍCULAS DE VÍRUS SARAMPO-VÍRUS ZIKA (MV-ZIKV), infecciosas e recombinantes, que expressam pelo menos (i) o precursor da proteína de membrana (prM) de um ZIKV e a proteína do envelope (E) de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma e VLPs de ZIKV expressando a(s) mesma(s) proteína(s) de ZIKV, caracterizado por compreender:

(1) cotransfectar as células auxiliares, particularmente as células auxiliares HEK293, que expressam estavelmente a RNA polimerase T7, e as proteínas N e P do sarampo com (i) um vetor plasmidial de transferência, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 16, e com (ii) um vetor, especialmente um plasmídeo, que codifica a L polimerase do MV;

(2) cultivar as referidas células auxiliares co-transfectadas sob condições que permitam a produção de partículas MV-ZIKV recombinantes;

(3) propagar as partículas recombinantes assim produzidas pelo cocultivo das referidas células auxiliares da etapa (2) com células que

permitam a referida propagação, tal como células Vero;

(4) recuperar as partículas MV-ZIKV replicantes, infecciosas e recombinantes que expressam pelo menos (i) a proteína prM do ZIKV e a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma; ou (ii) a proteína E do ZIKV ou uma versão truncada da mesma, e VLPs de ZIKV expressando a(s) mesma(s) proteína(s) de ZIKV.

25. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo vetor plasmidial de transferência, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 15 a 16, ter a sequência de SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166 ou SEQ ID NO: 167, preferencialmente a sequência de SEQ ID NO: 165.

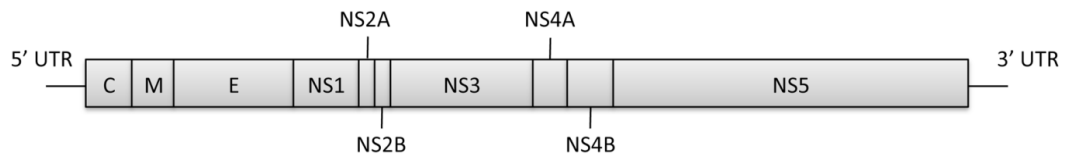


Figura 1

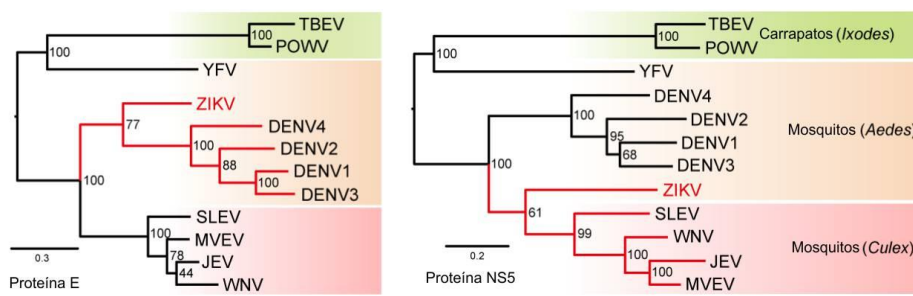
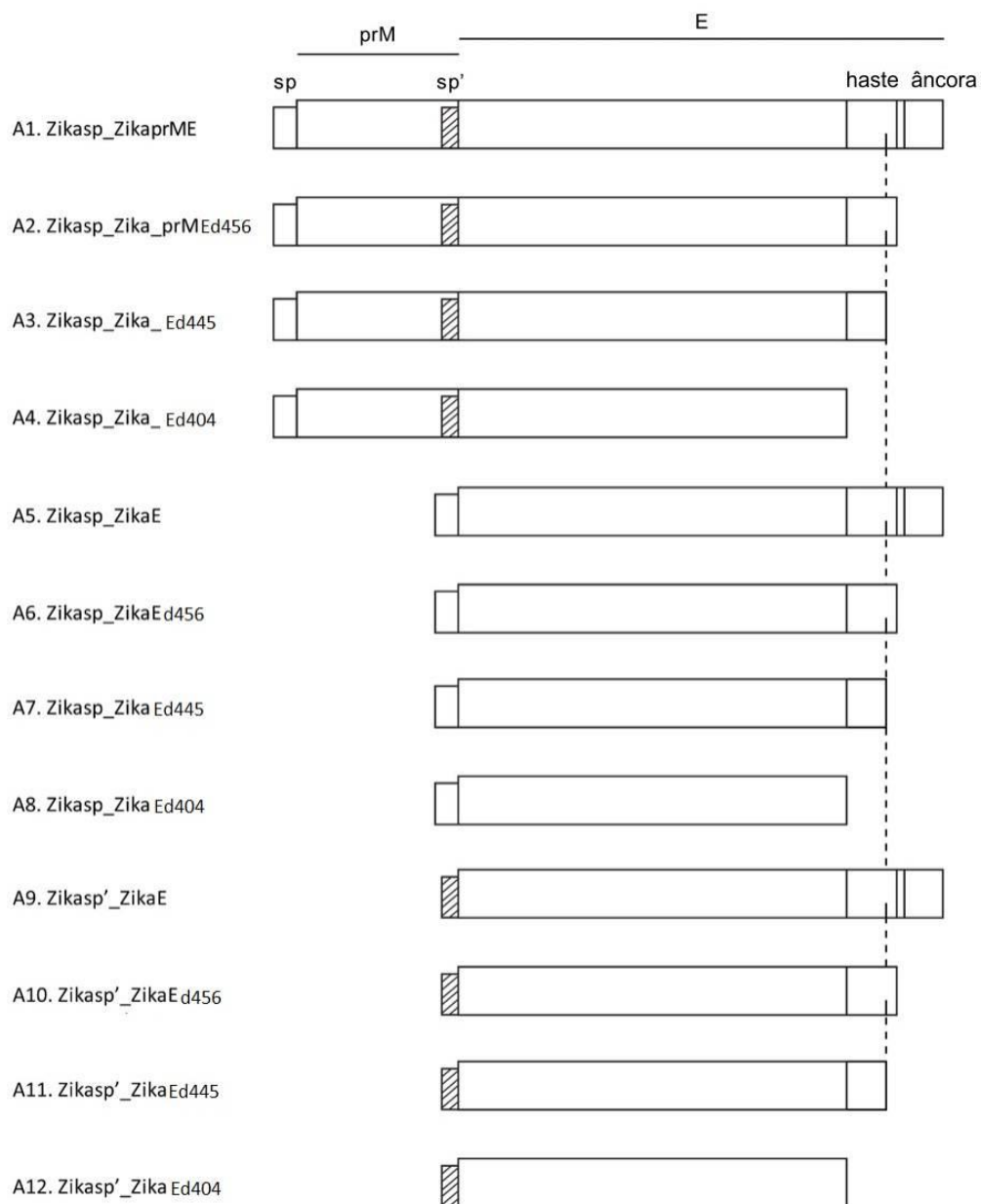
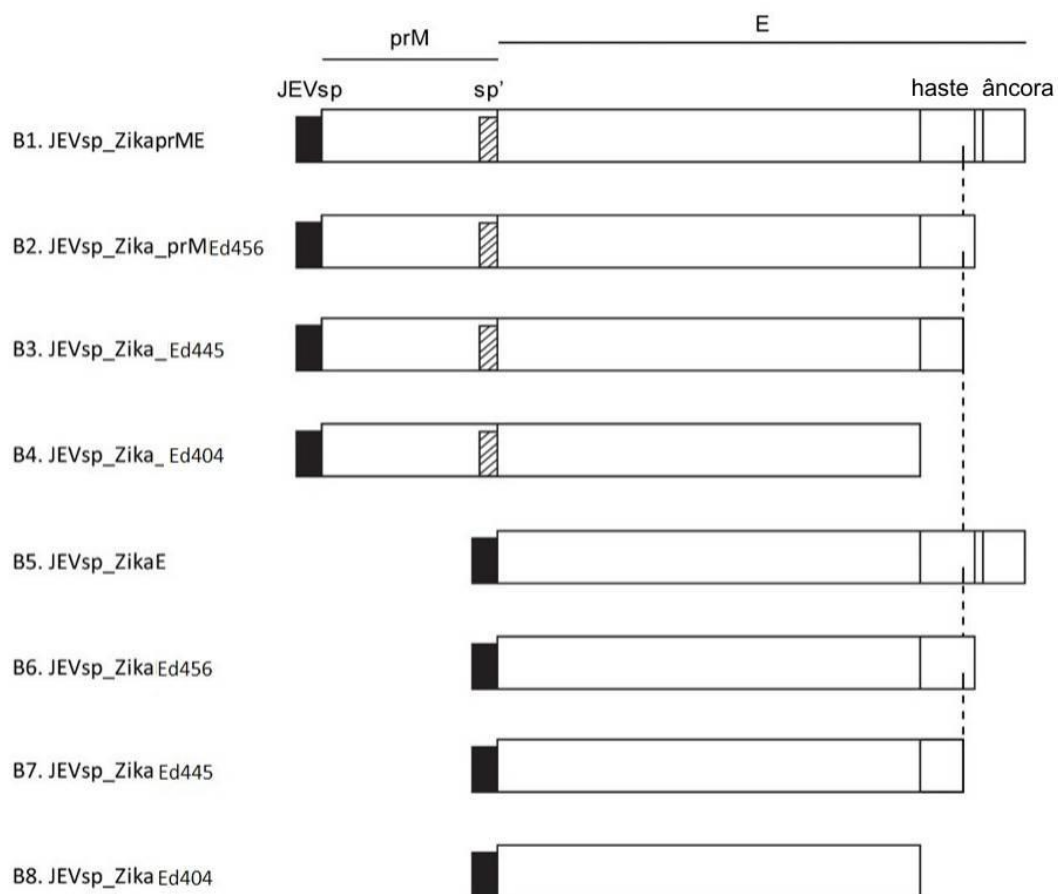


Figura 2

**Figura 3A**

**Figura 3B**

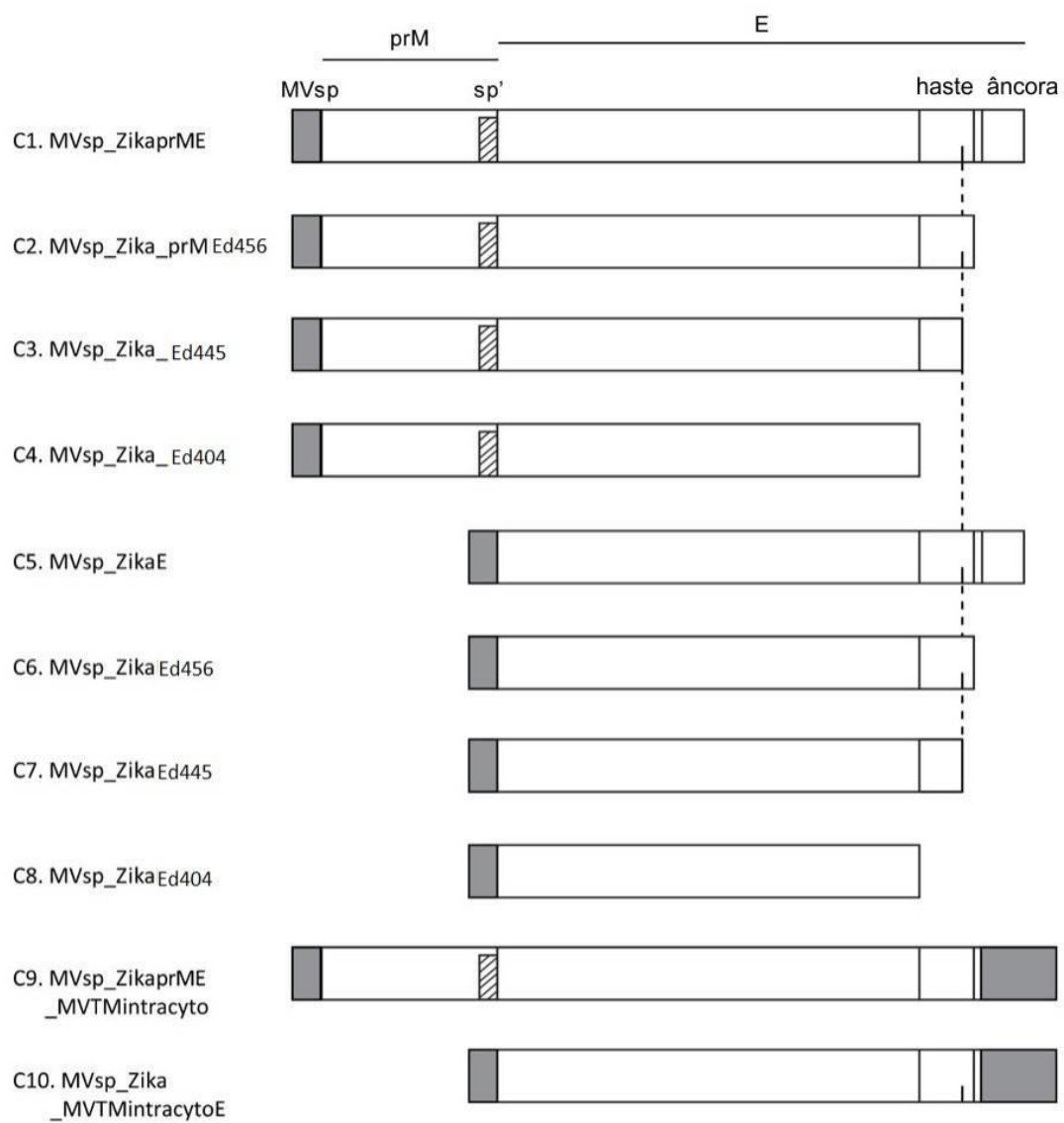
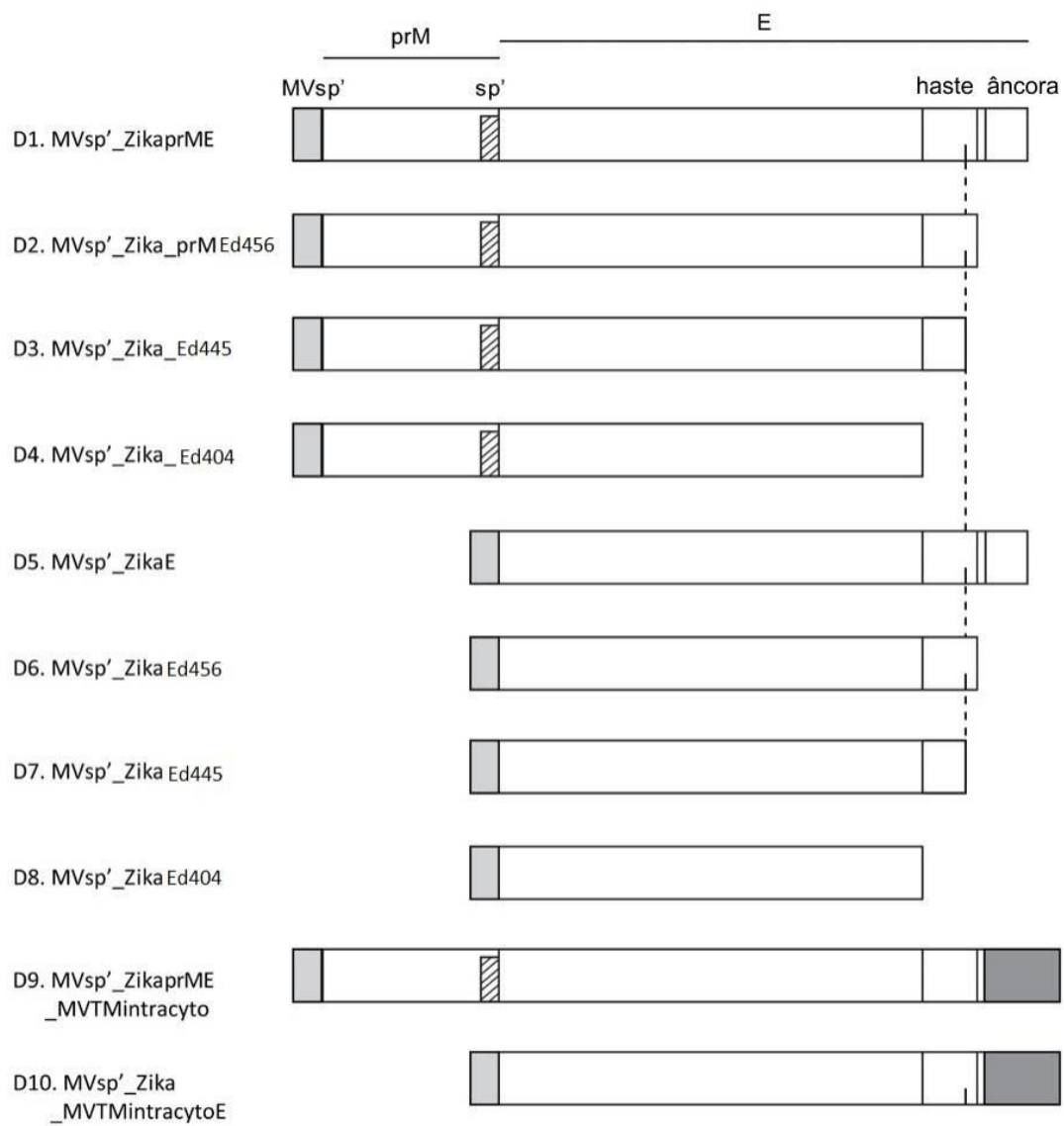


Figura 3C

**Figura 3D**

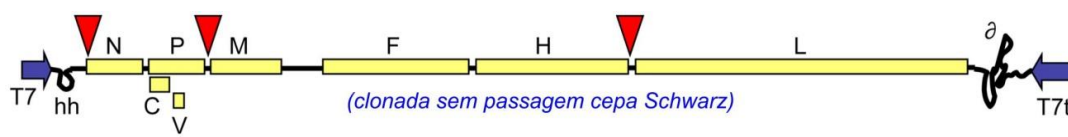
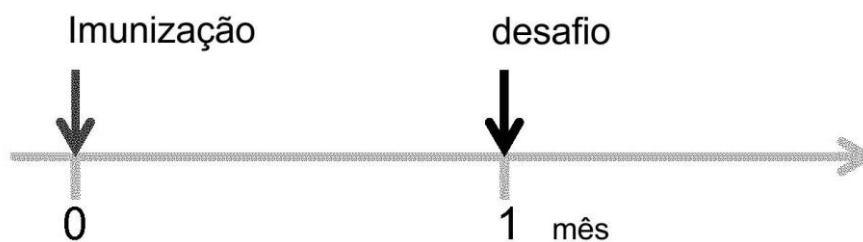


Figura 4



6 camundongos CD64-IFNAR por grupo

Imunização: vetores MV 10^6 TCID₅₀/camundongo

Desafio: Cepa africana do ZIKV 10^6 pfu/camundongo

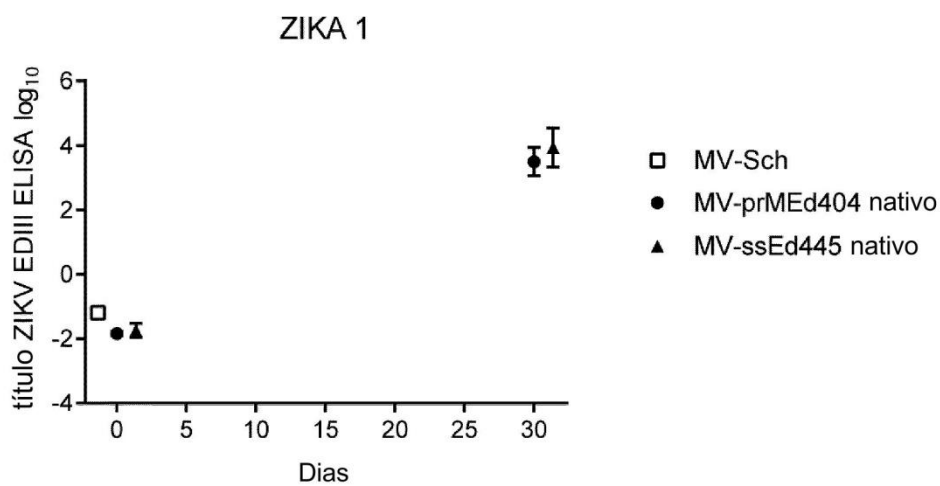
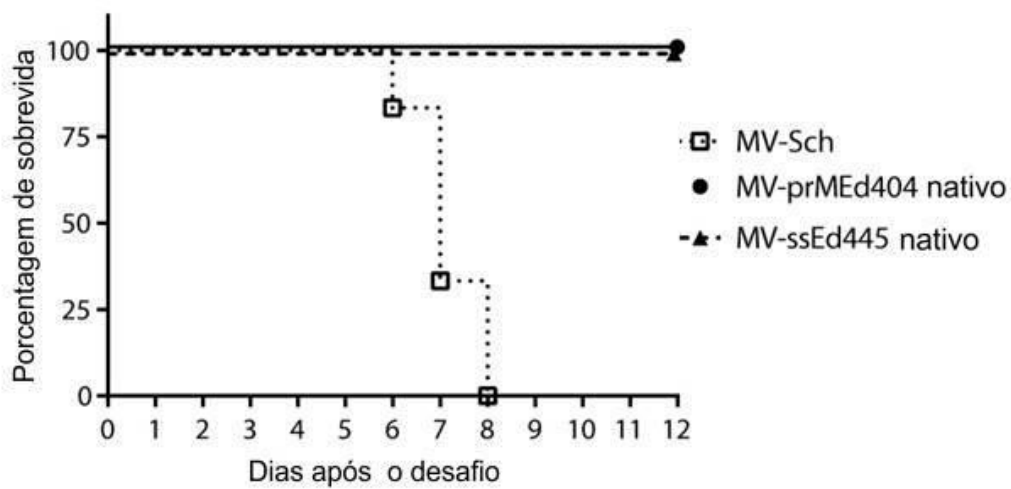
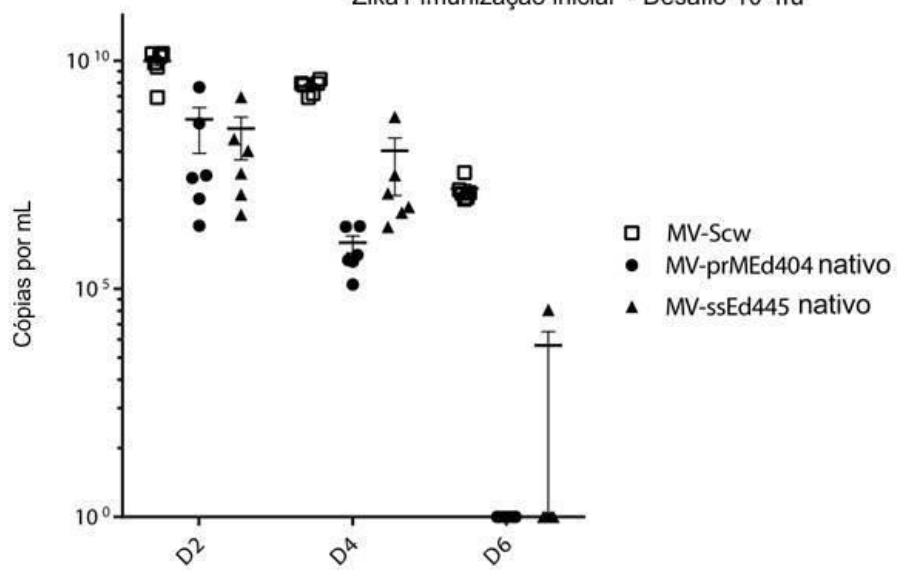


Figura 5A

**Figura 5B**Zika1 Imunização inicial - Desafio 10^6 ffu**Figura 5C**

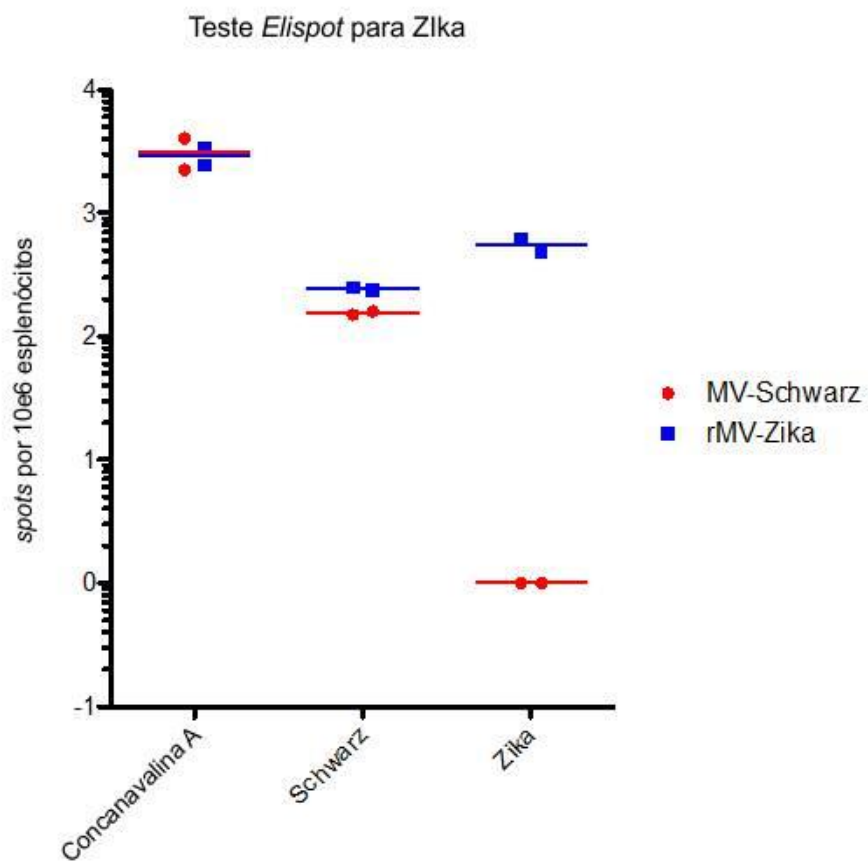
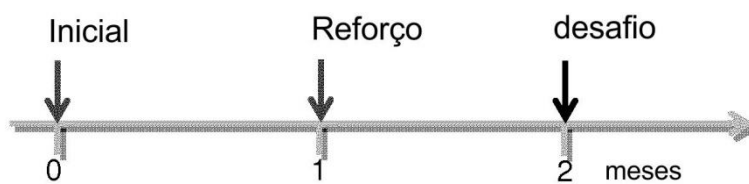


Figura 5D



6 camundongos CD64-IFNAR por grupo

Imunização: vetores MV 10^6 TCID₅₀/camundongo

Desafio: Cepa africana do ZIKV 10^3 pfu/camundongo

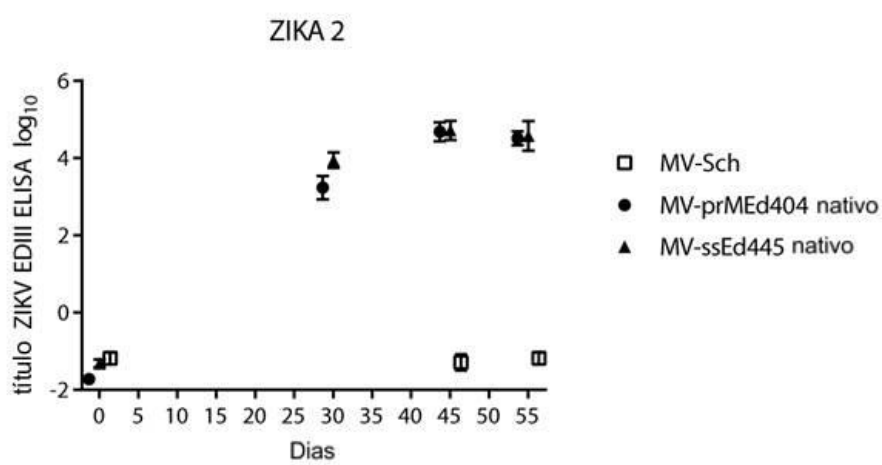


Figura 6A

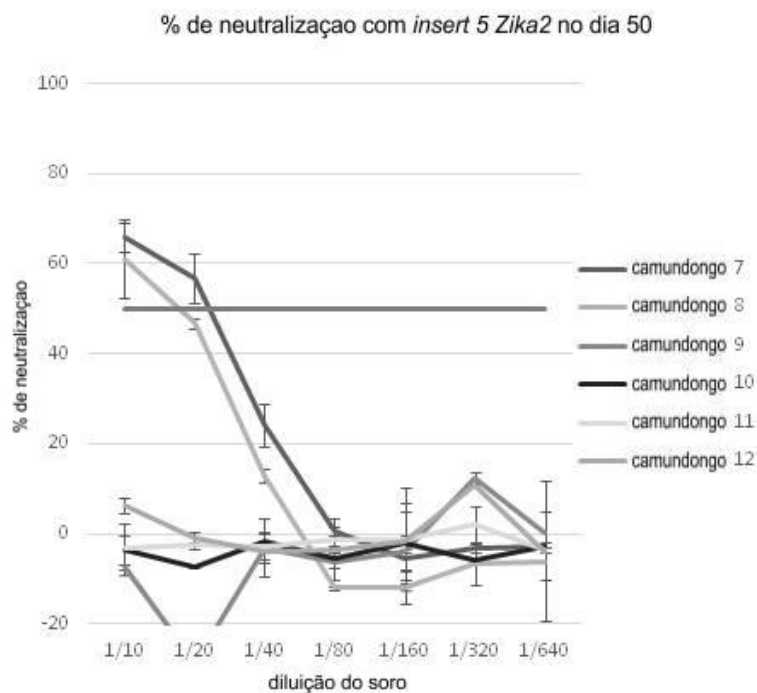
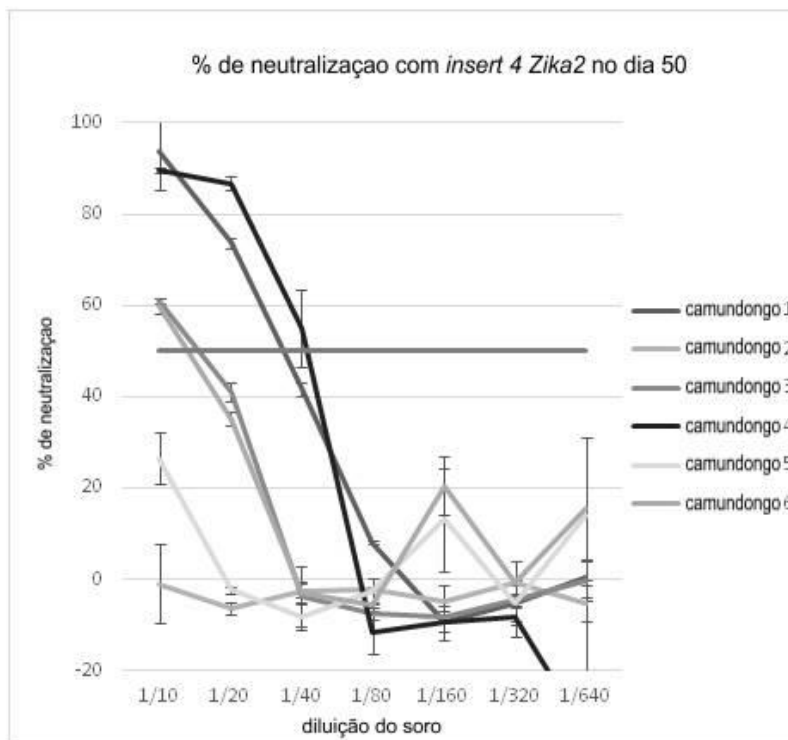


Figura 6B

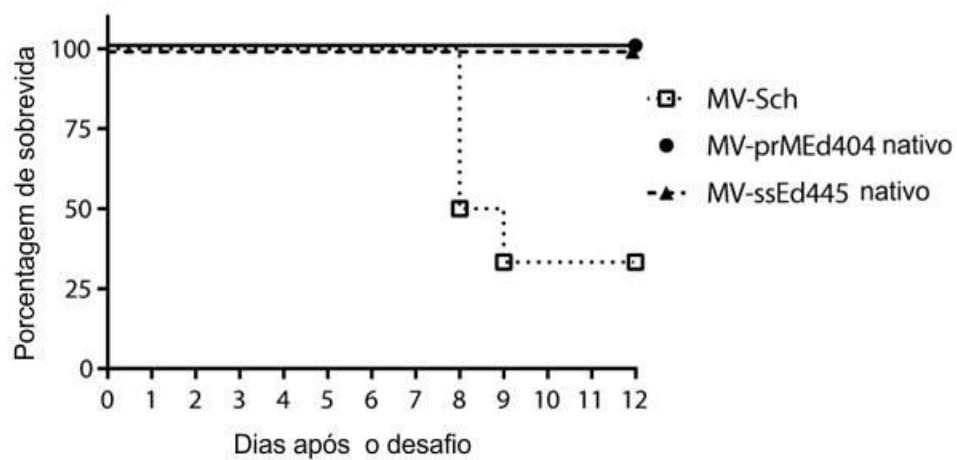


Figura 6C

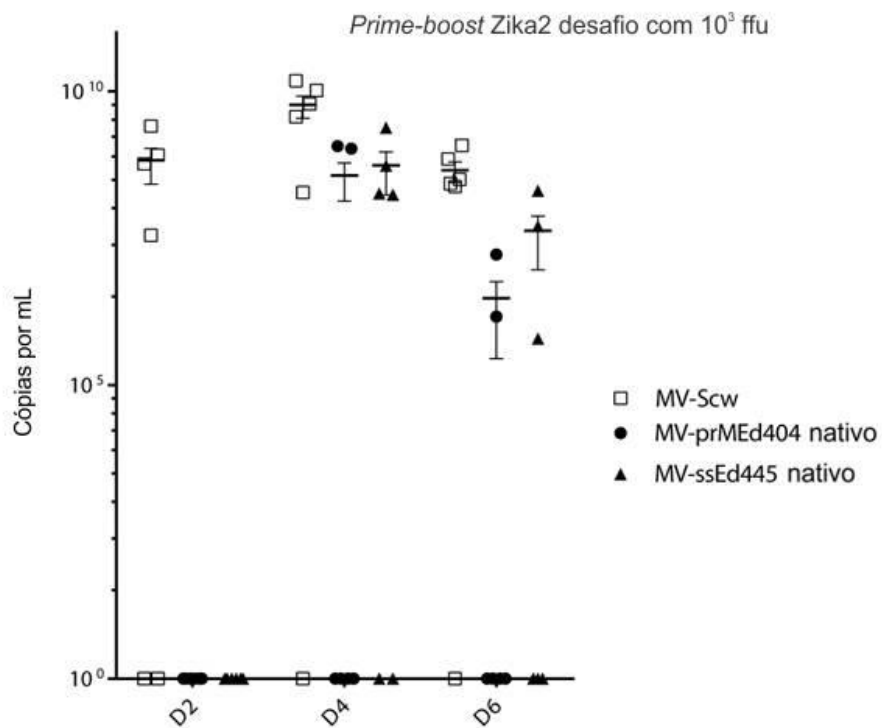


Figura 6D

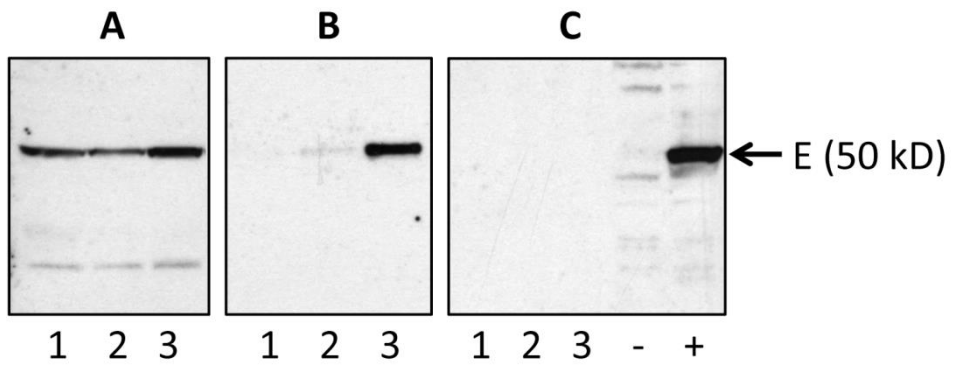


Figura 7

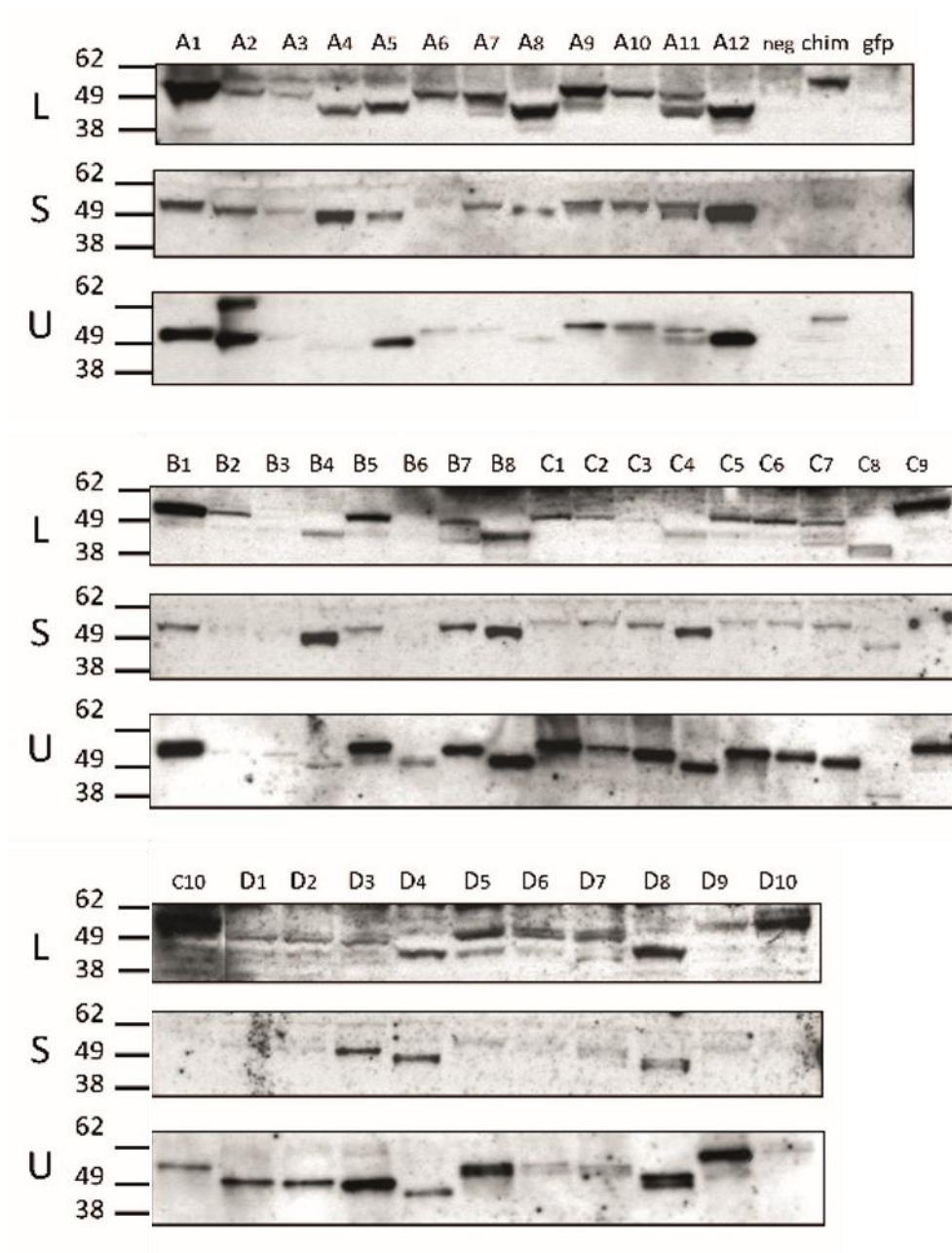


Figura 8

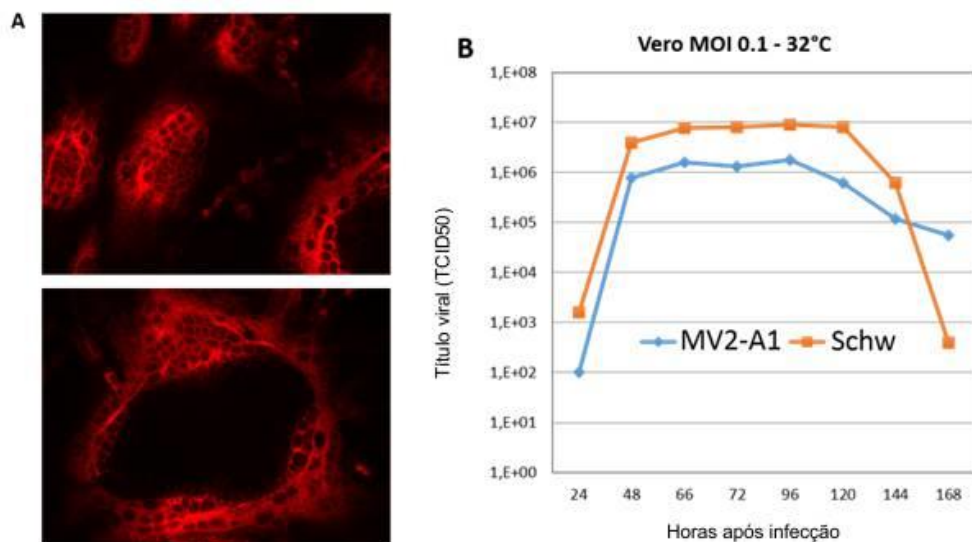


Figura 9

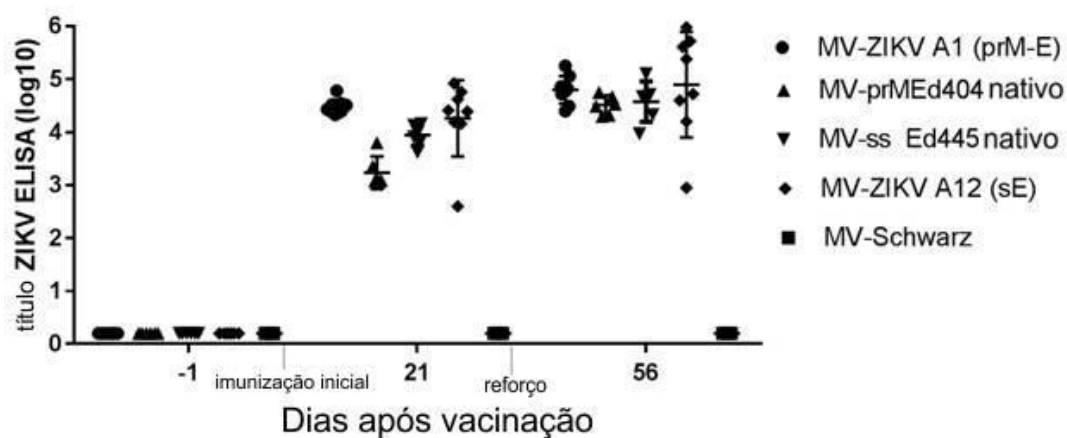


Figura 10

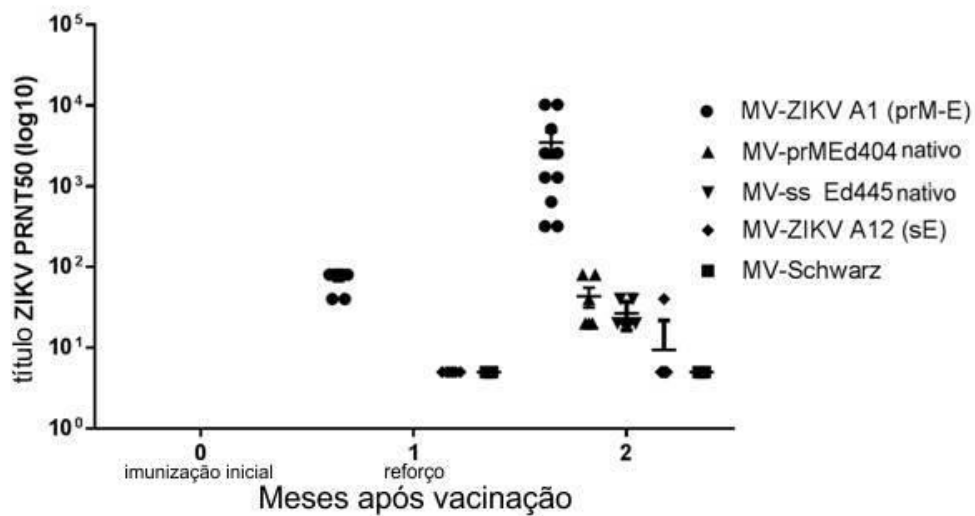


Figura 11

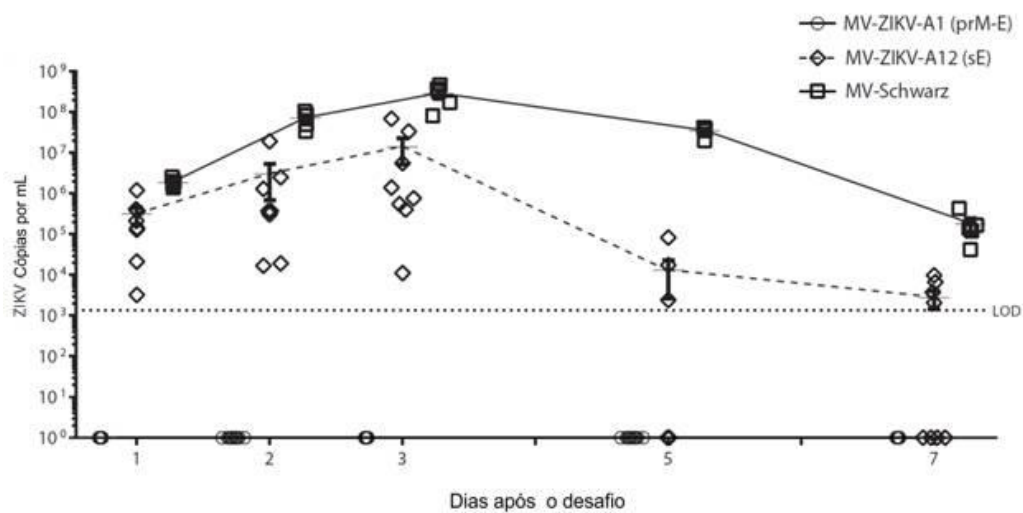
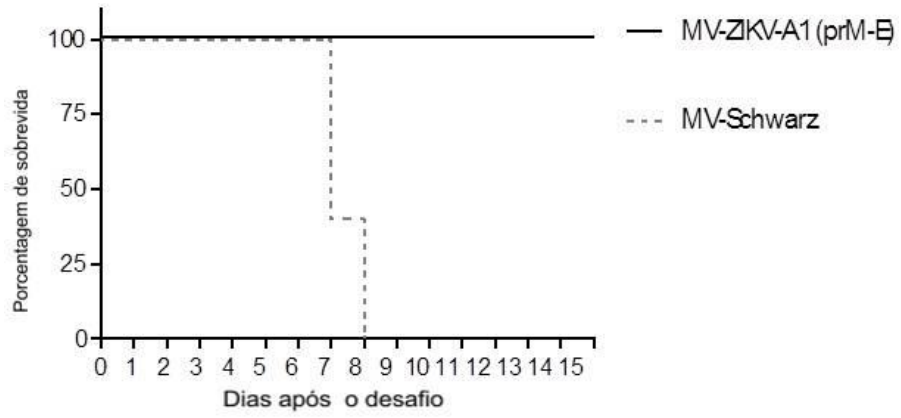


Figura 12

**Figura 13**

RESUMO**“CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR PLASMIDIAL DE TRANSFERÊNCIA, CÉLULAS TRANSFORMADAS, PARTÍCULAS DE VÍRUS SARAMPO-VÍRUS ZIKA (MV-ZIKV), COMPOSIÇÃO OU CONJUNTO DE INGREDIENTES ATIVOS, E PROCESSO PARA RECUPERAR PARTÍCULAS DE VÍRUS SARAMPO-VÍRUS ZIKA (MV-ZIKV)”**

A presente invenção refere-se aos vírus do sarampo recombinantes que expressam proteínas do vírus Zika e suas aplicações, particularmente na indução da proteção preventiva contra o vírus Zika. A presente invenção é direcionada ao vírus do sarampo recombinante (MV) que expressa pelo menos (i) o precursor da proteína de membrana (prM) de um vírus Zika (ZIKV) e a proteína do envelope (E) de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, ou (ii) a proteína E de um ZIKV ou uma versão truncada da mesma, e diz respeito às partículas infecciosas recombinantes do referido MV-ZIKV capazes de se replicarem em um hospedeiro após a administração, e diz respeito também às partículas semelhantes a vírus (VLPs) que contêm essas proteínas ZIKV em suas superfícies. A presente invenção fornece meios, particularmente ácidos nucleicos, vetores, células e sistemas de recuperação para produzir essas partículas infecciosas recombinantes e VLPs. A presente invenção também diz respeito ao uso dessas partículas infecciosas recombinantes e/ou VLPs, em particular sob a forma de uma composição, mais particularmente em uma formulação de vacina, para a prevenção de uma infecção por ZIKV ou para a proteção preventiva contra os desfechos clínicos da infecção pelo ZIKV.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 1199-0191_Exame_RT_Listagem de sequência_MCW-LYY.
- Data de Geração do Código: 10/03/2020
- Hora de Geração do Código: 09:52:35
- Código de Controle:
 - Campo 1: 06F81B988D208A63
 - Campo 2: 49108C83514B13F9