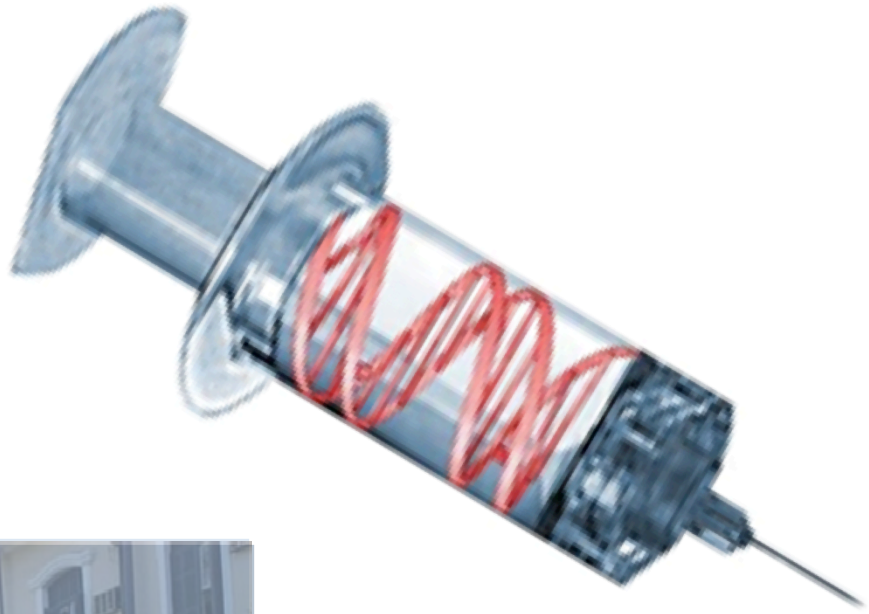
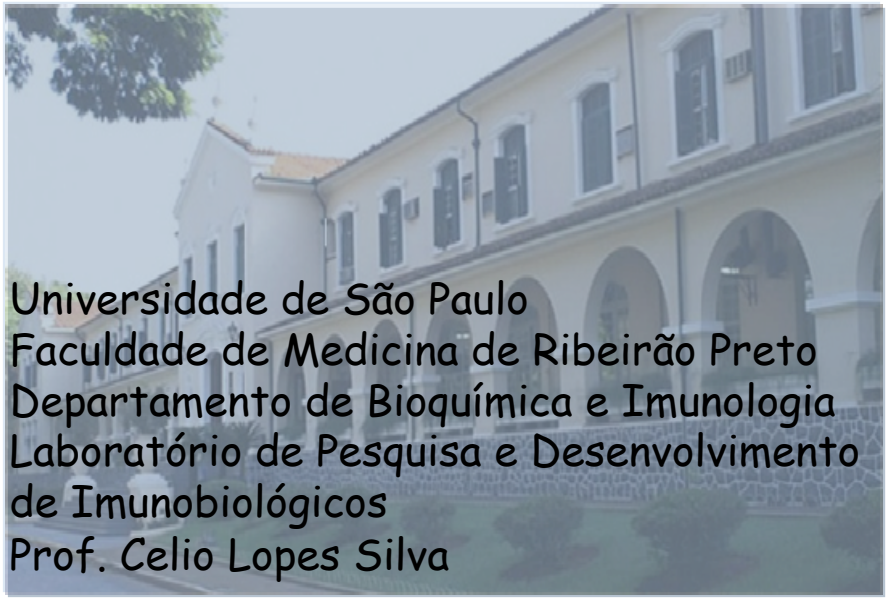
Vacinas de DNA



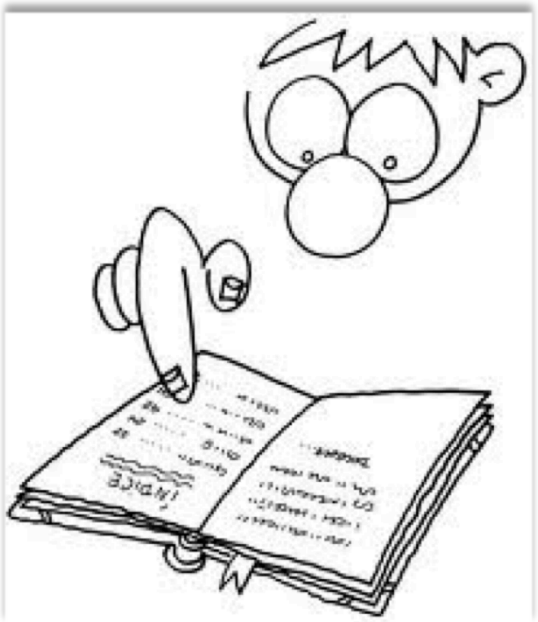


Wendy Martin Rios

Março 2020

VACINAS DE DNA

*Contextualizar
- Conceito
- **Construção**
- Caracterização
- Resposta imunológica
- Vantagens e criticas
- Otimização



? Vacinação

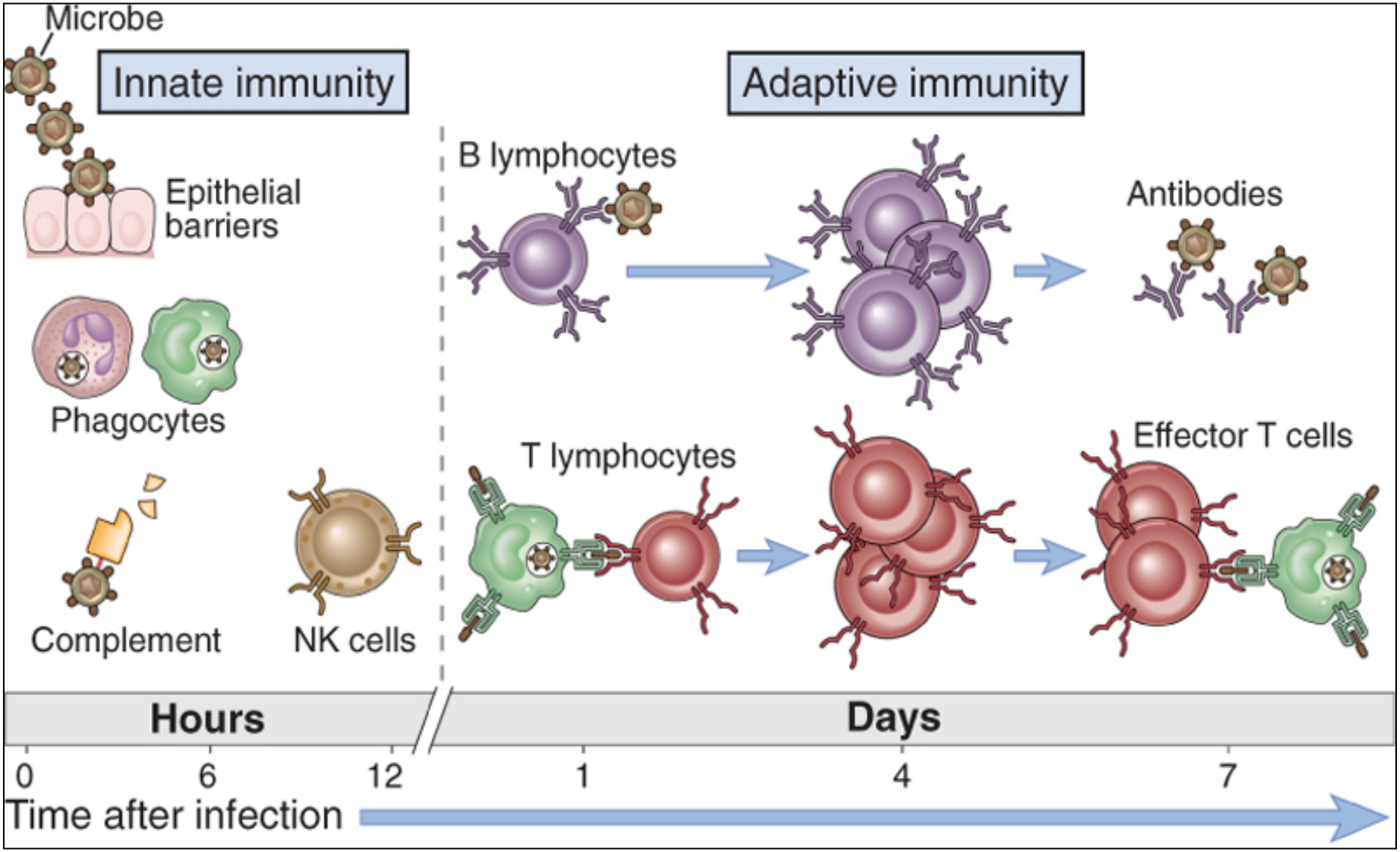
- Vacinologia – Jenner 1796
- Roberto Koch – XIX – microrganismos patogênicos
- Louis Pasteur - atenuação

✓ Microorganismos infecciosos → atenuação

✓ Vacinação → protege contra doenças

- VACINAÇÃO: é o ato de se inocular nos seres vivos estados não ativos de agentes patogênicos (vacinas) para a criação de proteção contra as doenças.

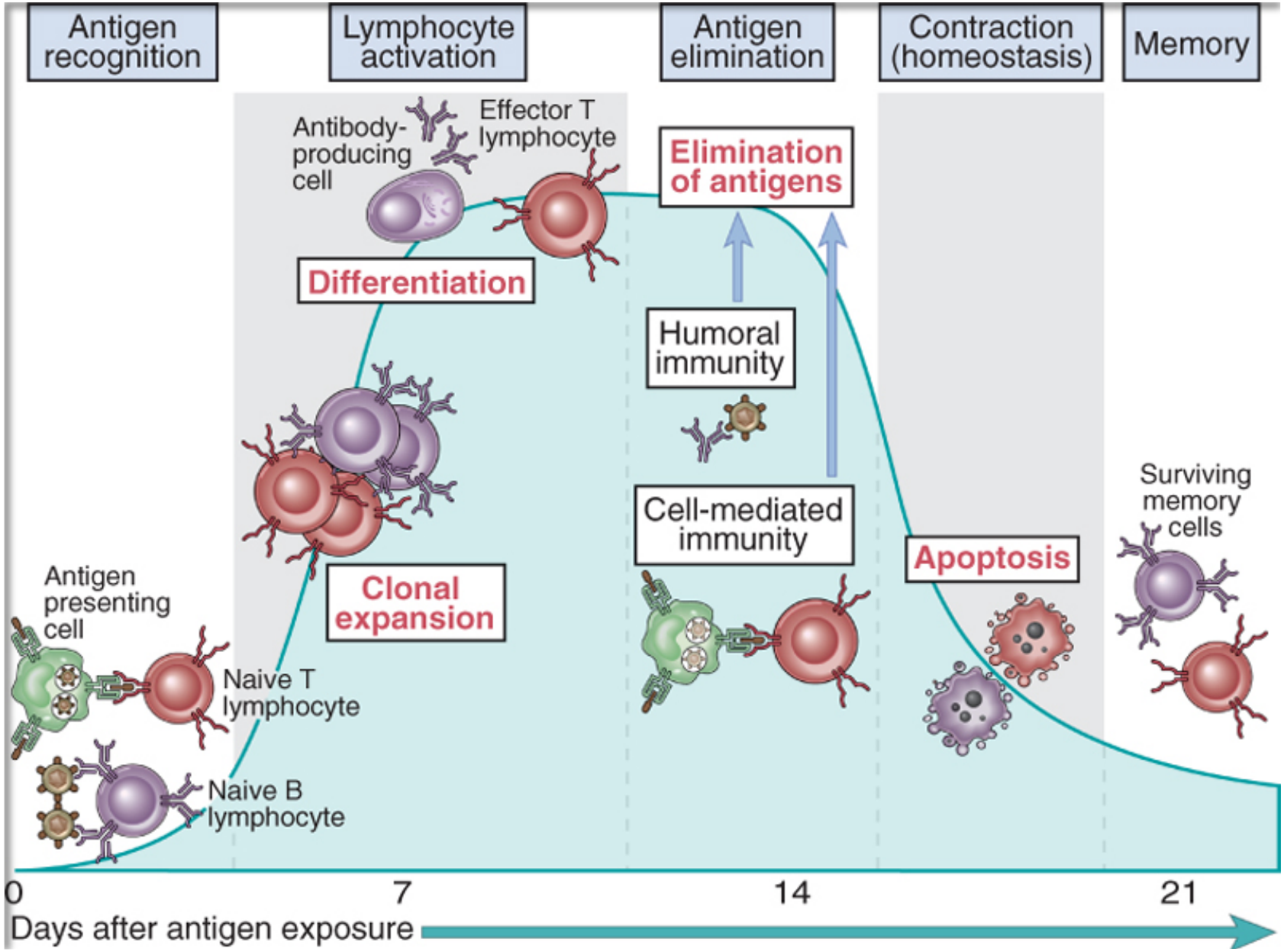
Divisão do SISTEMA IMUNOLÓGICO



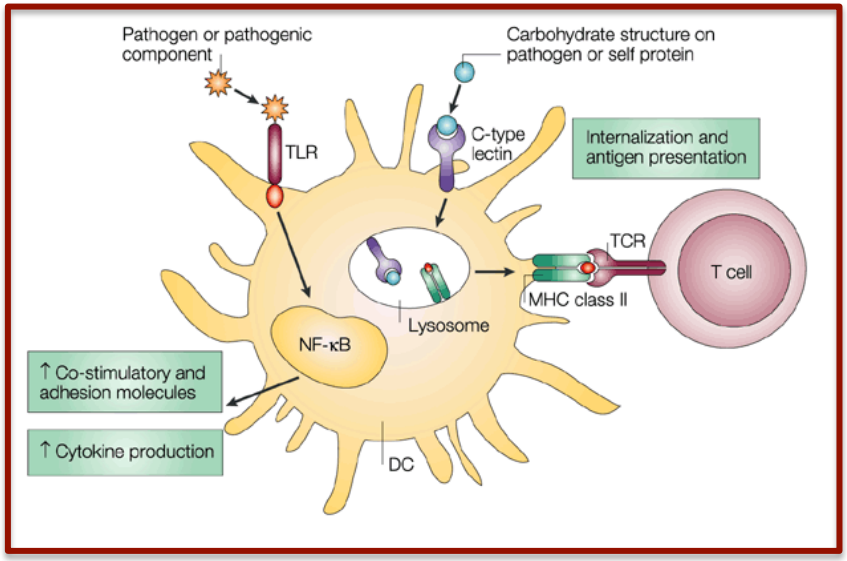
**Sistema de defesa efetivo

**Adaptativa ⟶ memória

**Inata ⟷ Adaptativa

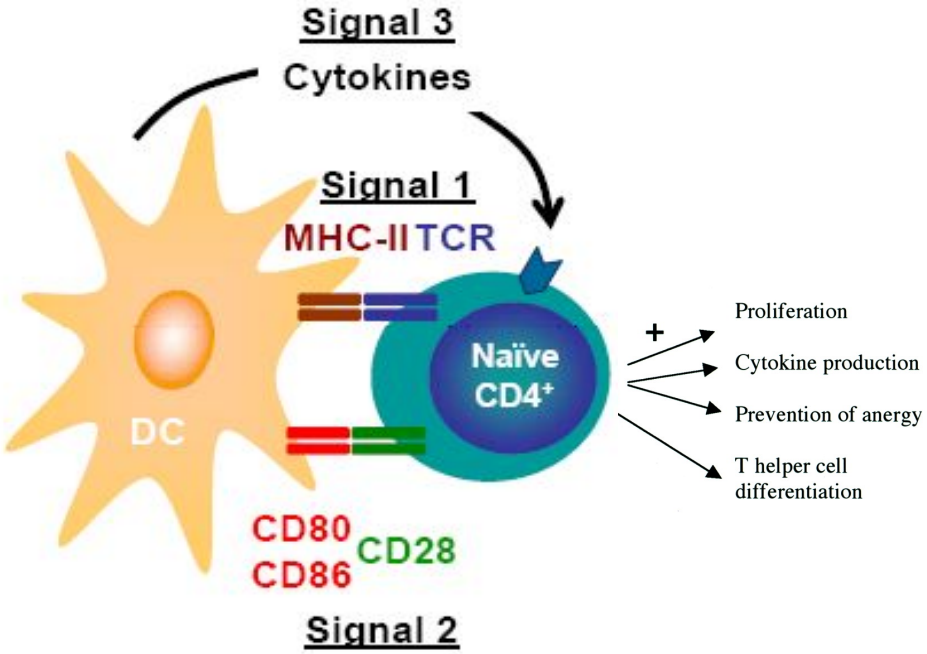

Antigen recognition
Lymphocyte activation
Antigen elimination
Contraction (homeostasis)
Memory
Antibody-producing cell
Effector T lymphocyte
Differentiation
Elimination of antigens
Humoral immunity
Cell-mediated immunity
Clonal expansion
Apoptosis
Surviving memory cells
Antigen presenting cell
Naive T lymphocyte
Naive B lymphocyte
0
7
14
21
Days after antigen exposure

Reconhecimento do antígeno – Ativação de linfócitos - Orgãos linfóides

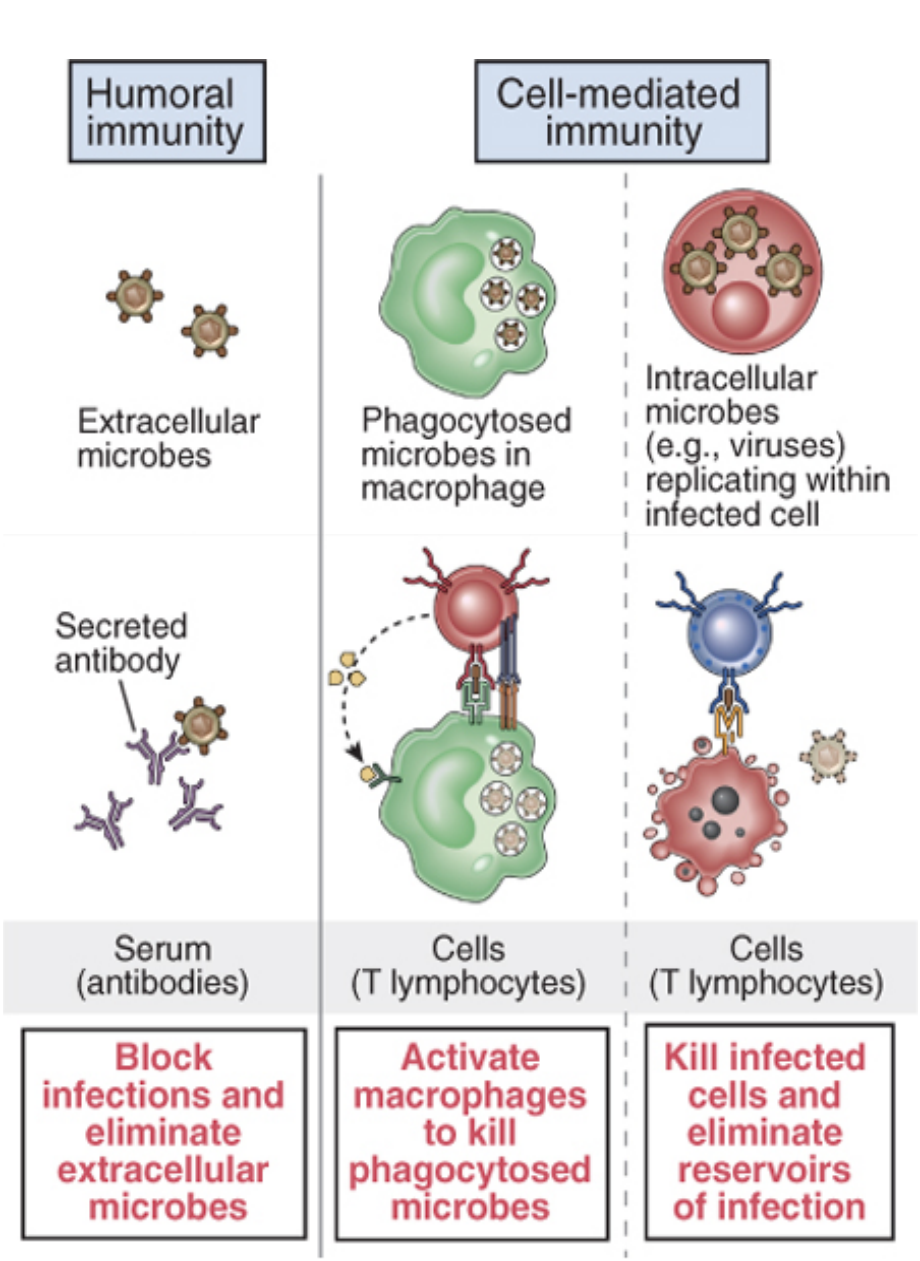


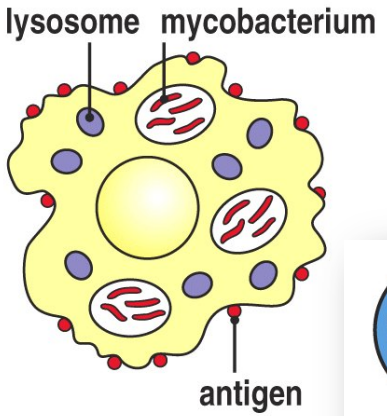
Mature DC

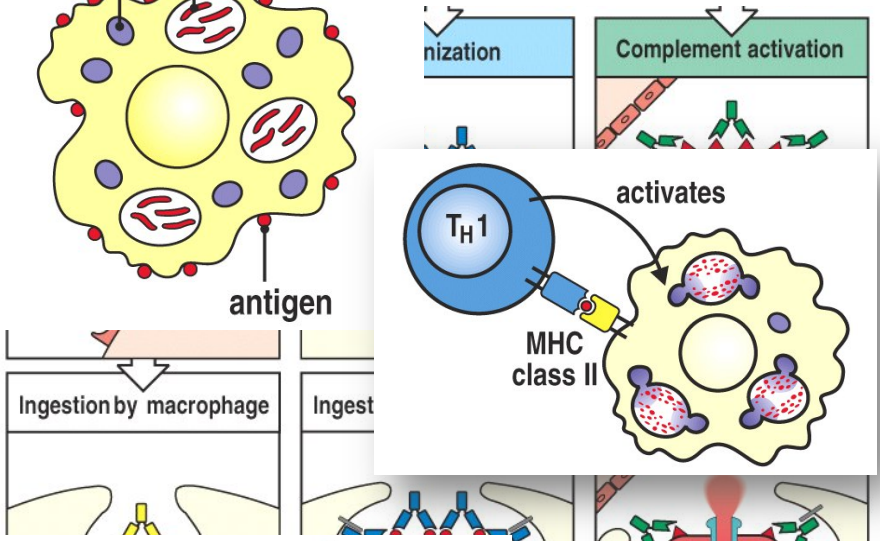
- High MHC class I and II expression
- Chemokine receptor expression
- Adhesion molecule expression
- Co-stimulatory molecule expression (B7-1/B7-2, TNF family)

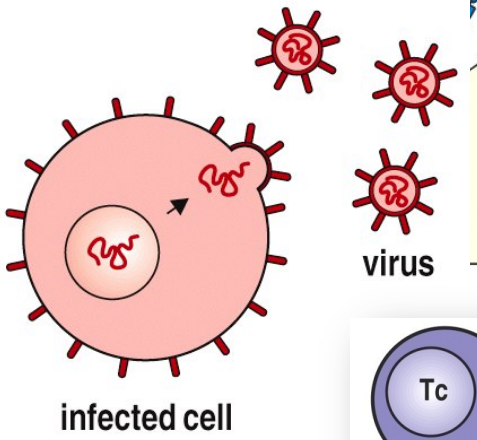


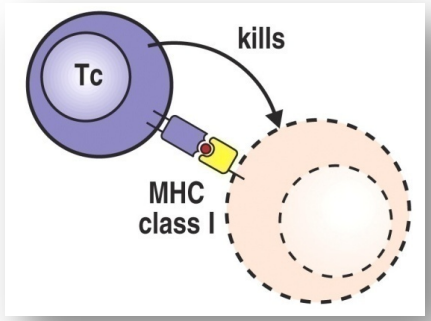
Eliminação do antígeno - Sítio da infecção





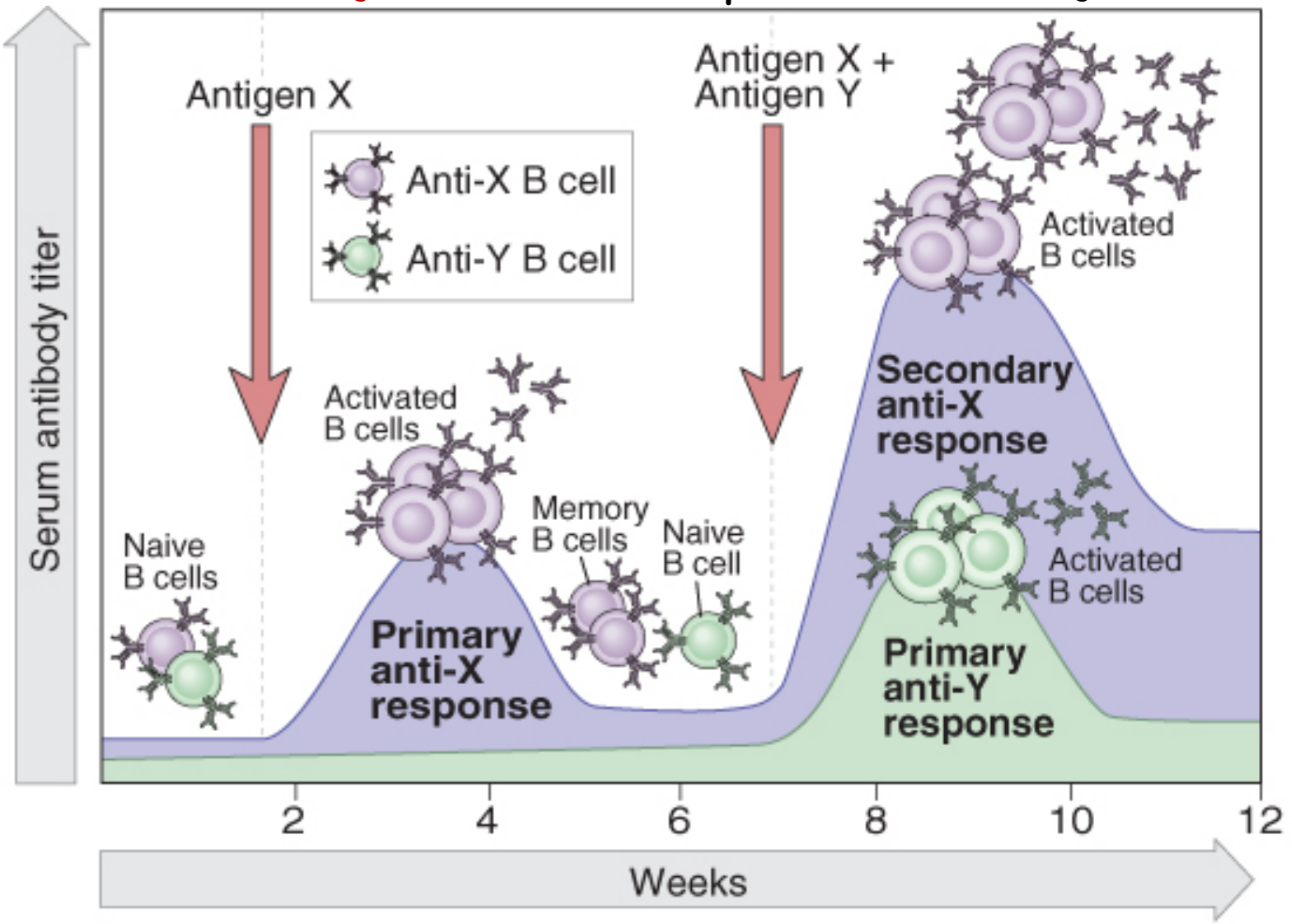






Memória – Células circulantes

"A vacinação simula uma primeira infecção"



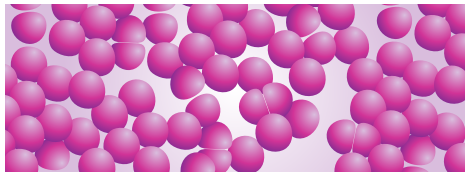
Principais tipos de vacinas

Table 1. Licensed vaccines are grouped into seven classes based on the method of production: live attenuated, killed whole organisms, toxoids/proteins, polysaccharides, glycoconjugates, recombinant, and personalized blood cell re-infusion

Method of production	Licensed vaccines
Live attenuated	Smallpox, rabies, tuberculosis (BCG), yellow fever, polio (OPV), measles, mumps, rubella, typhoid, varicella, rotavirus, influenza (cold adapted), zoster
Killed whole organism	Typhoid, cholera, plague, pertussis, influenza, typhus, polio (IPV), rabies, Japanese encephalitis, tick-born encephalitis, hepatitis A
Toxoid/protein	Diphtheria, tetanus, acellular pertussis, anthrax, influenza subunit
Polysaccharide	Pneumococcus, meningococcus, Haemophilus influenzae B, typhoid (Vi)
Glycoconjugate	*Haemophilus influenzae* B; pneumococcus (7, 10, and 13 valent), meningococcus C, meningococcus ACWY
Recombinant	Hepatitis B, cholera toxin B, human papillomavirus; meningococcus B; hepatitis E
Blood cell infusion	Prostate cancer

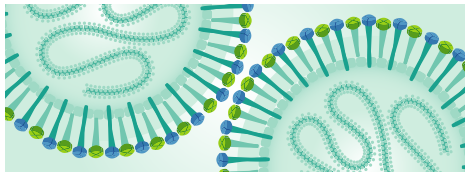
- Sipuleucel-T → células do sangue do paciente → antígeno + GM-CSF → paciente

- Vacinologia reversa → informação genética → antígenos (importantes; conservados - variação antigênica entre as linhagens)



BACTERIA

- *Mycobacterium tuberculosis* (TB)
- Group A *Streptococcus* (GAS)
- Group B *Streptococcus* (GBS)
- *Staphylococcus aureus*
- *Shigella* and pathogenic *E. coli*
- *Salmonella*
- *Chlamydia*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Non-typeable *Haemophilus influenzae*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Clostridium difficile*



VIRUSES

- Hepatitis C virus (HCV)
- Human immunodeficiency virus (HIV)
- Dengue
- Respiratory syncytial virus (RSV)
- Cytomegalovirus (CMV)
- Epstein Barr virus (EBV)
- Herpex simplex virus (HSV)
- Enteroviruses
- Ebola
- Marburg hemorrhagic fever
- Parvovirus
- Norovirus

PARASITES

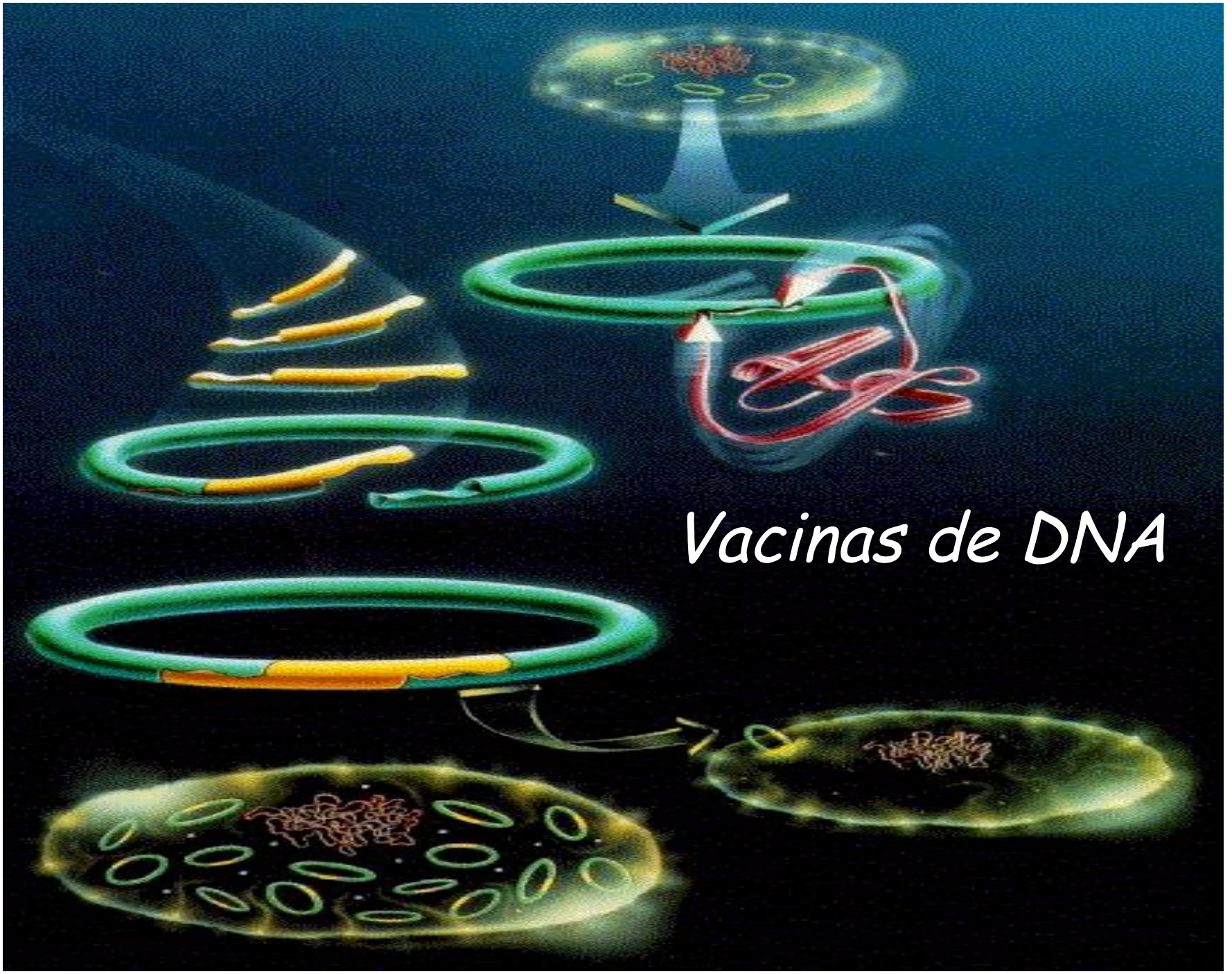
- *Plasmodium*
- *Leishmania*
- *Schistosoma*
- *Trypanosoma*
- *Brucella*
- *Cryptosporidium*
- *Entamoeba*

THERAPEUTIC VACCINES

- Chronic infectious diseases
- Cancer
- Autoimmune diseases
- Inflammatory disorders
- Allergies

Doenças alvos – desenvolvimento de vacinas

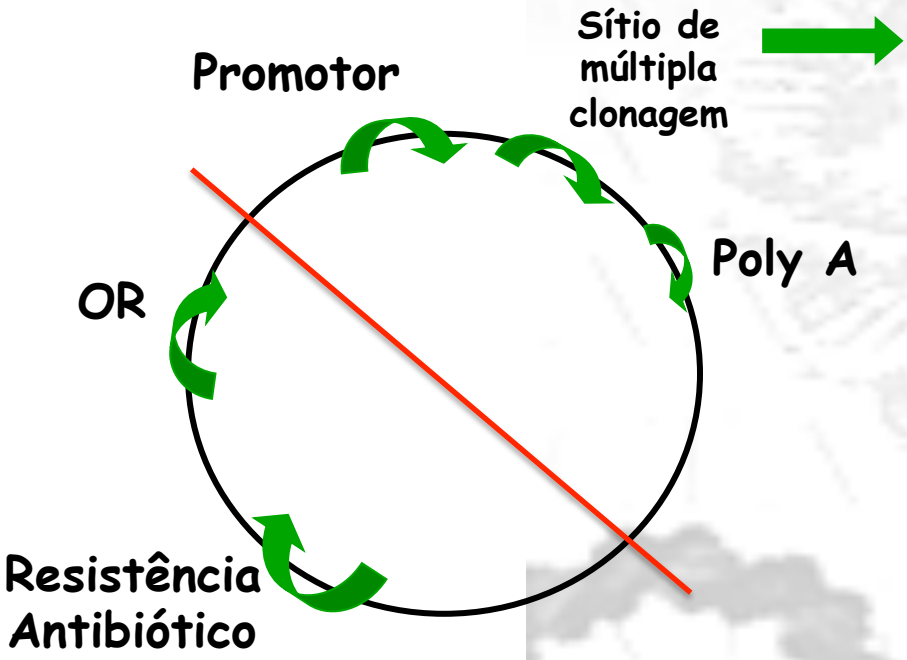
- ✧ Vacinas desenvolvidas - efetivas em proteger patógenos com baixa variabilidade antigênica
- ✧ Vacinas – sem sucesso – patôgenos com alta taxa de mutação (HIV e HCV)
- ✧ Vacinas licensiadas – anticorpos (neutraliza e opsoniza); sucesso limitado em infecções controladas por células T
- ✧ Falta de entendimento da patogênese, de modelos animais e do entendimento de quais fatores protegem dificulta o desenvolvimento de determinadas vacinas


Vacinas de DNA

Vacinas de DNA

- ✧ Plasmídeo
- ✧ Gene

- ✓ DNA circular bacteriano
- ✓ Extracromossômico
- ✓ Replicação
- ✓ Confere vantagem



Gene

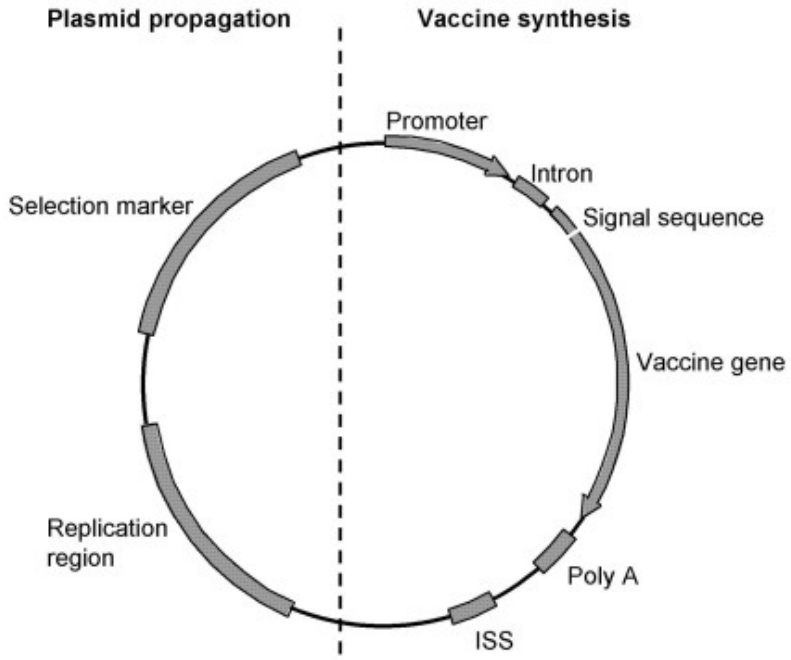
» Proteínas importantes para o microorganismo

Origem de Replicação

- ✓ Sequência no DNA → proteínas → abrir a dupla-fita de DNA → replicação
- ✓ Vetores → ↑ duplicar → bactéria
- ✓ pUC → Alta replicação

Resistência a Antibiótico

- ✓ Gene que codifica uma proteína
- ✓ Seleção do vetor em *E. Coli*
- ✓ Kanamicina (pVAX)

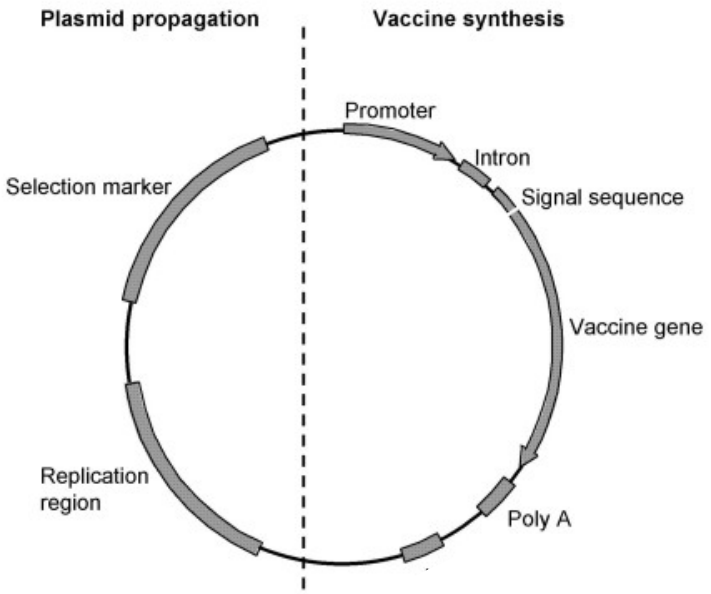


****E. coli**

Promotor

Gene (DNA) → RNA → proteína

- ✓ Sequência no DNA → RNA polimerase → transcrição do gene → síntese do RNA mensageiro
- ✓ Sequência comum → consenso
  Variações - Promotores fracos
- ✓ P_{CMV} → Citomegalovírus humano → promotor + enhancer

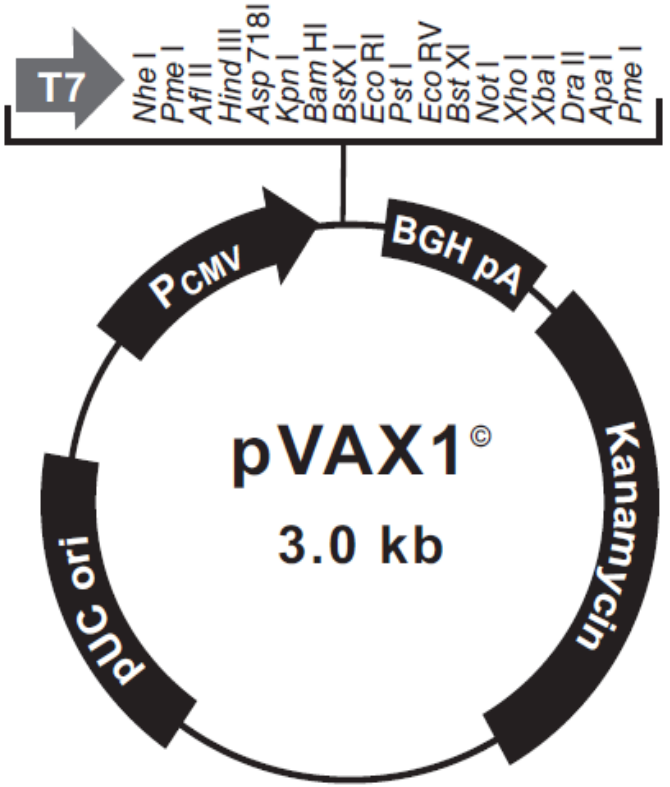


Sinal de poliadenilação – Poly A

- ✓ Sinal para adição de adeninas no final do RNA mensageiro
- ✓ Protege a molécula de exonucleases
- ✓ Terminação da transcrição e exportação do RNA para fora do núcleo;
- ✓ BGH_{PA} → Hormônio de crescimento bovino → eficiente terminação e poliadenilação

**Célula mamífero

Sítio de múltipla clonagem




```
                T7 promoter/priming                                  Nhe          Pme  Afl II  Hind III  Asp718
661  AATTAATACG ACTCACTATA GGGAGACCCA AGCTGGCTAG CGTTTAAACT TAAGCTTGGT

     Kpn        BamH                          BstX I*  EcoR          Pst I  EcoR          BstX I*  Not
721  ACCGAGCTCG GATCCACTAG TCCAGTGTGG TGGAATTCTG CAGATATCCA GCACAGTGGC

           Xho        Xba     Dra II   Apa I   Pme I*                    BGH Reverse priming site
781  GGCCGCTCGA GTCTAGAGGG CCCGTTTAAA CCCGCTGATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA
                   stop codon

841  GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCCTCCC CCGTGCCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA

                        BGH polyadenylation
901  CTCCCACTGT CCTTTCCTAA TAAAATGAGG AAATTGCATC
```

Construção

Gene → sintetizar ou amplificar

- ✓ Escolher enzimas para clonar no sítio de múltipla clonagem
  **verificar os sítios de enzimas no interior do gene
- ✓ Verificar se o gene apresenta a sequência Kozac (ACCATG) → início da tradução
- ✓ Verificar se o gene apresenta um stop códon → finalização da tradução

Gene

ATGGCCAAAGCCGCGGCGATCATTCGGATTCCATCGGTACGTAATGCG
GACTGCAGTCGATCCGGTAGCCTGATAGCGCTAGGCTAGCCTAGGTAT
TCGTAGCTGTACGTTTCAATCGGATCGGACATTGAGGAGGTGGAT**TGA**

Sintetizar

TACTAGCTAGCACC**ATG**GCCAAAGCCGCGGCGATCATTCGGATTCCATCGGTACGTAATGCG
GACTGCAGTCGATCCGGTAGCCTGATAGCGCTAGGCTAGCCTAGGTATTCGTAGCTGTACGT
TTCAATCGGATCGGACATTGAGGAGGTGGAT**TGA**TCTAGAAT

Amplificar

5’ TACTAGCTAGCACC**ATG**GCCAAAGCCGCGGCG 3’

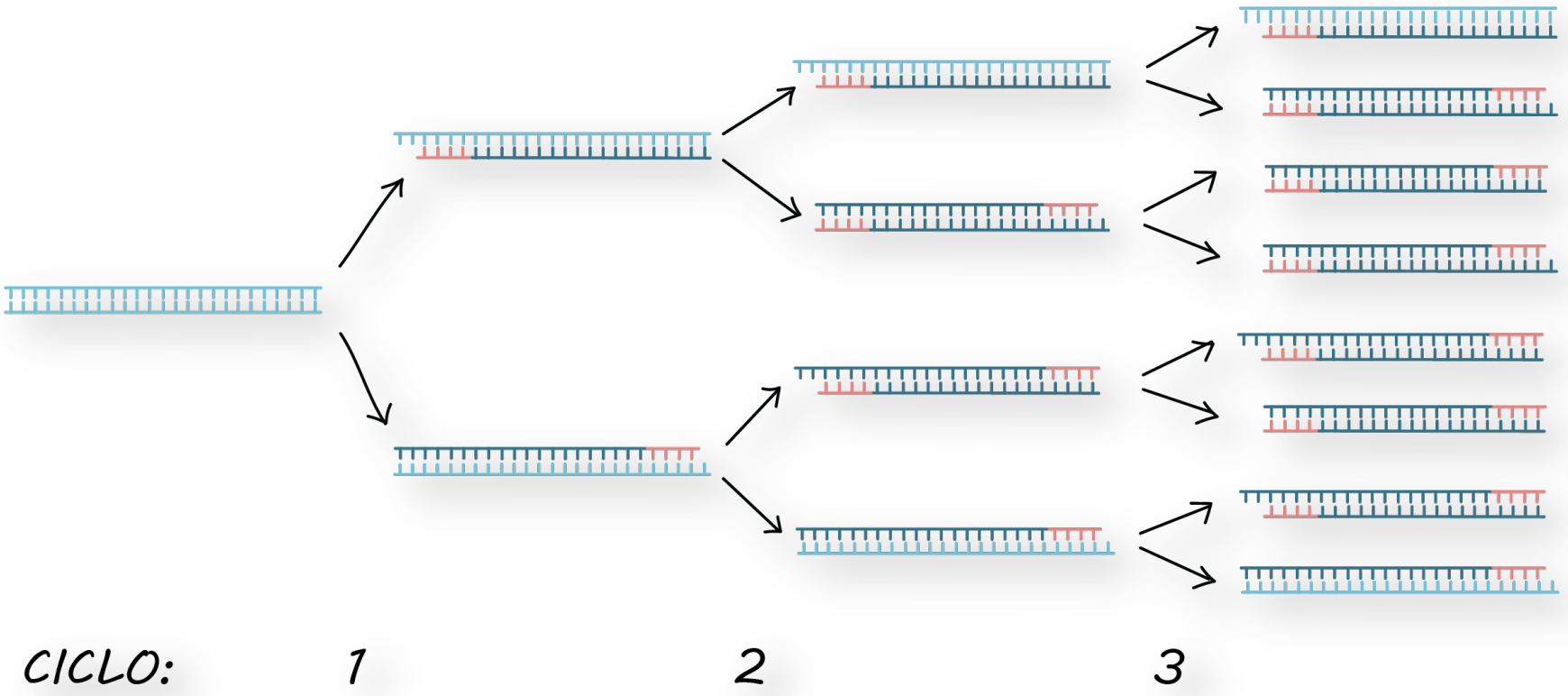
5’ ATTCTAGA**TCA**ATCCACCTCCTCAATG 3’

Construção

Amplificar

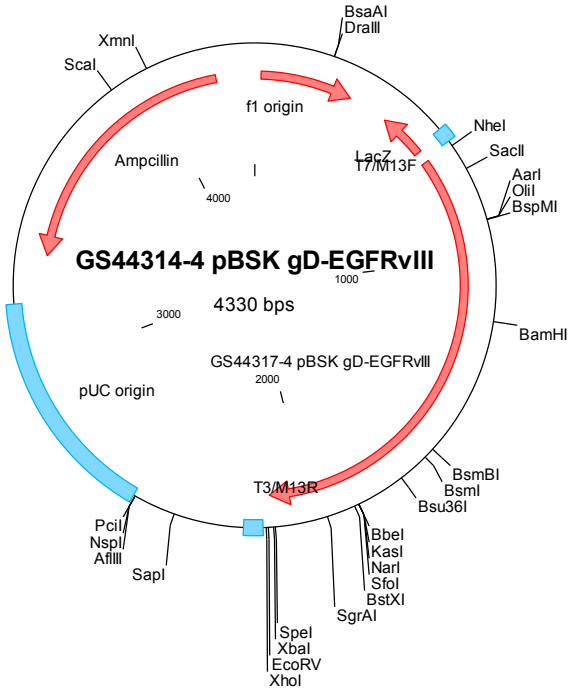
5’ TACTAGCTAGCACC**ATG**GCCAAAGCCGCGGCG 3’

5’ ATTCTAGA**TCA**ATCCACCTCCTCAATG 3’



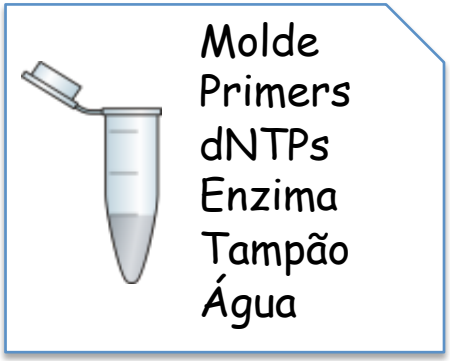
Construção

- Gene sintetizado → gene no plasmídeo ou só o gene → purificados

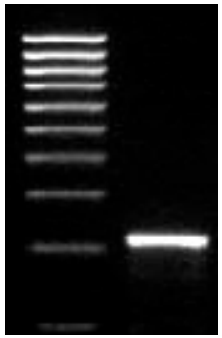


NheI *XbaI*

- Gene amplificado



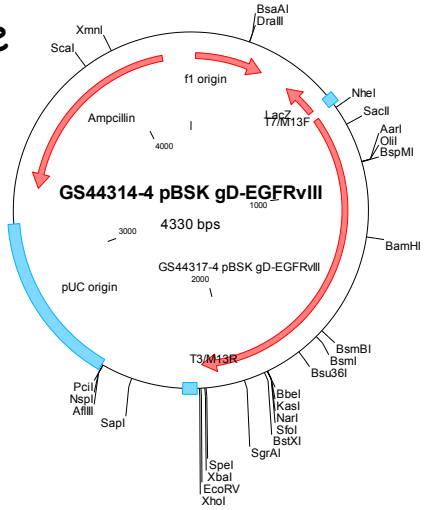
NheI *XbaI*



→ purificar

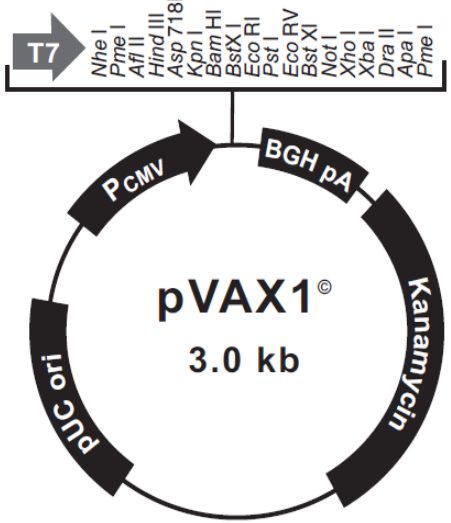
Construção

- Gene



NheI *XbaI*

- Plasmídeo



Enzimas de restrição

Construção → enzimas de restrição

Microorganism	Restriction Enzyme Name	Restriction Site
Bacillus amyloliquefaciens H	*Bam*HI	G|G A T C C C C T A G|G
Brevibacterium albidum	*Bal*I	T G G|C C A A C C|G G T
Escherichia coli RY13	*Eco*RI	G|A A T T C C T T A A|G
Haemophilus aegyptius	*Hae*II	Pu G C G C|Py Py|C G G C Pu
Haemophilus aegyptius	*Hae*III	G G|C C C C|G G
Haemophilus influenzae R_d	*Hind*II	G T Py|Pu A C C A Pu|Py T G
Haemophilus influenzae R_d	*Hind*III	A|A G C T T T T C G A|A
Haemophilus parainfluenzae	*Hpa*I	G T T|A A C G A A|T T G
Haemophilus parinfluenzae	*Hpa*II	C|C G G G G C|C
Providencia stuartii 164	*Pst*I	C T G C A|G G|A C G T C
Streptomyces albus G	*Sal*I	G|T C G A C C A G C T|G

Table 2.1: *Restriction enzymes*

NheI

5'...G↓CTAGC...3'
3'...CGATC↓G...5'

G CTAGC
CGATC G

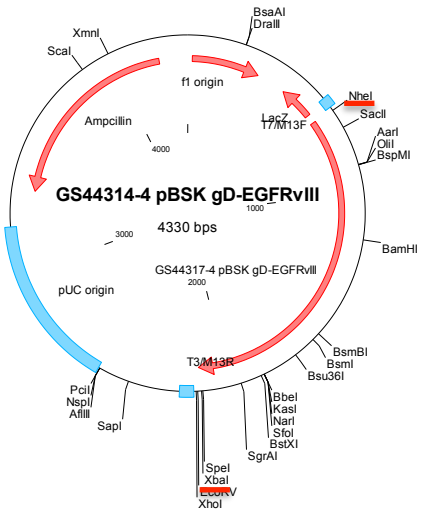
XbaI

5'...T▼CTAGA...3'
3'...AGATC▲T...5'

T CTAGA
AGATC T

Construção → enzimas de restrição

Clivagem do Gene



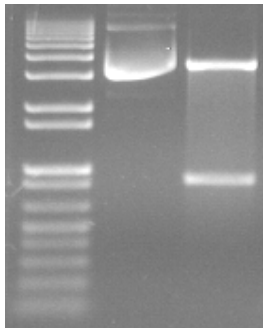
NheI *XbaI*

Enzimas de restrição

PstI *HindIII* *BamHI* *SmaI*

AATTCCTGCAGAAGCTTCCGGATCCCCGGG
GGACGTCTTCGAAGGCCTAGGGGCCCTTAA

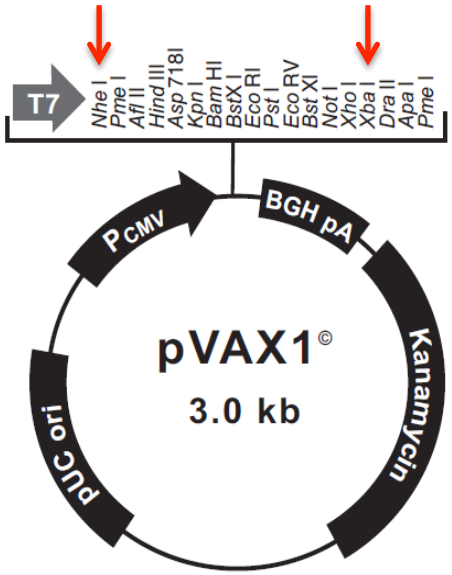
Alvo
Enzimas
Tampão**
Água**
Temperatura/tempo



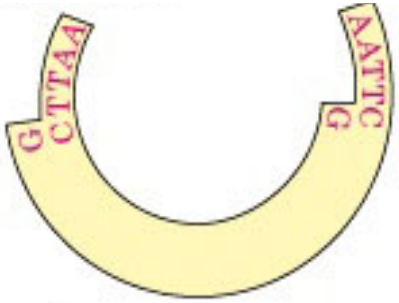
→ purificar

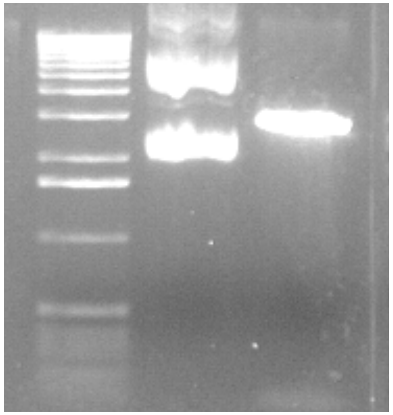
Construção

Clivagem do Plasmídeo



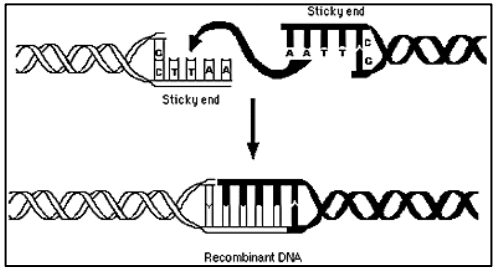
Enzimas de restrição



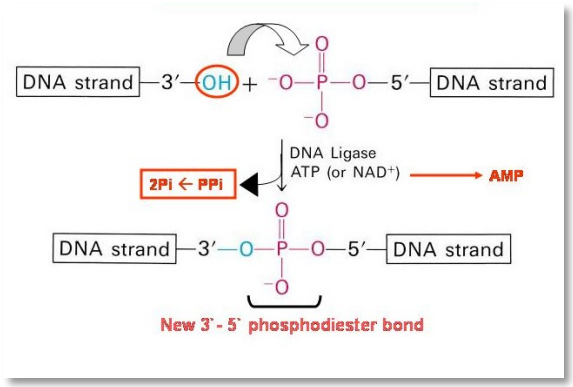


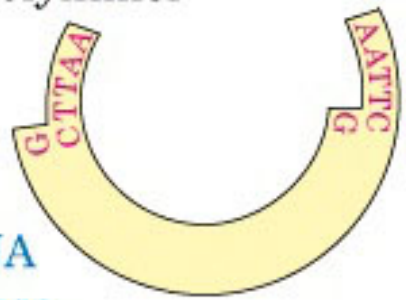
→ purificar

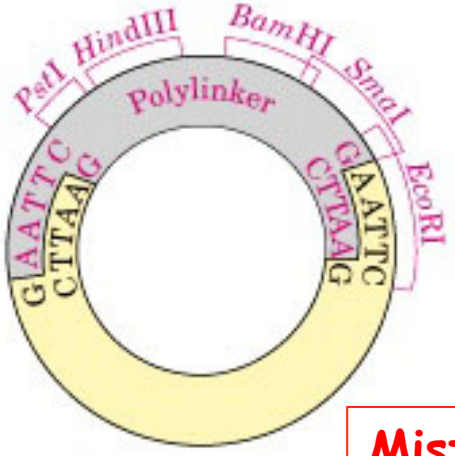
Construção → ligação



Synthetic polylinker





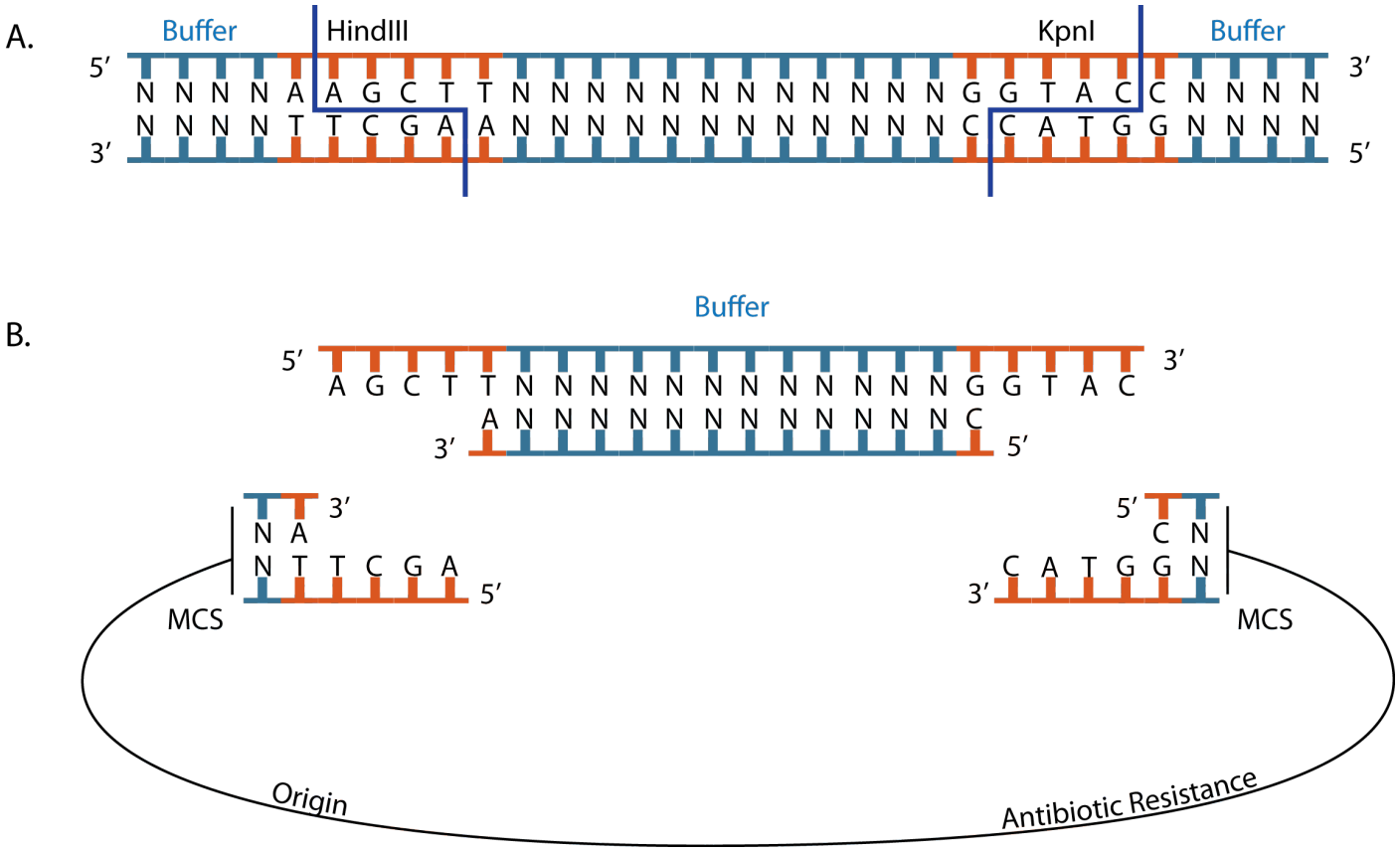


Plasmídeo
Inserto
Ligase
Tampão**
Água
Temperatura/tempo

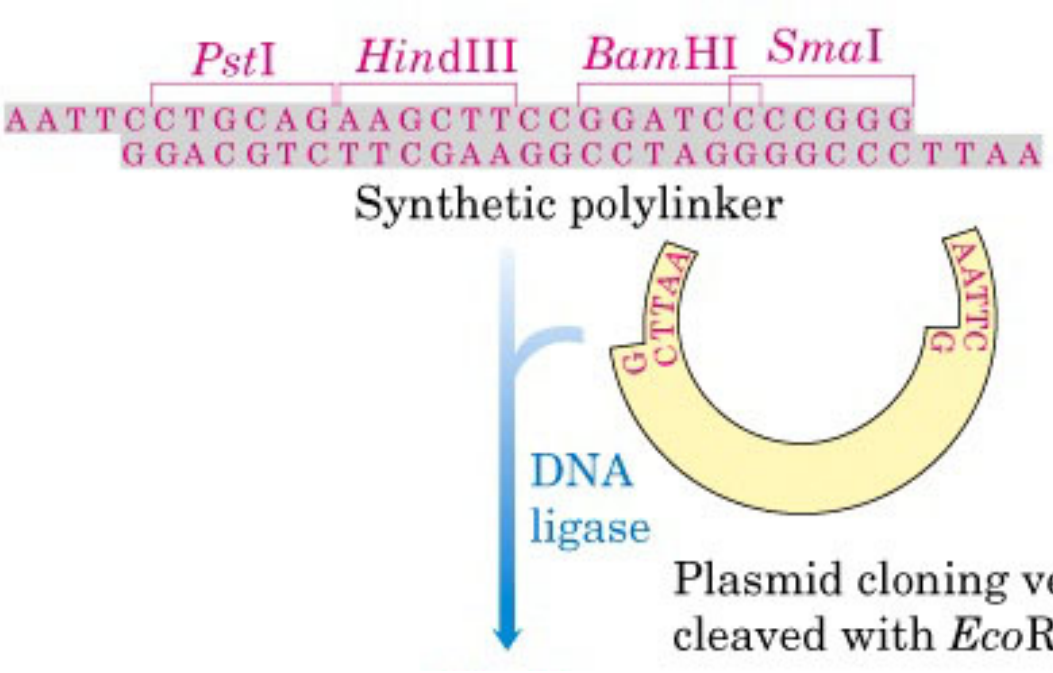
→ transformação *E. coli*

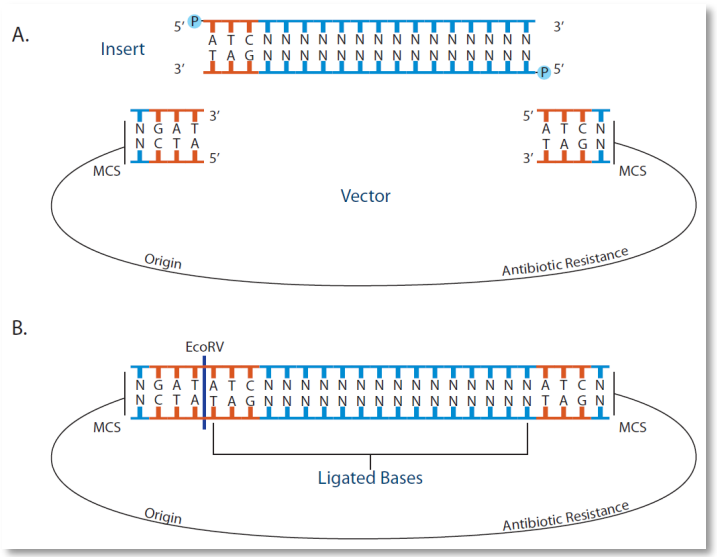
Mistura de ligação

Construção → enzimas de restrição → ligação

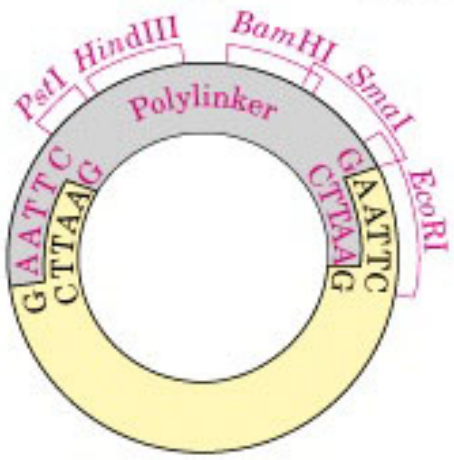


Construção → enzimas de restrição → ligação





**Plasmídeo → religar
**Inserto → invertido
**Klenow



NheI

5'...G↓CTAGC...3'
3'...CGATC↓G...5'

G CTAGC
CGATC G

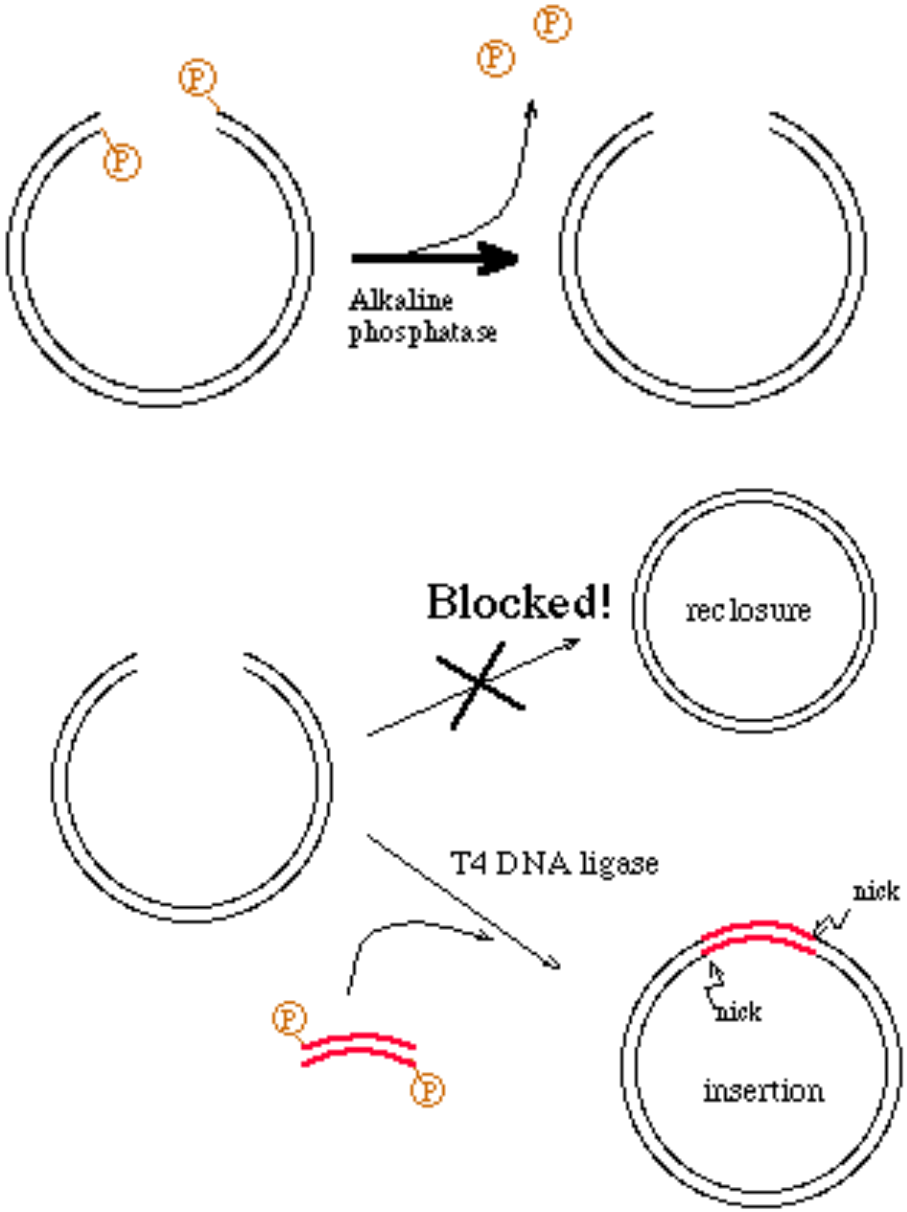
XbaI

5'...T↓CTAGA...3'
3'...AGATC↑T...5'

T CTAGA
AGATC T

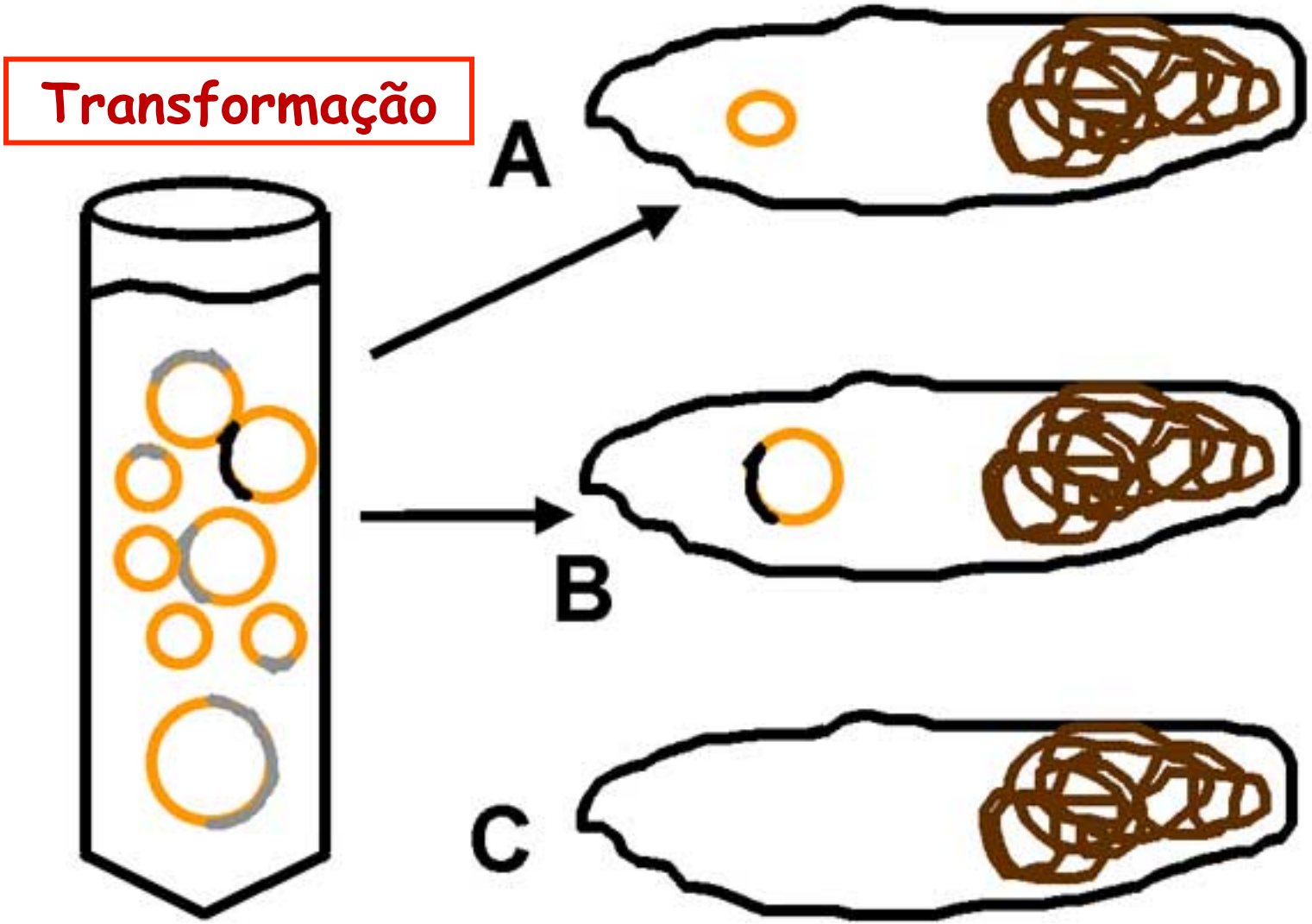
Construção → defosforilação

**Plasmídeo → religar

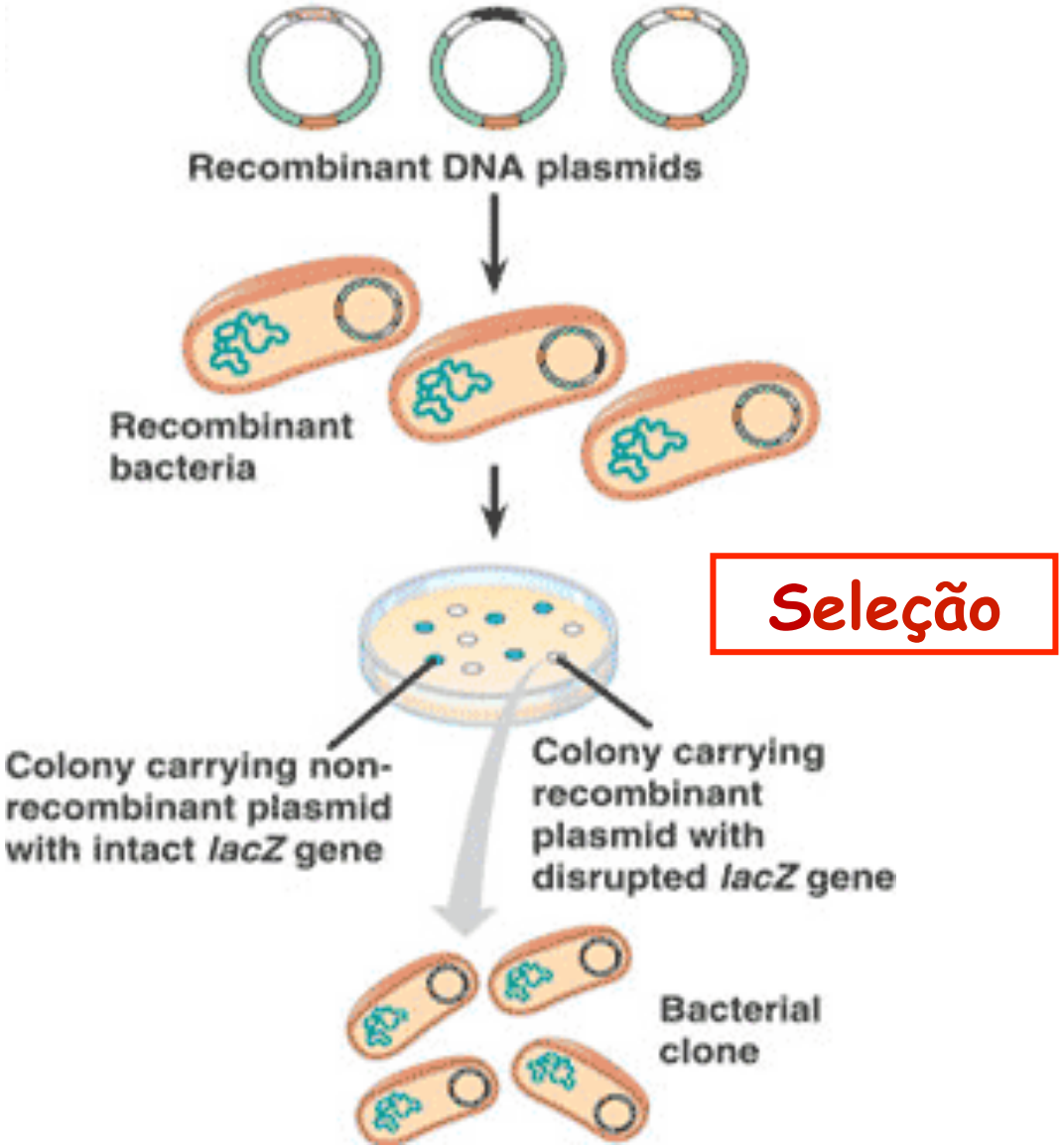


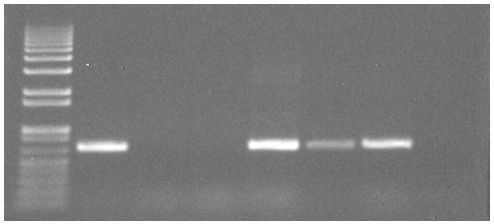
Plasmídeo
Fosfatase
Tampão
Água
Temperatura/tempo

Construção → Transformação

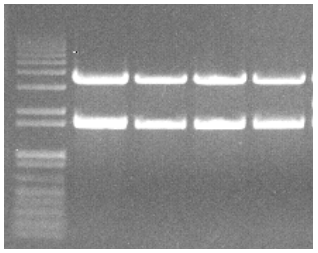


Construção → Seleção

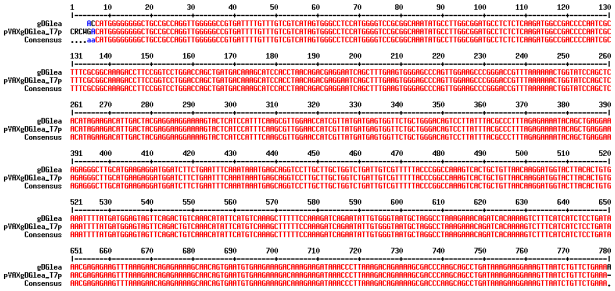




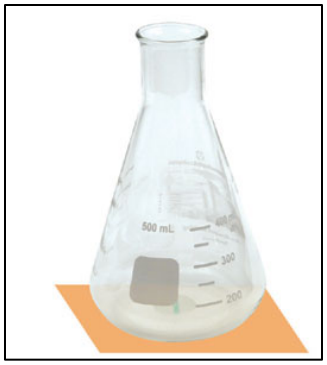
- ✓ PCR de colônia
  **primers - direção
- ✓ Clivagem
  **enzimas – direção

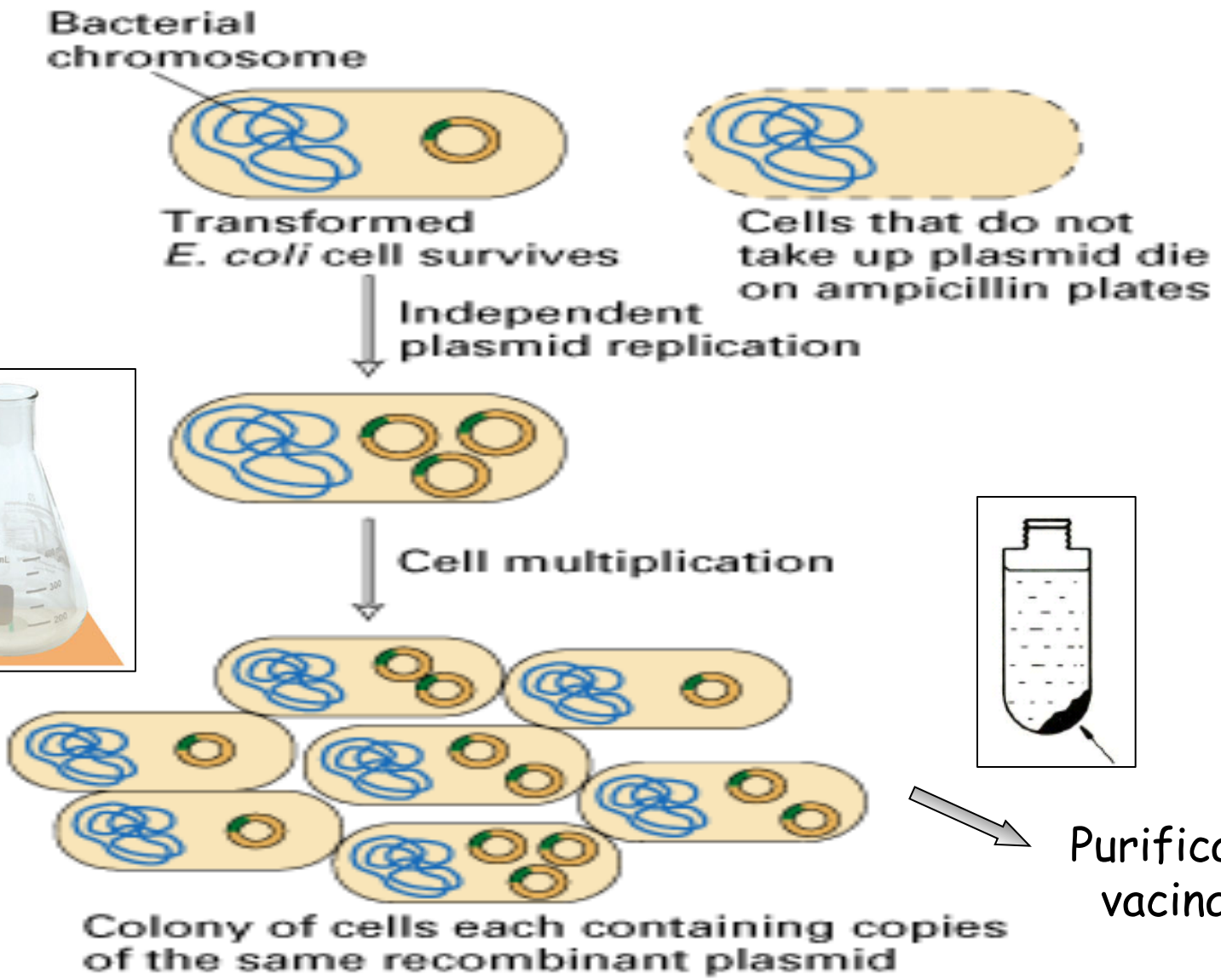


- ✓ Sequenciamento



Produção da vacina de DNA



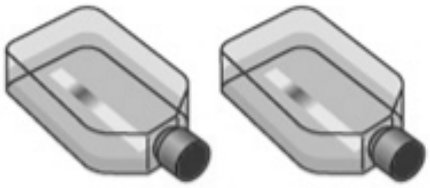


Purificação da vacina – Kit

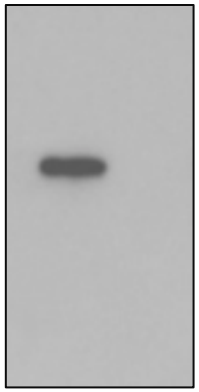
Caracterização da vacina de DNA

- ✓ Quantificar → espectrofotômetro
- ✓ LPS – LAL
- ✓ Clivagem/analise de restrição
- ✓ Transfecção → expressão proteína

Vacinas de DNA → Transfecção



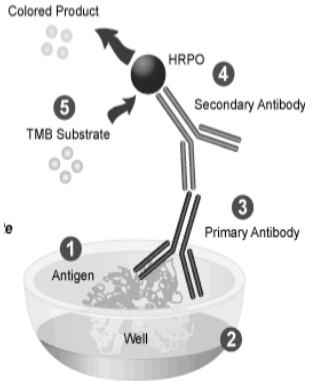
Células HEK → Detecção



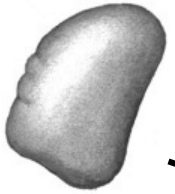
Imunogenicidade da vacina de DNA

Imunização

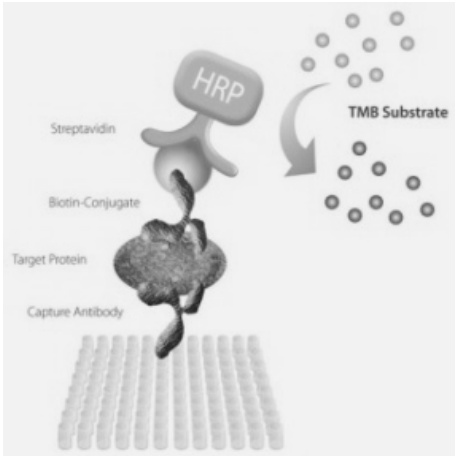
Elisa
Anticorpos



Células
do baço



Elisa
Citocinas



Proteção/Terapia ➔ Doença

Sintetizado
Amplificado

clivado
Gene

clivado
Plasmídeo

ligados

transformado

E. coli

PCR
Digestão
Sequenciamento

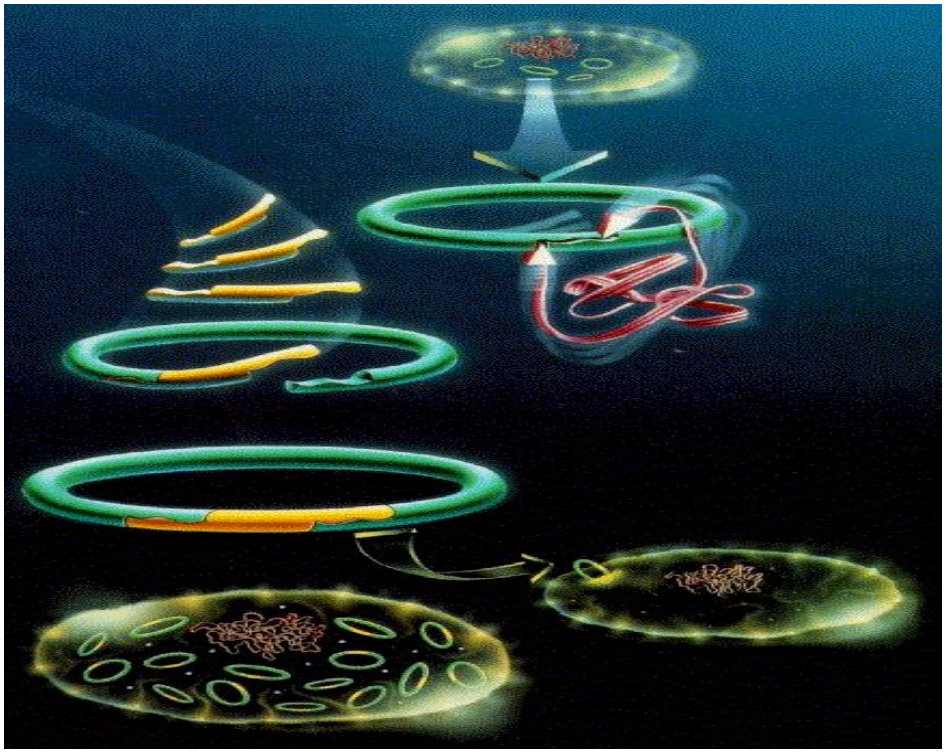
Plasmídeo Recombinante

DNA recombinante

Produzido E. coli

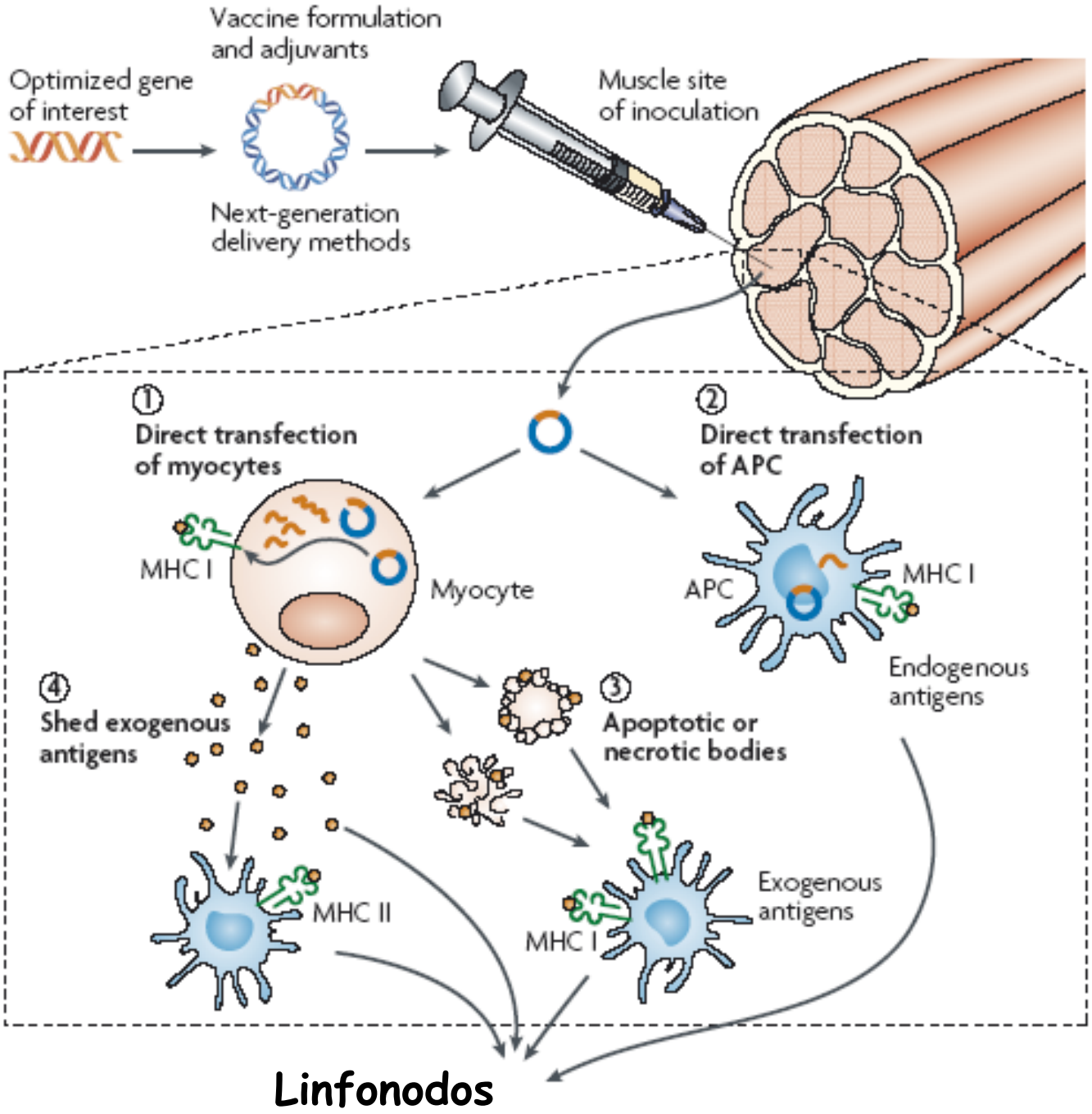
Caracterizado

- Quantificado – concentração e dosagem de LPS
- Clivado
- Expressão de proteína
- Imunogenicidade

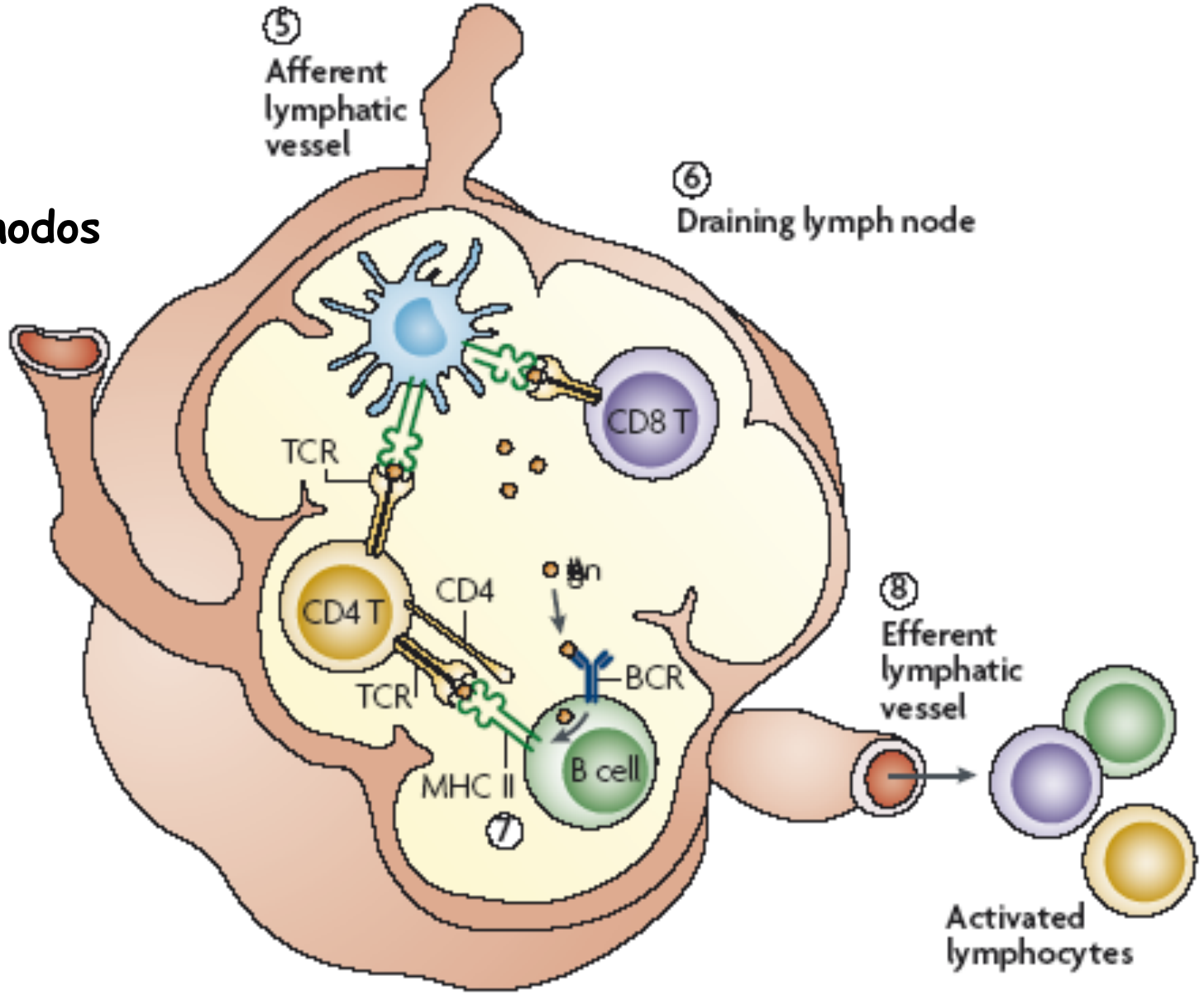


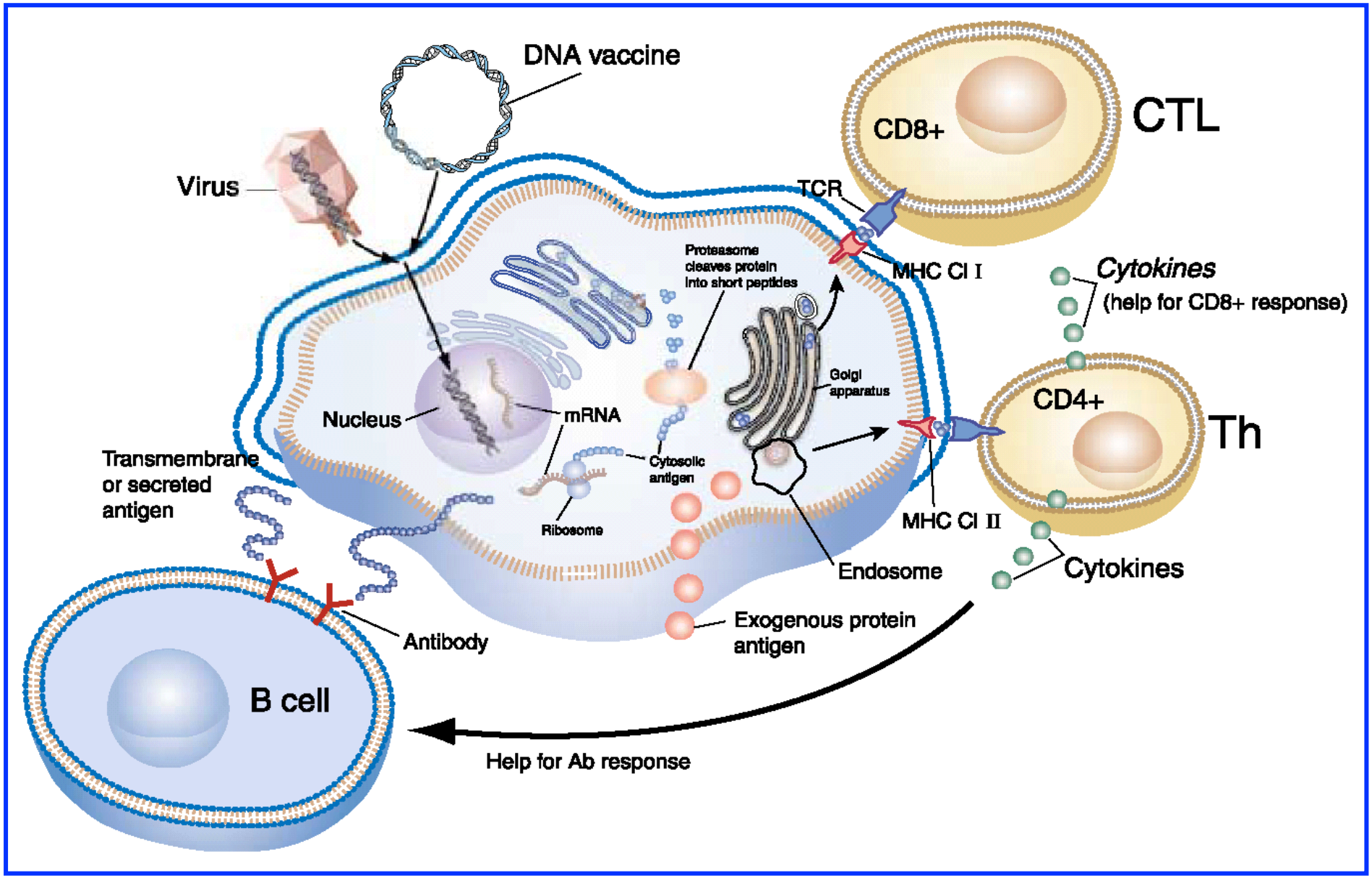
Como funcionam?

*Intramuscular
*Miócitos – energia
*Entrada na célula
  Endocitose/proteínas
*Entrada no núcleo
  Mitose
  Poros



Linfonodos

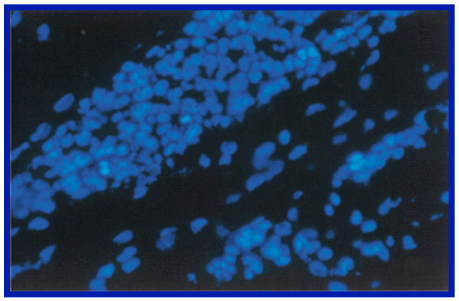

5
Afferent lymphatic vessel
6
Draining lymph node
CD8 T
TCR
CD4 T
CD4
TCR
BCR
B cell
MHC II
7
8
Efferent lymphatic vessel
Activated lymphocytes


DNA vaccine
Virus
CD8+
CTL
TCR
MHC Cl I
Cytokines
(help for CD8+ response)
Proteasome
cleaves protein
into short peptides
Golgi
apparatus
Nucleus
mRNA
Cytosolic
antigen
Ribosome
CD4+
Th
Transmembrane
or secreted
antigen
MHC Cl II
Endosome
Cytokines
Exogenous protein
antigen
Antibody
B cell
Help for Ab response

Imunização intramuscular

√ Expressão de proteína

Vacina de DNA-luciferase



» 10-30% células musculares são transfectadas
» DNA persiste por mais de 19 meses
» Expressão dose dependente

Science, 247: 1465-1468, 1990; Human Molecular Genetics, 1: 363-369, 1992.

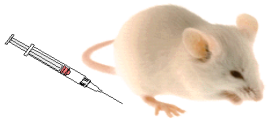
√ Expressão de proteína → resposta imune

Table 1. Protection of mice against a lethal A/PR/8/34 (H1N1) influenza virus challenge by inoculation of pCMV/H1 DNA in saline

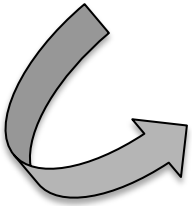
DNA	Route of inoculation*	Dose, μg	No. of survivors/ no. tested	% survival
pCMV/H1	i.v., i.p., i.m.	300	21/22	95
	i.m.	200	18/19	95
	i.v.	100	10/12	83
	i.n.	100	13/17	76
	i.d.	50	9/12	75
	s.c.	100	4/6	67
	i.p.	100	0/6	0
pCMV/control	Various	0–300	3/24	13

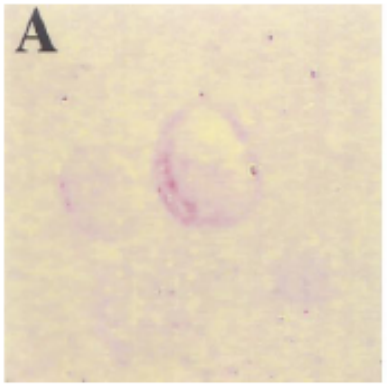
Science, 259: 1745-1749, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11478-11482, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 4156-4160, 1993.

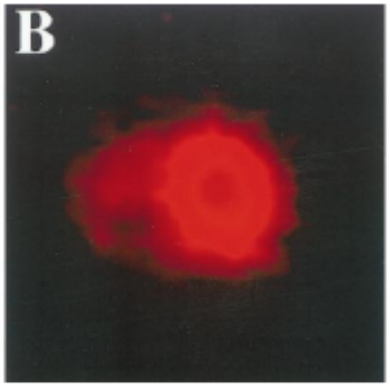
√ Expressão de proteína → células dendríticas e macrófagos

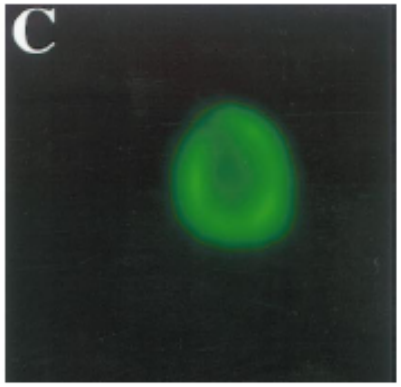


Vacina de DNA-GFP









J. Exp. Med., 186(9): 1481-1486, 1997; J. Immunol, 160(12): 5707-5718, 1998.

Vantagens

- Fácil construção e produção
- Produção de antígenos específicos
- Não reverte na forma virulenta; não requer métodos tóxicos
- Induz resposta celular e humoral
- Pode ser estocada e transportada - estável
- Ativa células T $CD8^+$ (citotóxicas)

Em comparação as outras tecnologias:

Microorganismo vivo atenuado

» Reversão para forma virulenta
» Não pode ser usados em indivíduos imunocomprometidos

Vacinas inativadas/subunidades

» Induz principalmente resposta humoral
» Necessidade de adjuvantes

Críticas

- Integração/mutação/instabilidade cromossômica/ativação ou supressão de genes
- Autoimunidade - DNA
- Resistência ao antibiótico
- Indução de tolerância
- Baixa imunogenicidade

Vacinas de DNA – triagens

Table 2 Findings of DNA vaccine clinical trials

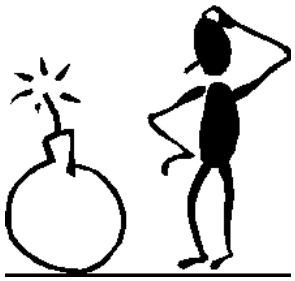
Well-tolerated safe
No integration of DNA
No autoimmunity
No tolerance
Antibody responses ↓ ≠Pré-clínicos
Th (helper T cells) responses ↓

**Prova de conceito – DNA – Resposta imunológica

Vacinas → Seguras → Parte dos microrganismos

↳ Baixa imunoestimulação

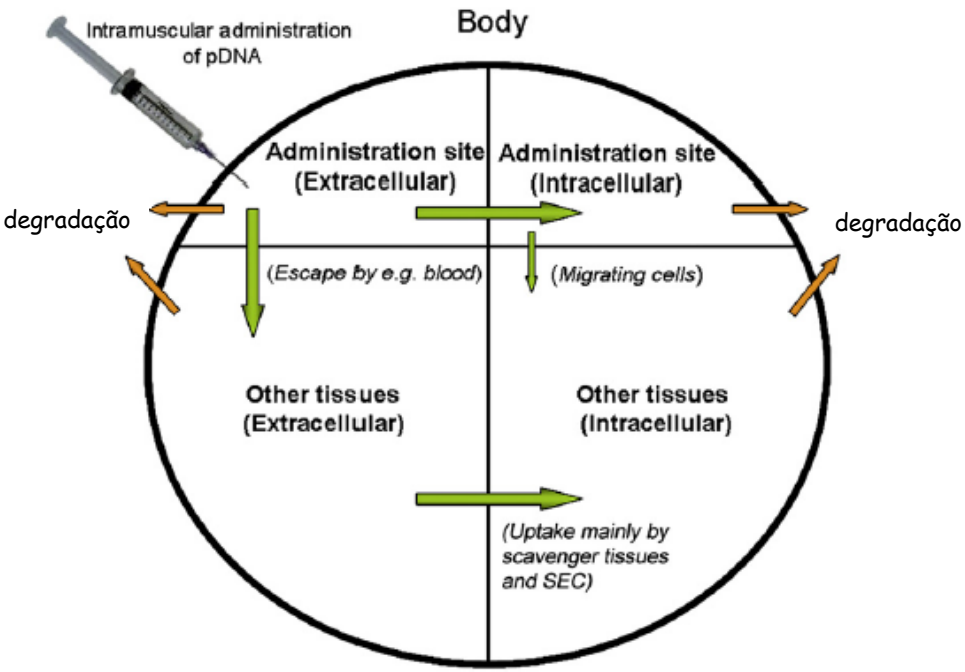
Baixa imunoestimulação



Ineficiente captura da vacina pelas células → entrega inadequada

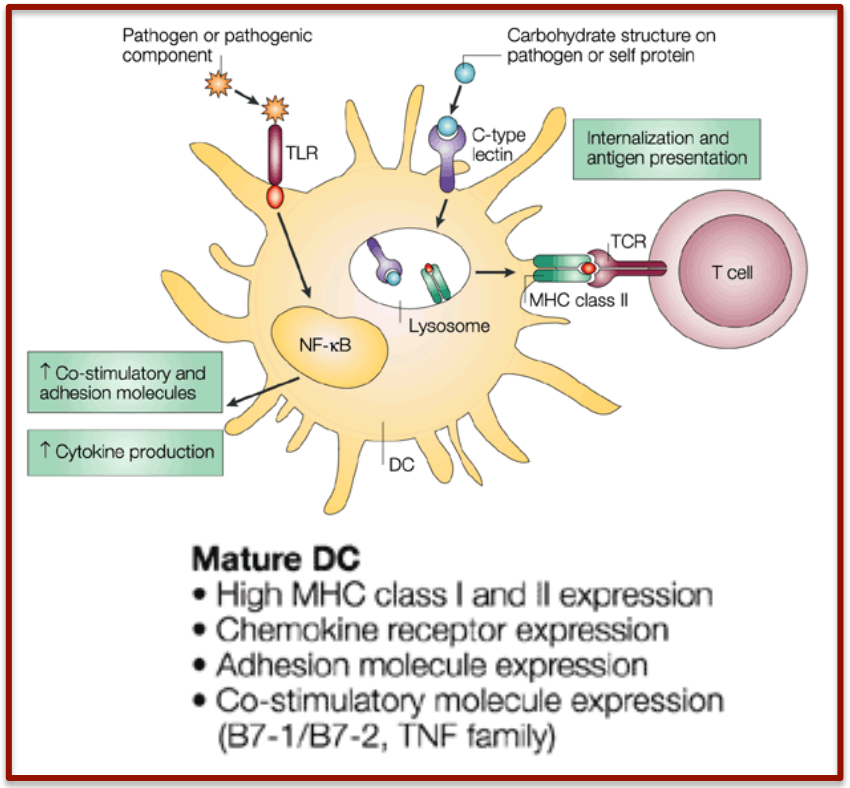
Fraca imunoestimulação

Transfecção



*Degradado – 0,1% transcrito
*Escala (50ug – 50uL / 19mg – 19mL)
*Resposta protetora difere entre os animais

Estimulação

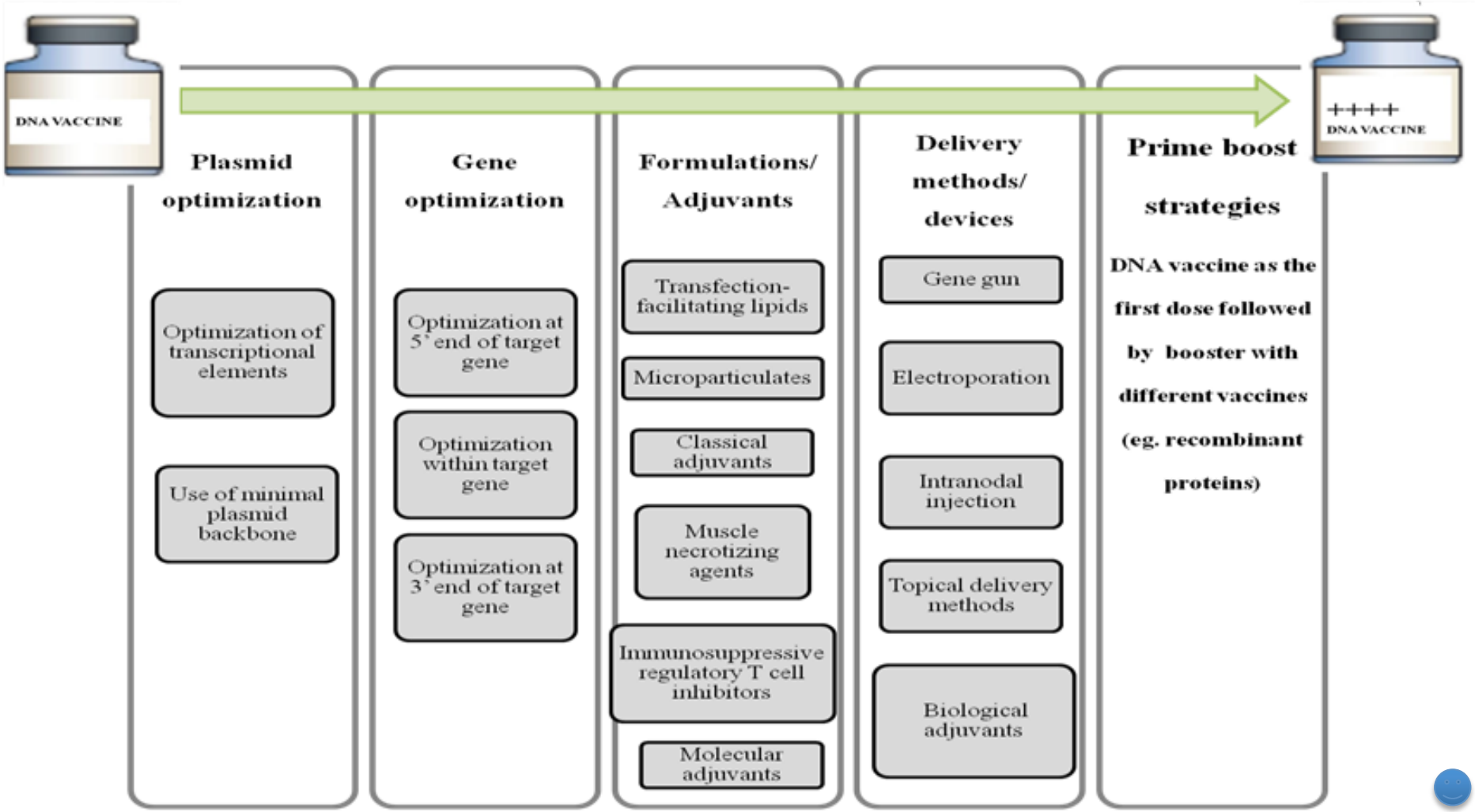


*Parte do microrganismo

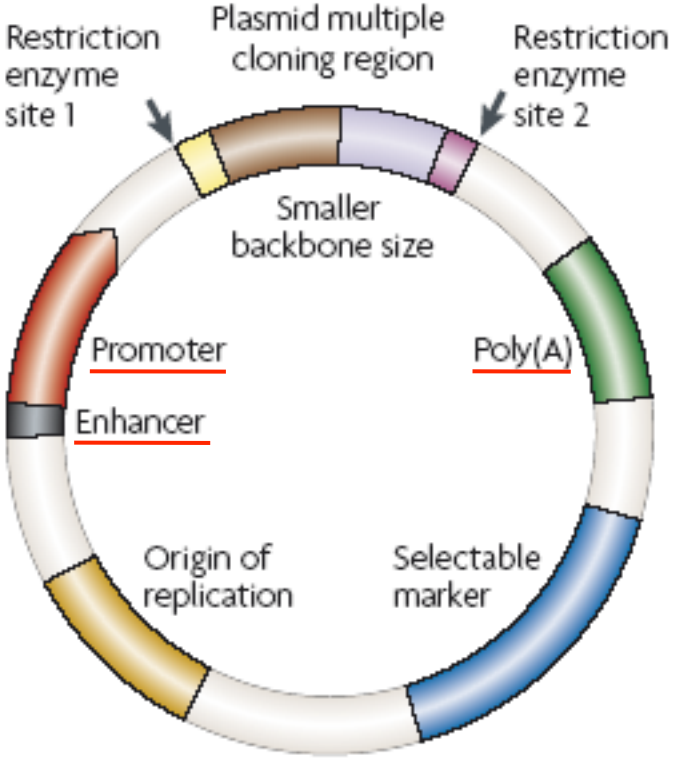
Transfecção

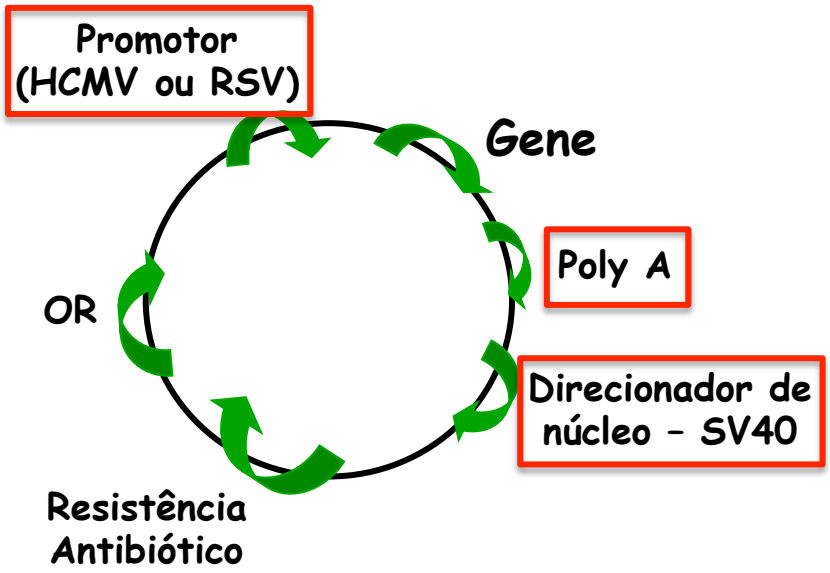
Estimulação

Estratégias de otimização – segunda geração de vacinas de DNA



① **Plasmid optimization**

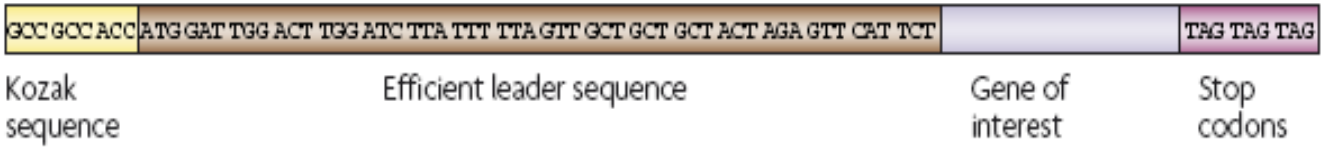




Select

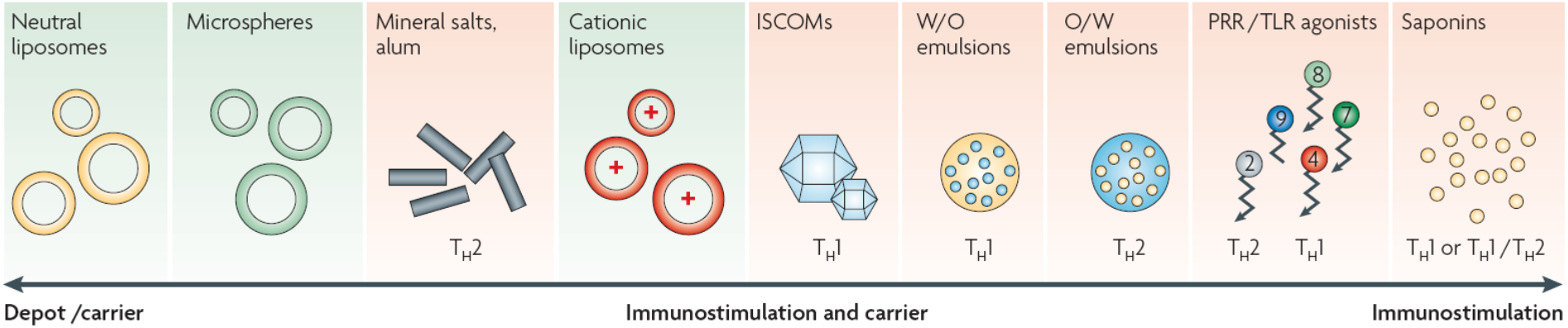
- High GC content → **Motivos CpG**
- Species-specific codon utilization
- Consensus immunogens
- Targeting sequences
- Nuclear localization sequences
- Ubiquitin
- Glycosylation changes
- Helper epitopes

② **Gene optimization**



Adjuvantes

*Melhoram a vacina por diferentes mecanismos

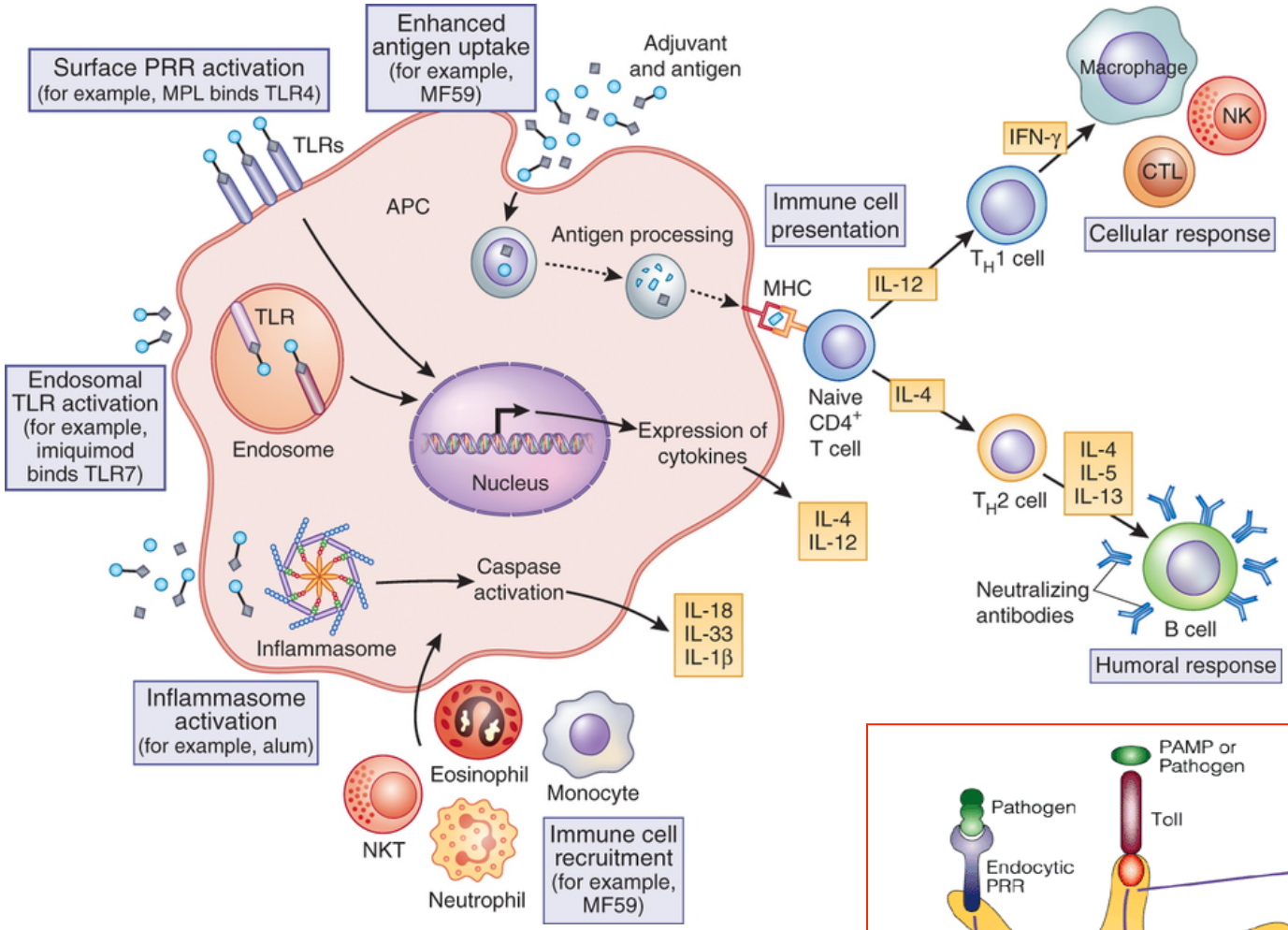


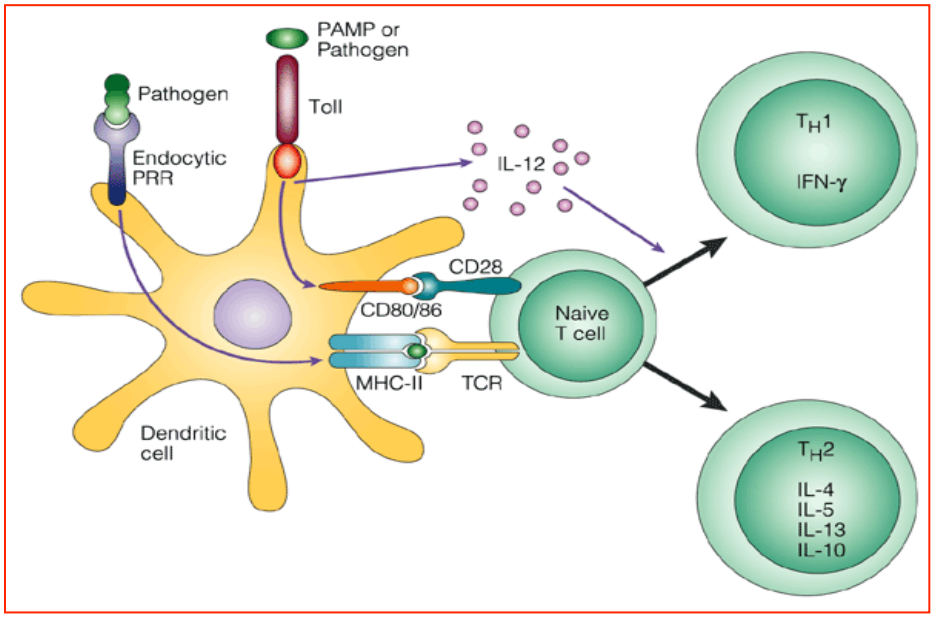
**Melhoram a resposta/direcionam → Protetora

- Depósito do antígeno
- Captura do antígeno
- Apresentação do antígeno
- Moléculas coestimuladoras
- Quimiotaxia
- Ativando resposta imunólogica ("inflamação")

Seleção do adjuvante

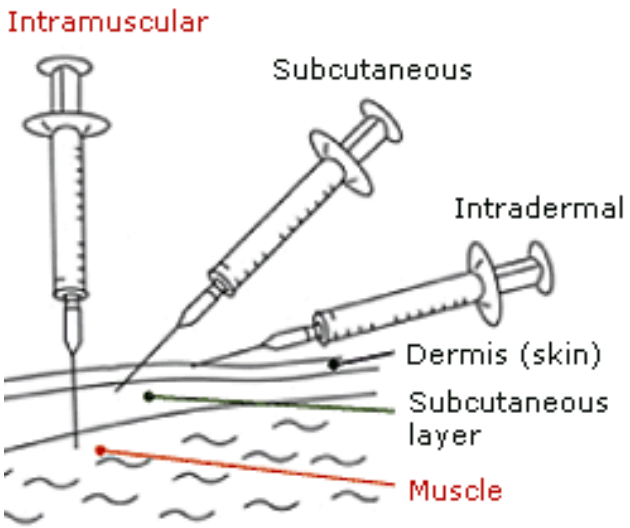
- Natureza física e química Ag
- Resposta desejada
- Idade da população
- Rota

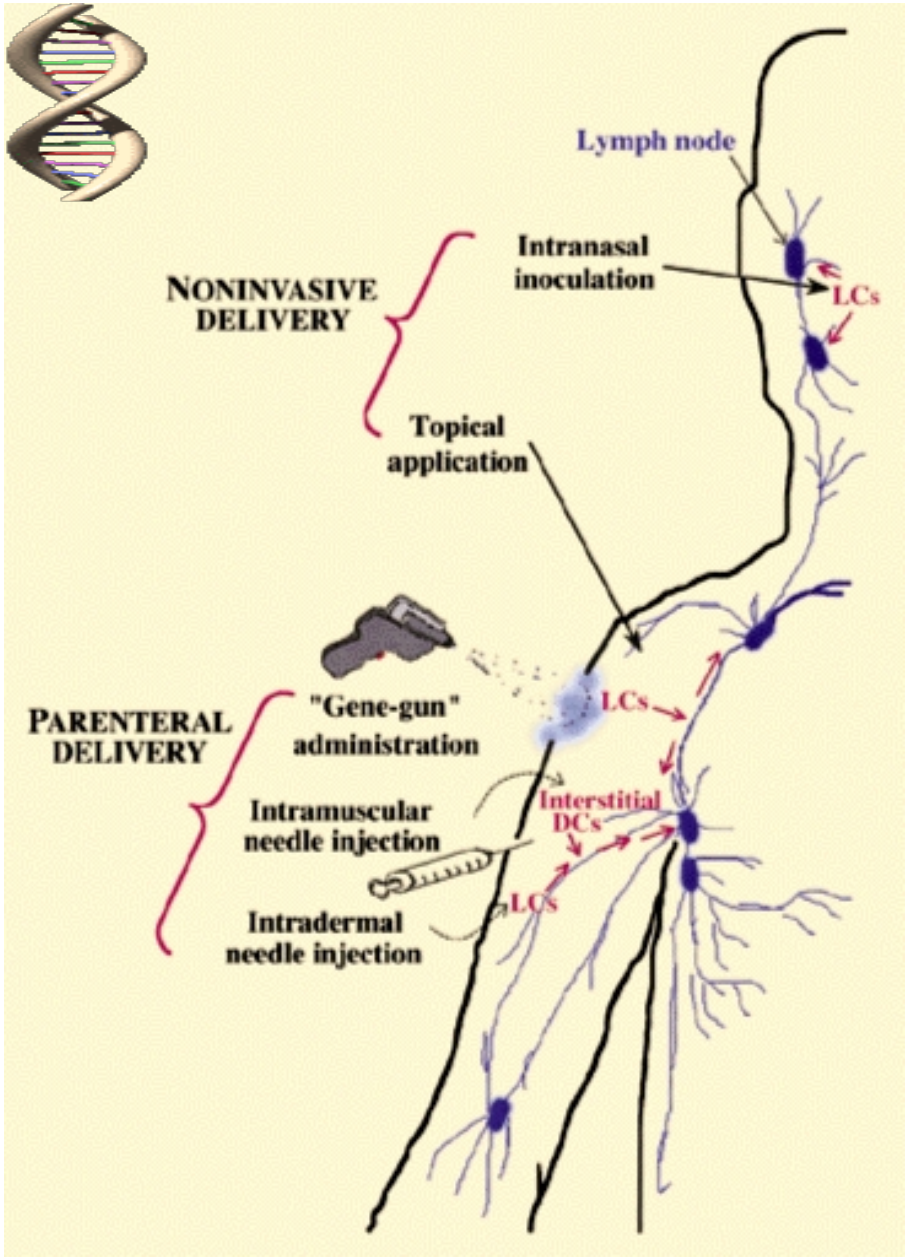




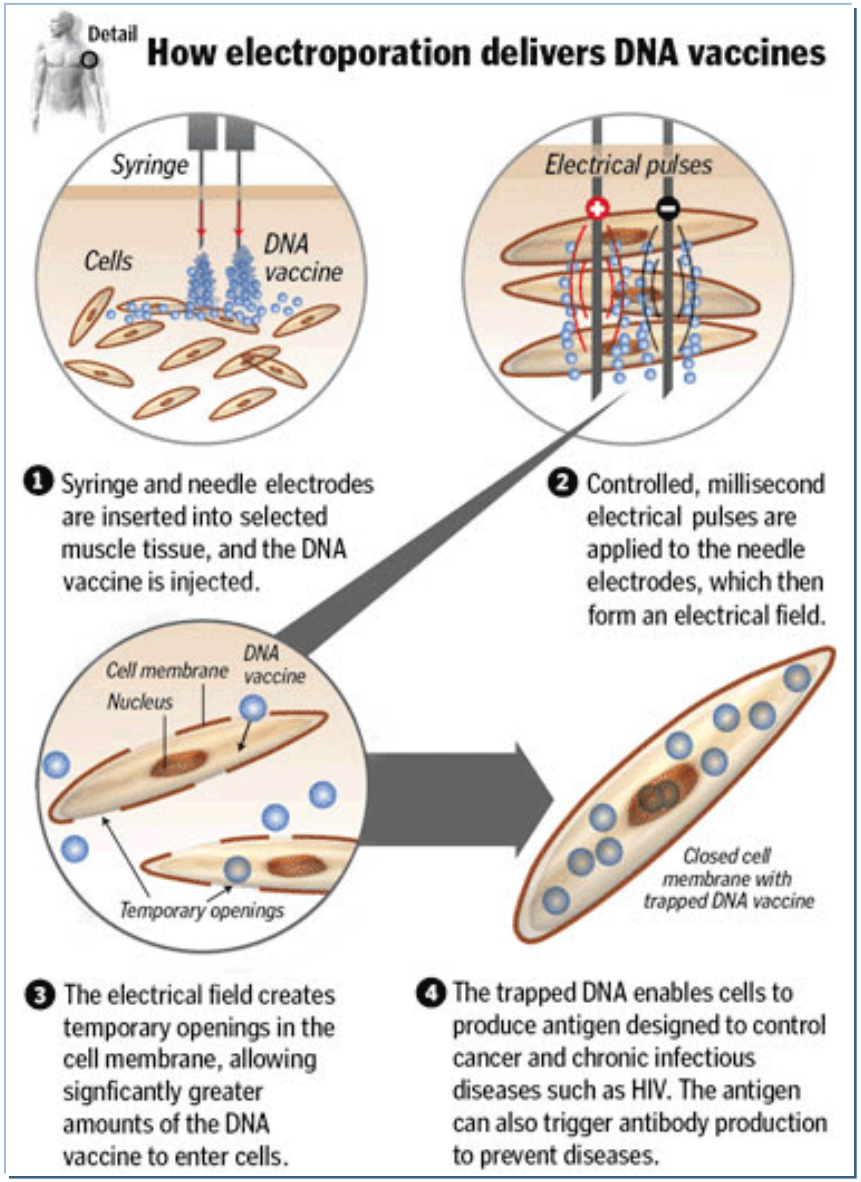
Mecanismos de ação

Rotas de Imunização – melhorar a transfecção

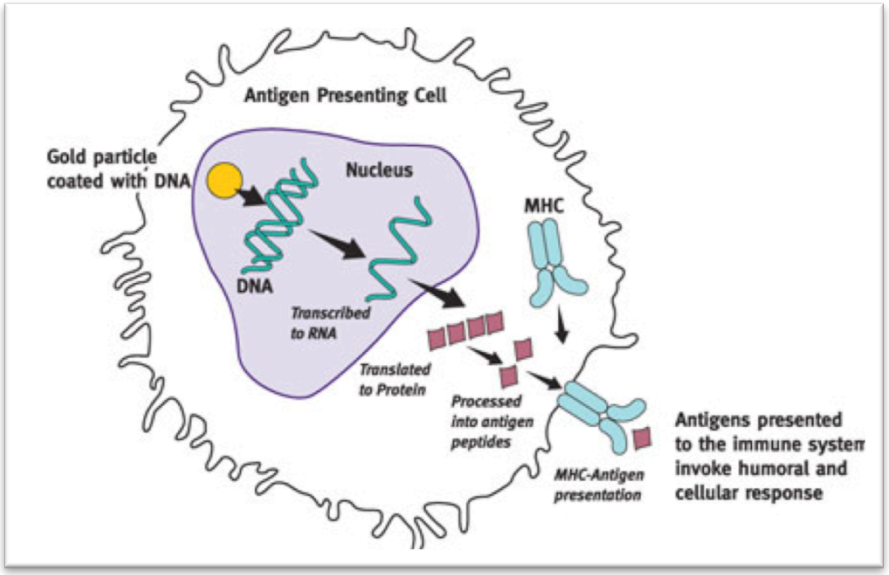




Eletroporação

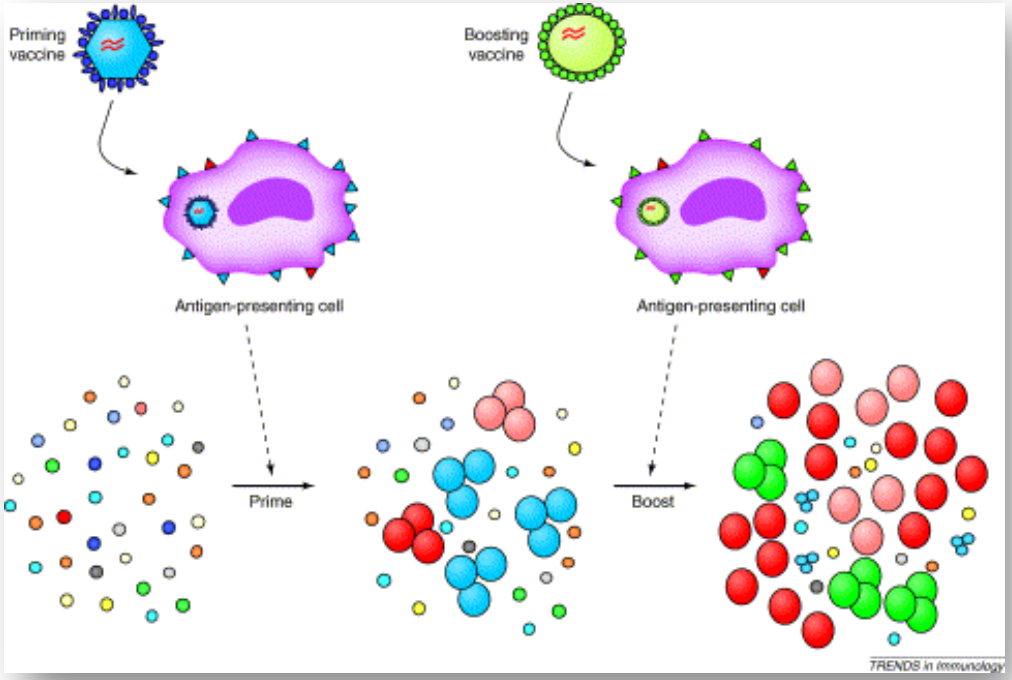


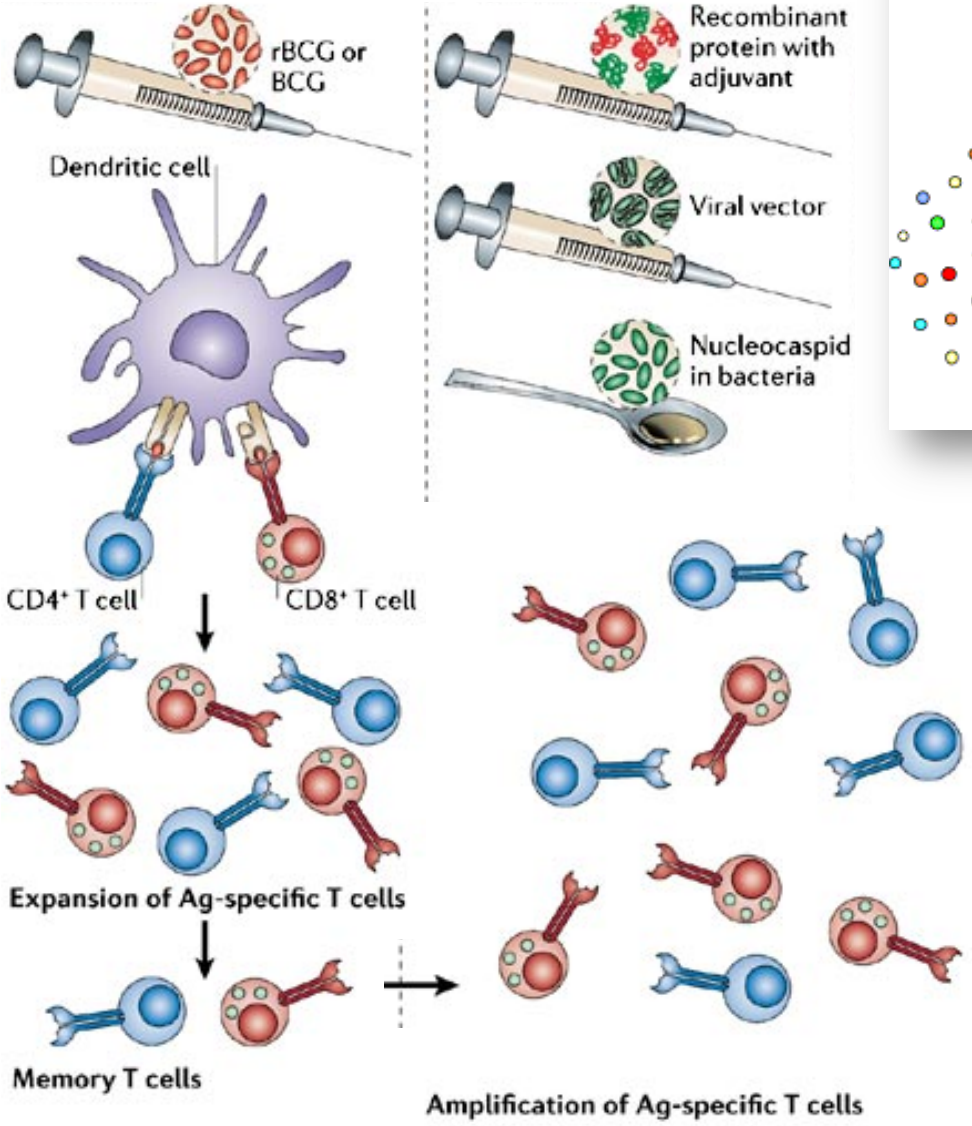
Arma gênica (Gene Gun)



**Inflamação

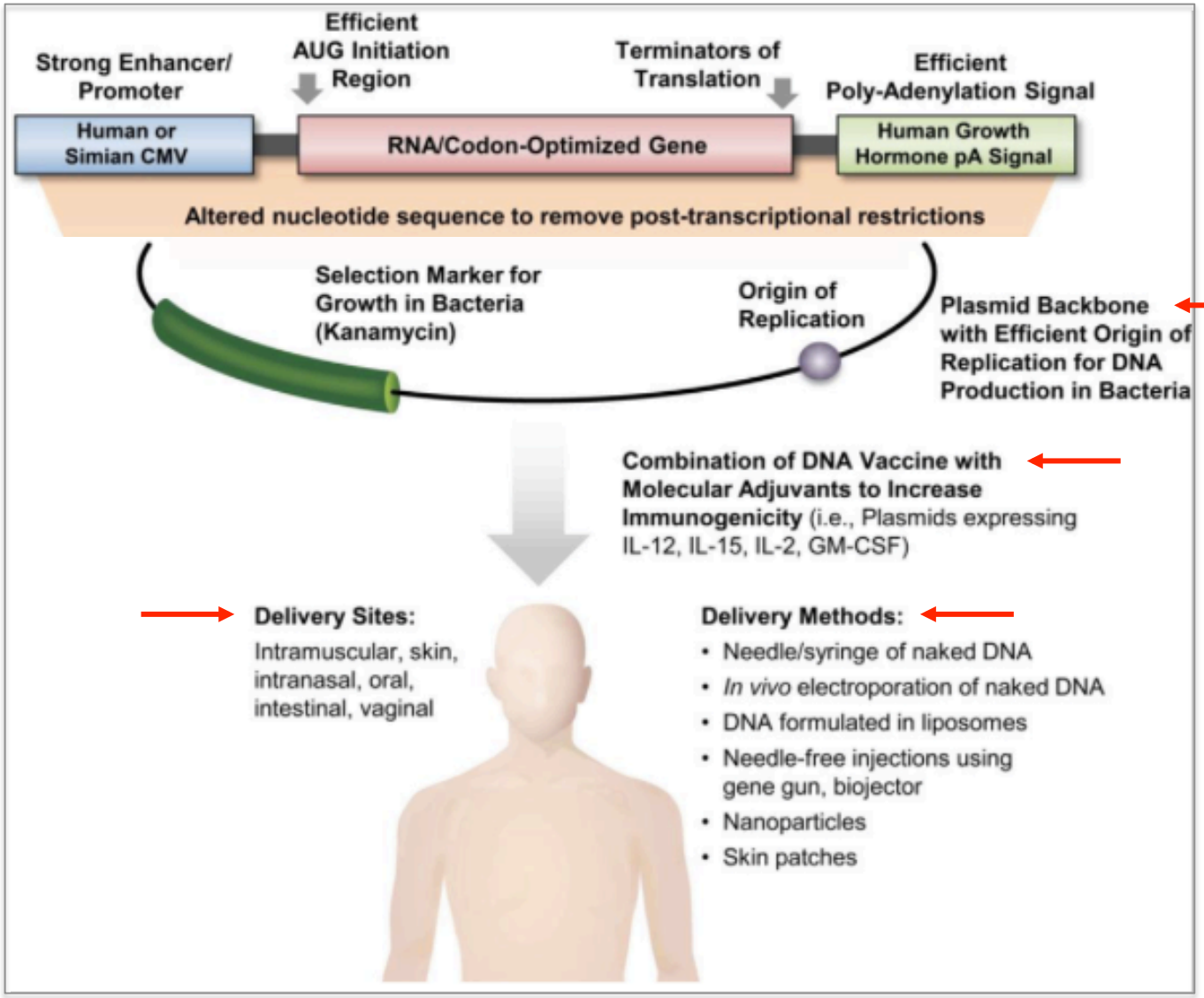
Prime-Boost


Priming vaccine
Boosting vaccine
Antigen-presenting cell
Antigen-presenting cell
Prime
Boost
TRENDS in Immunology

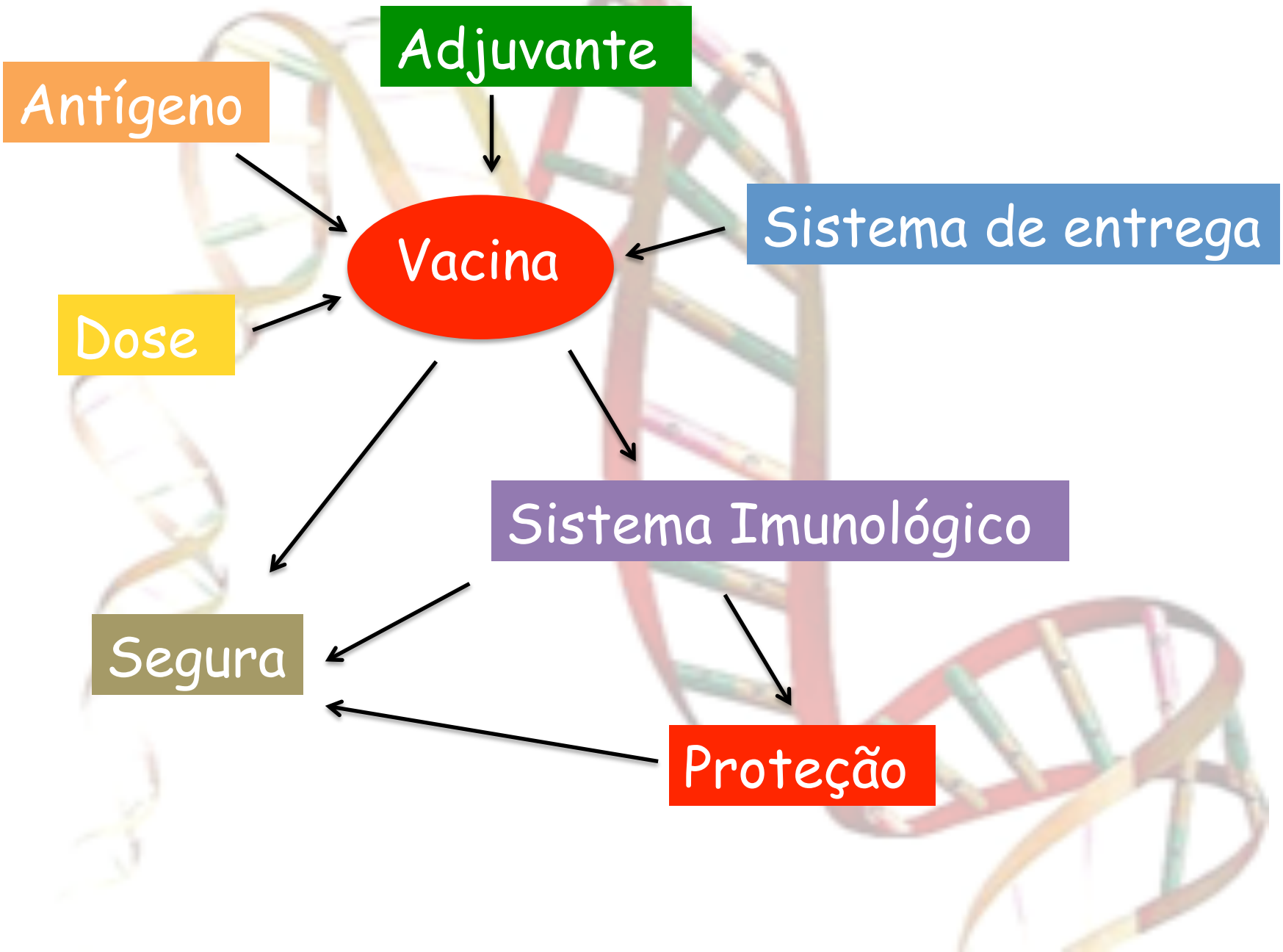

rBCG or BCG
Recombinant protein with adjuvant
Viral vector
Nucleocaspid in bacteria
Dendritic cell
CD4+ T cell
CD8+ T cell
Expansion of Ag-specific T cells
Memory T cells
Amplification of Ag-specific T cells

...em resumo - otimização

Gene



Plasmídeo


Adjuvante
Antígeno
Vacina
Sistema de entrega
Dose
Sistema Imunológico
Segura
Proteção

BIBLIOGRAFIA

Gregoriadis G, New Engl. J. Med., 295 (14): 765-70 / (13):704-10, 1976 (Lipossomas)

Eldridge JH et al., Mol. Immunol., 28 (3): 287-94, 1991 (Microesferas)

O'Hagan DT et al., Vaccine, 9 (10): 768-71, 1991 (Microesferas)

Liu, MA, Journal of Internal Medicine, 253 (4): 402-410, 2003 (Vacinas de DNA)

Klinman DM, Nature Reviews Immunology, 4, 249-259, 2004 (CpG)

Gamvrellis A et al., Immunology and Cell Biology, 82, 506-516, 2004 (Adjuvantes)

Torchilin VP, Nature Reviews Drug Discovery, 4, 145-160, 2005 (Lipossomas)

Ulmer JB et al., Nat.Biotecnol., 24, 1377-1383, 2006 (Vacinas)

Guy B, Nat.Rev.Microbiol., 5 (7): 505-517, 2007 (Adjuvantes)

Belakova J et al., Arch. Immunol. Ther Exp., 55: 387-398, 2007 (Vacinas de DNA)

Kutzler MA and Weiner DB, Nature Genetics, 9: 776-788, 2008 (Vacinas de DNA)

Tonheim TC et al., Fish & Shellfish Immunology, 25: 1-18, 2008 (Vacina de DNA)

Bachmann, MF, Nature Reviews Immunology, 10, 787-796, 2010 (Vacinas – Sistemas de entrega)

Ferraro B et al., Vaccines, 51: 296-301, 2011 (Vacinas de DNA)

Reed ST, Nature Medicine, 19 (12): 1597-1608, 2013 (Adjuvantes)

Tregoning JS and Kinnear E, Microbiol Spectrum, 2(6): 1 – 16, 2014 (Vacinas de DNA)

Egli A et al., The European Journal of Medical Science, 144: 1-16, 2014 (Adjuvantes)

Obrigada pela atenção!

wendymartinrios@gmail.com
wendy@usp.br