UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
85 ANOS 1934 · 2019

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP
70 ANOS 2022

FACULDADE de MEDICINA de RIBEIRÃO PRETO
SCIENTIA TERMINUM MOVERE

Vacina Genética para prevenção de SARS-CoV-2

Aparecida Maria Fontes

aparecidamfontes@usp.br

Ribeirão Preto – Abril/ 2022

50 anos
Departamento de Genética
USP Ribeirão Preto-FMRP

Roteiro:

Conceitos Gerais

1. Vacinas e objetivos
2. Vacina de mRNA
3. Sistemas de entrega da molécula mRNA

Moderna

4. Vacina de mRNA que codifica proteína spike

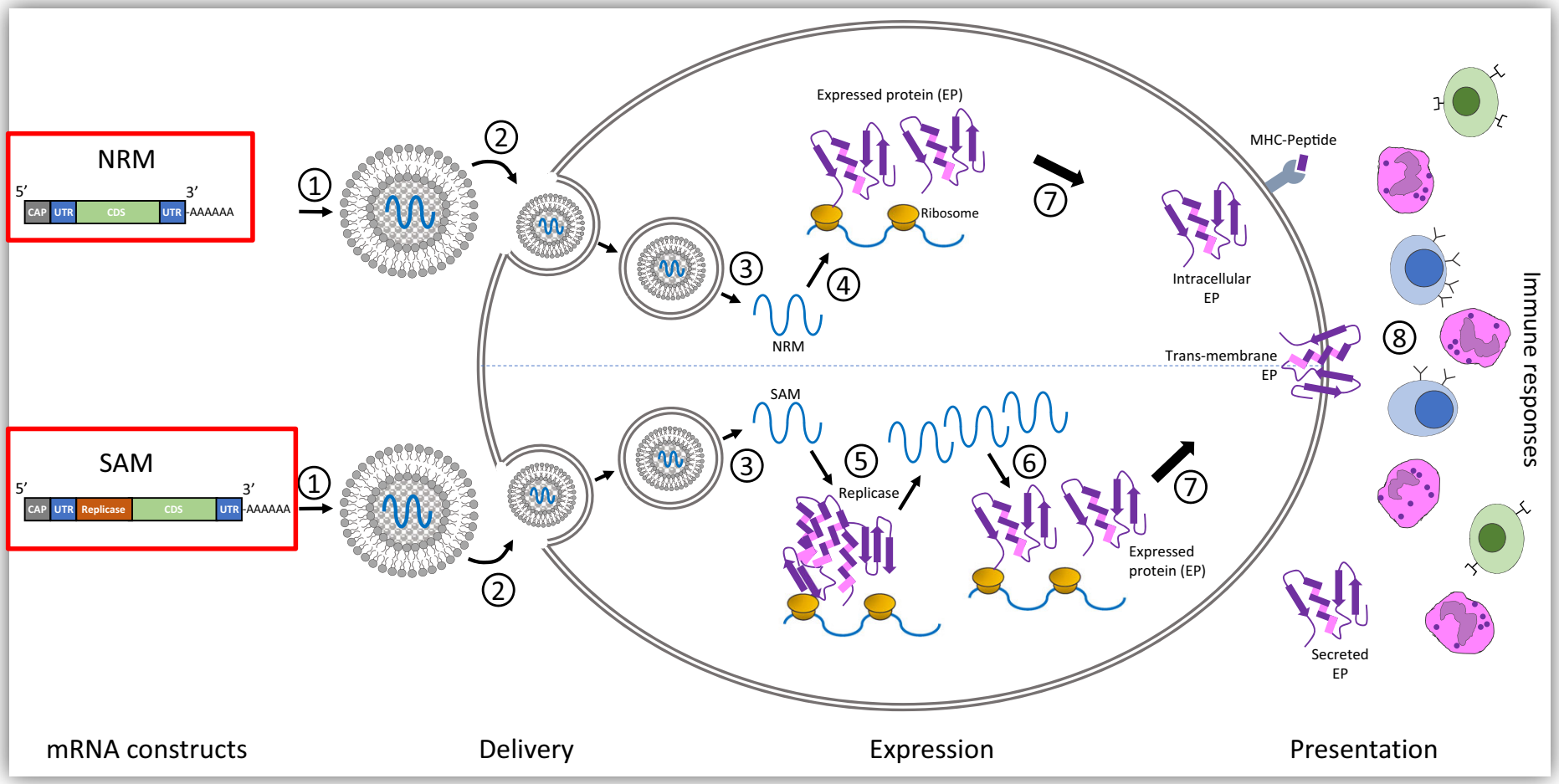
Pfizer

5. Vacina de mRNA que codifica proteína spike

6. Perspectivas: vacinas mRNA

1. Vaccinação e Objetivos do desenvolvimento de vacinas

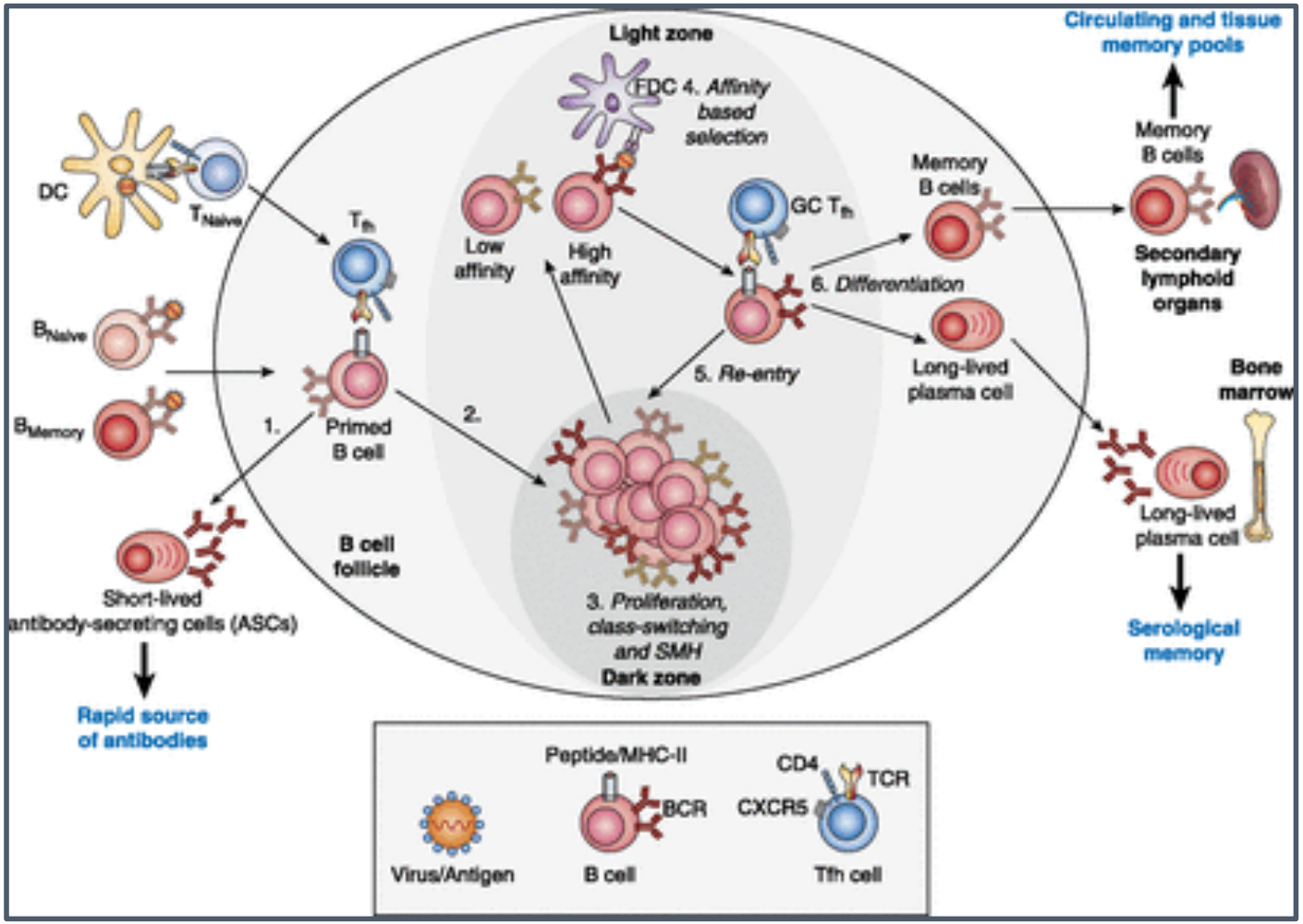
2 Tipos de vacina de mRNA:



Jackson *et al* 2020 npj vacines 5:11

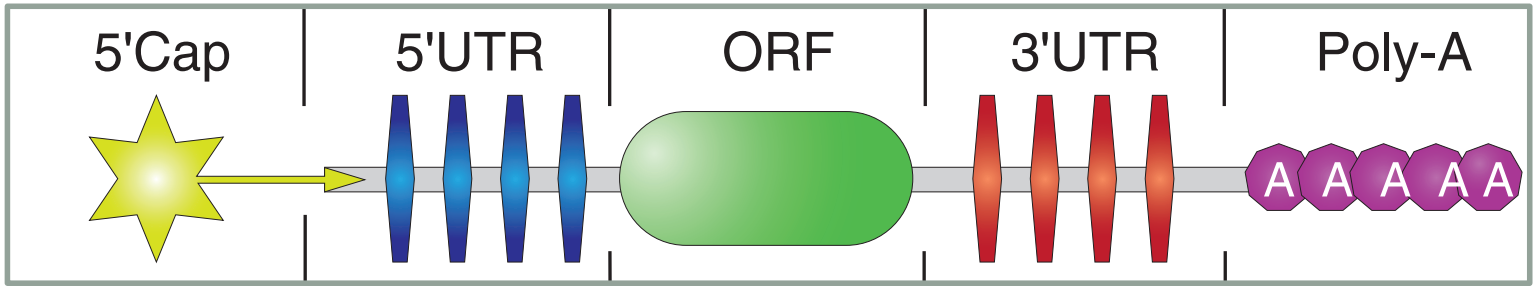
Como induzir a imunidade duradoura?

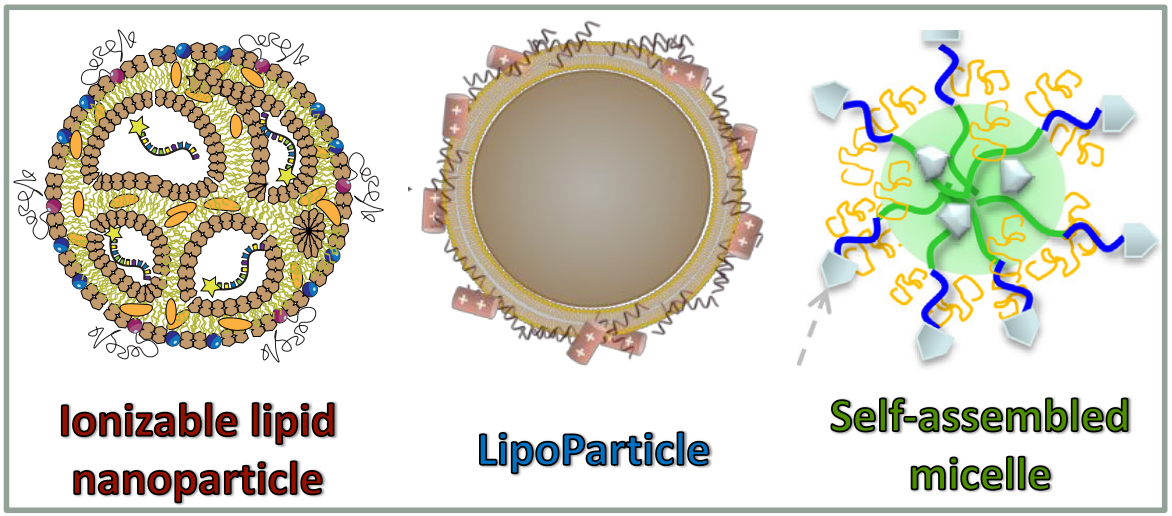
Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, et al. 2021. Antibody persistence through 6 months after the second dose of mRNA-1273 vaccine for Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 384:2259–61



2. Vacina de mRNA

Componentes principais da vacina de mRNA:





Linares-Fernández *et al* 2020 *Trends in Mol. Medicine* 26:311

Ayad *et al* 2021 *Pharmaceutics* 13

Trimaille *et al* 2019 *Eur. J. Pharm. Biopharm* 142:232i

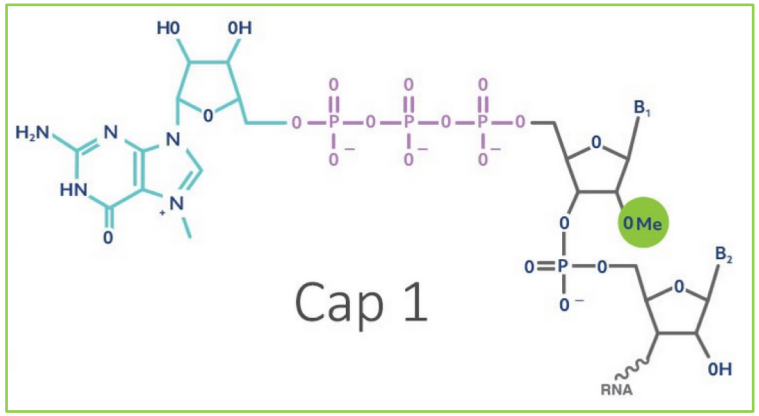
2. Vacina de mRNA

Molécula de mRNA: estratégias para aumentar a eficiência da tradução

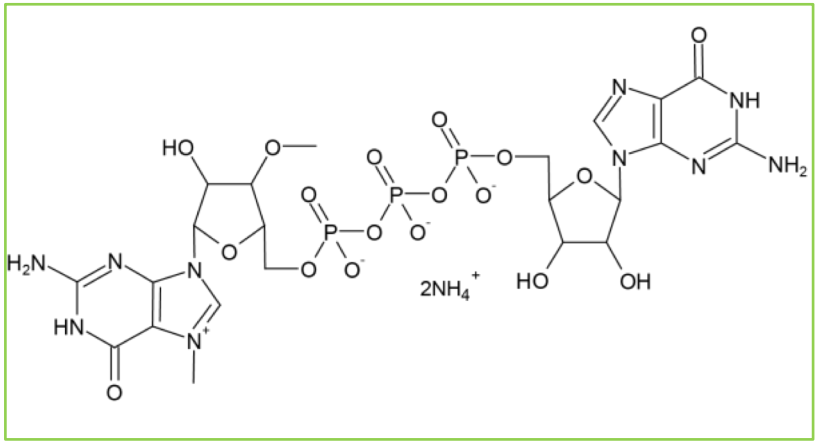
- 5’ Cap
- 5’ UTR
- CDS otimizada
- 3’ UTR
- Imunogenicidade
- Nucleosídeos modificados

2. Vacina de mRNA

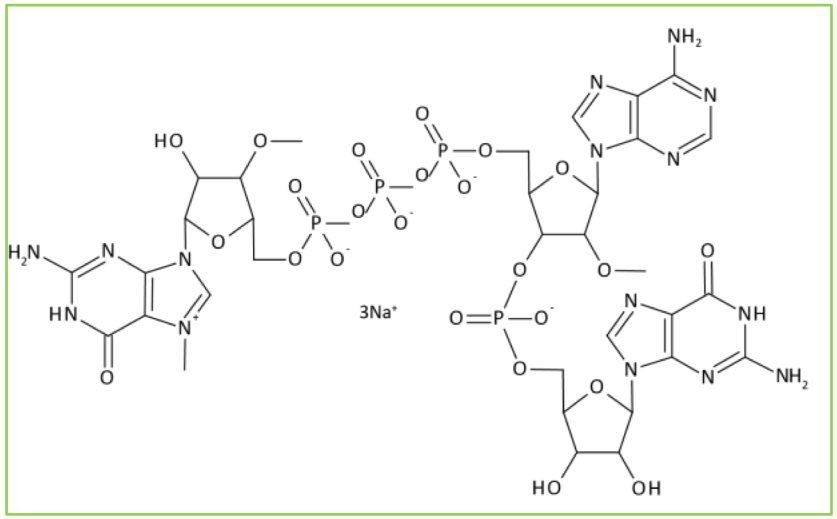
5'Cap:



1ª geração



2ª geração (ARCA)



3ª geração (CleanCap)

mRNAs *uncapped* ou *capped* incorretamente podem ser reconhecidos pelos PRRs (ex. RIG-1 e IFIT), induzir interferon tipo 1 e bloquear a tradução do mRNA.

Miao *et al* 2021 Mol. Cancer 20:41

2. Vacina de mRNA

Imunogenicidade:

O sistema imunológico pode reconhecer *motifs* denominados PAMPs (padrões moleculares associados com patógenos) pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs).

Esses receptores são expressos em elevada quantidade nas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas) presents no endossomo ou citoplasma.

Receptores presentes no endossoma: TLR-7 e TLR-8 que ativam MyD88, interferon tipo-1 e a secreção de citocinas inflamatórias.

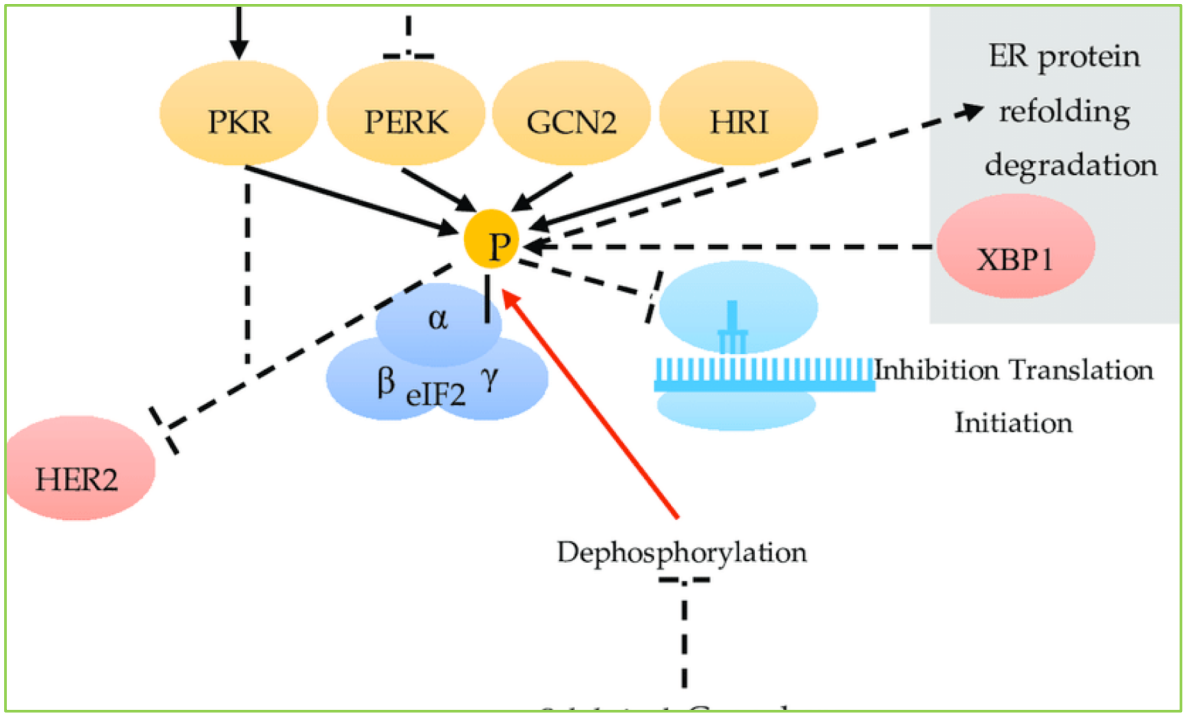
Receptores presentes no citoplasma: RIG-I-like (MDA-5) e OAS (*oligoadenylate synthetase*) e enzima *kinase* dependente de RNA (PKR).

Miao *et al* 2021 Mol. Cancer 20:41

2. Vacina de mRNA

Imunogenicidade:

Se PKR for ativada, o fator eucariótico de iniciação da tradução (eIF-2) pode ser fosforilado e bloquear a tradução do mRNA.

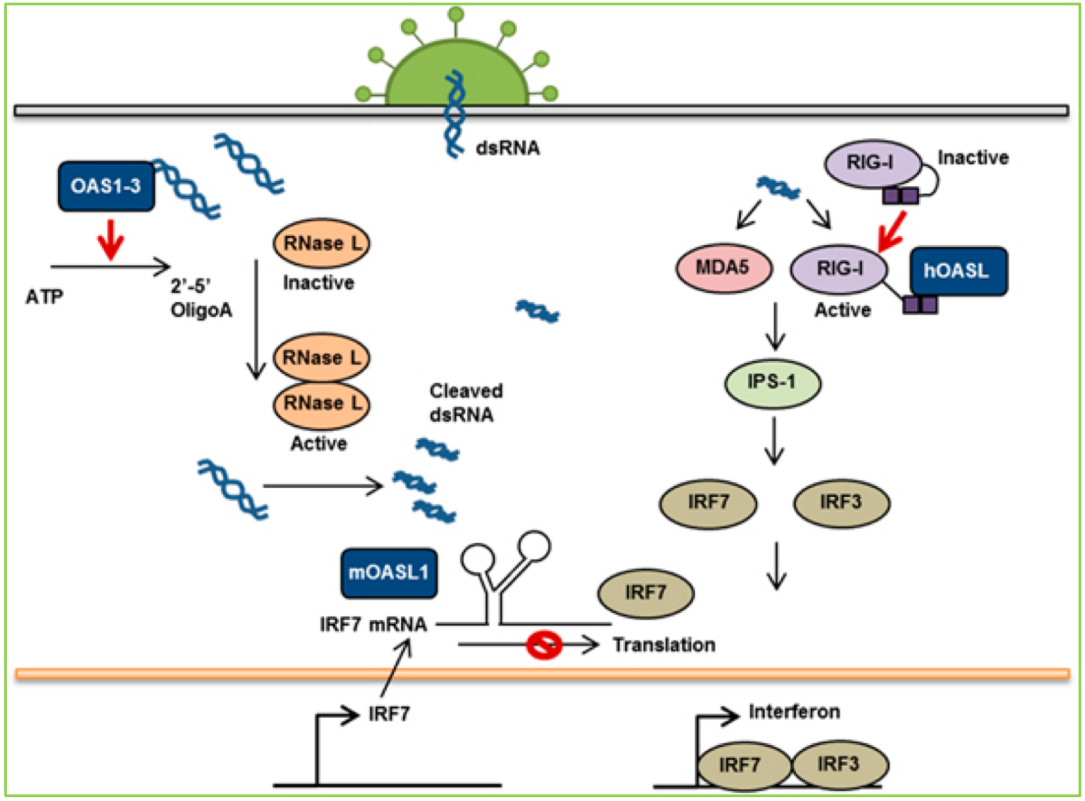


Miao *et al* 2021 Mol. Cancer 20:41

2. Vacina de mRNA

Imunogenicidade:

dsRNA pode atrair a ligação de OAS que pode ativar a enzima RNase L e levar a degradação do mRNA



Miao *et al* 2021 Mol. Cancer 20:41

2. Vacina de mRNA

5'UTR:

Otimização da região 5'UTR para aumentar a eficiência da tradução

Evitar a presença de AUG ou codon de iniciação não canônico (CUG) na região 5'UTR que podem diminuir a tradução da região ORF.

Evitar a presença de estruturas altamente estáveis na região 5'UTR que podem prevenir o recrutamento do ribossomo.

5'UTR de α-globina e β-globina de *Xenopus laevis* ou *Homo sapiens* são muito utilizados.

Miao *et al* 2021 Mol. Cancer 20:41

2. Vacina de mRNA

Otimização de códons:

Otimizar o conteúdo de C e G na região "*open reading frame*" (ORF) para aumentar a taxa de síntese durante a tradução do mRNA

Adicionar os codons presentes em maiores quantidades encontrados naturalmente na célula-alvo.

Adicionar codons com abundância de tRNA.

Evitar estruturas altamente estáveis na região ORF.

Miao *et al* 2021 Mol. Cancer 20:41

2. Vacina de mRNA

Cauda poli-A:

Em geral, mRNA de células dendríticas derivadas de monócitos apresentam entre 120 e 150 nt, enquanto mRNAs de linfócitos T apresentam 300 nt em comprimento.

A proteína ligante de cauda poliA (PABP) pode interagir com a região 5' *cap* e promover uma estrutura que permitirá uma maior eficiência da tradução.

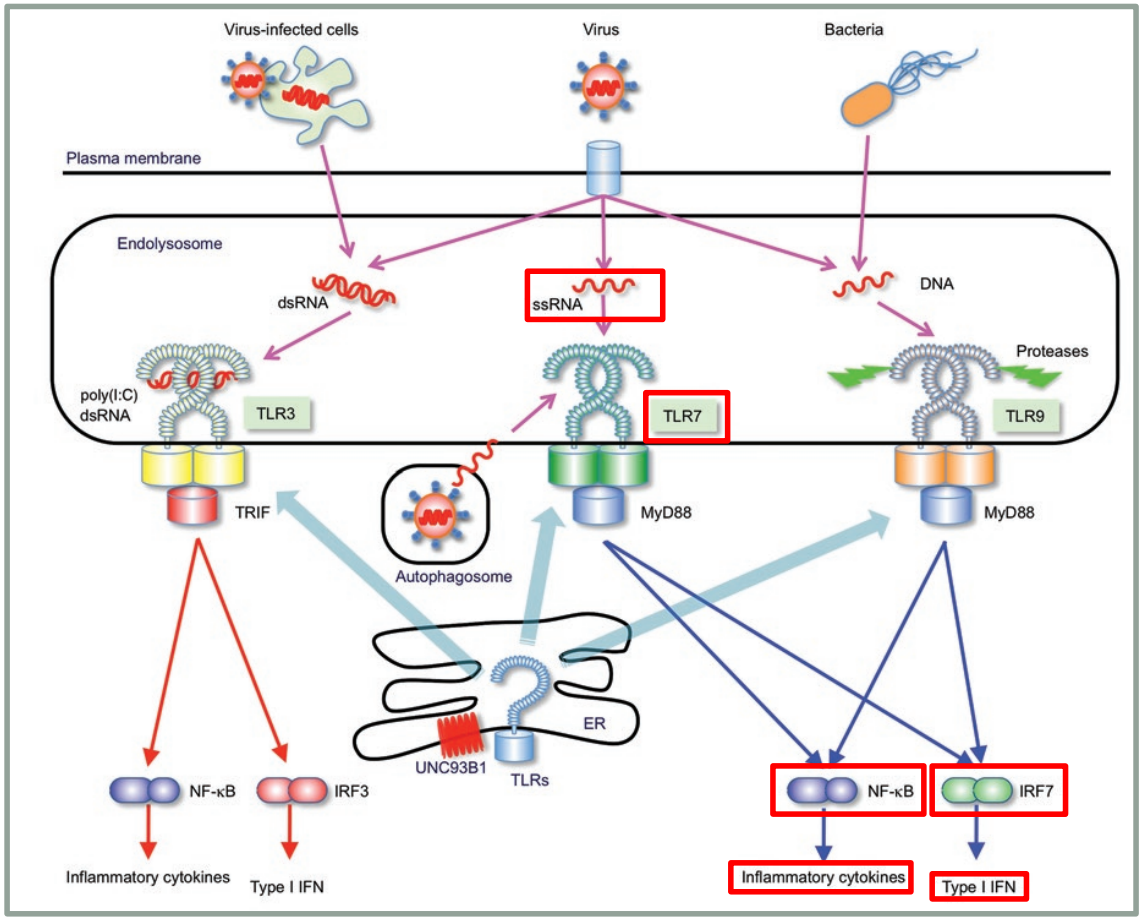
São necessários estudos adicionais para a compreensão da cinética do tamanho da cauda poli-A a nível de tradução do mRNA.

Miao *et al* 2021 Mol. Cancer 20:41

2. Vacina de mRNA

Nucleosídeos modificados:

Receptores do tipo Toll reconhecem estruturas conservadas nos patógenos e ativam genes alvos da resposta inata e adaptativa.



Vírus de RNA de fita simples ou fita-dupla reconhecem os receptores do tipo *Toll*, TLR7 e TLR3, respectivamente.

TLR7 ativados induzem citocinas inflamatórias e interferon tipo I.

2. Vacina de mRNA

Marco histórico: modificações químicas nos nucleosídeos de mRNA

Drew Weissman e Katalin Karikó

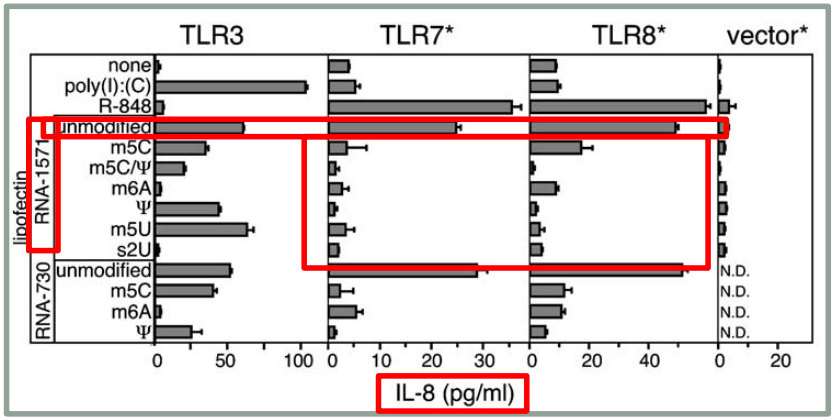
Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA

Immunity, Vol. 23, 165–175

Katalin Karikó,[1,*] Michael Buckstein,[2] Houping Ni,[2] and Drew Weissman[2]

Table 1. TLR Recognition of Microbial Components

Microbial Components	Species	TLR Usage
Viruses		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2



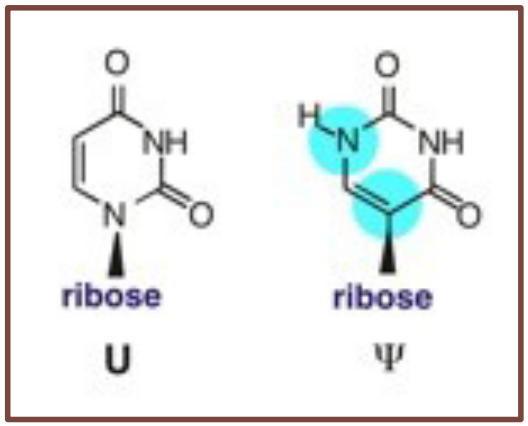
Células 293 expressando receptores do tipo *Toll* (TLR), simulando células do sistema immune que apresentam esses receptores, reconhecem e respondem a ácidos nucleicos. A ativação desses receptores levam a produção de interferon. A síntese de mRNA na presença de nucleotídeos quimicamente modificados modulam o potencial imunoestimulatório do RNA.

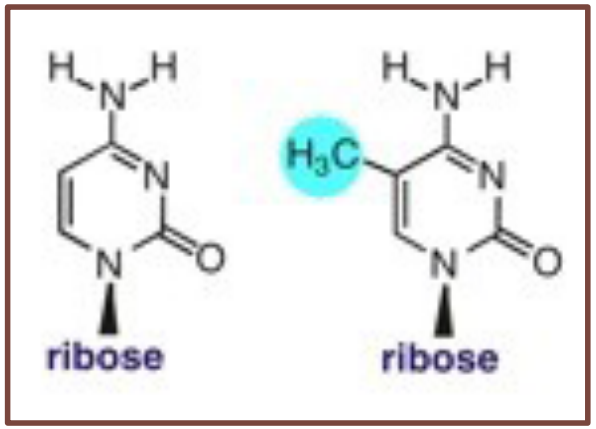
Akira et al, 2006 Cell 124: 783.

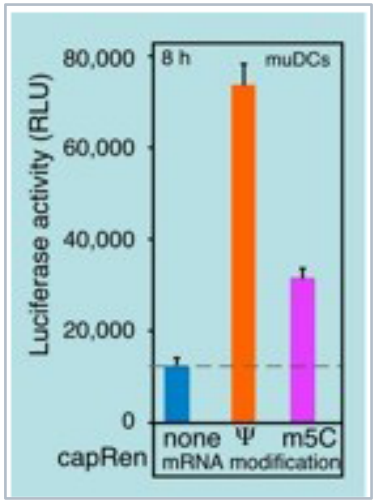
Kariko et al, 2005 Immunity 23: 165.

2. Vacina de mRNA

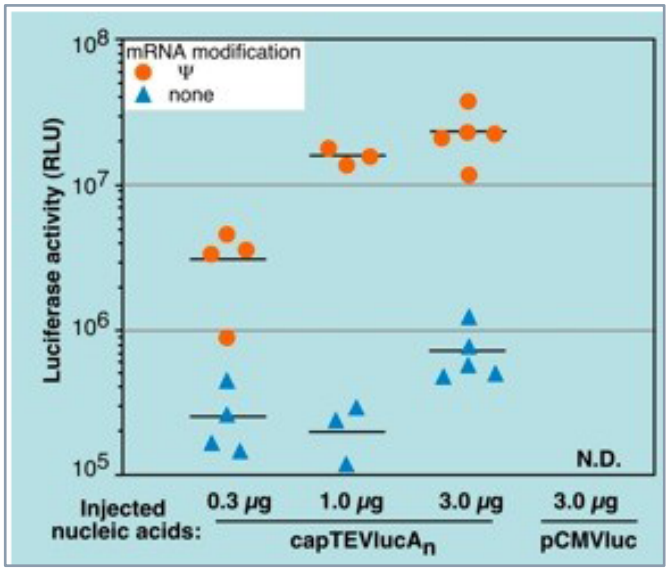
Modificações: pseudouridina e 5-metilcitidina







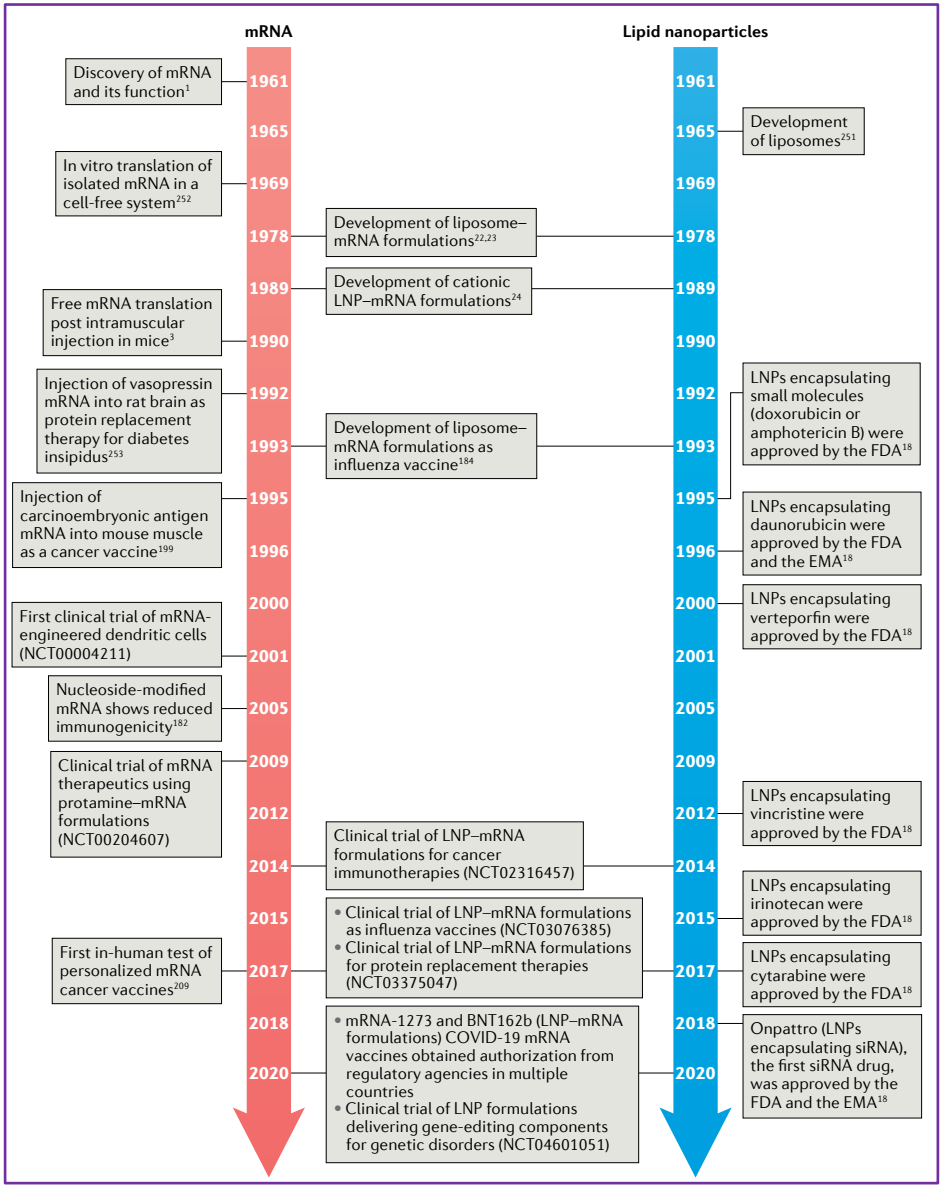
expressão *in vitro*



expressão *in vivo*

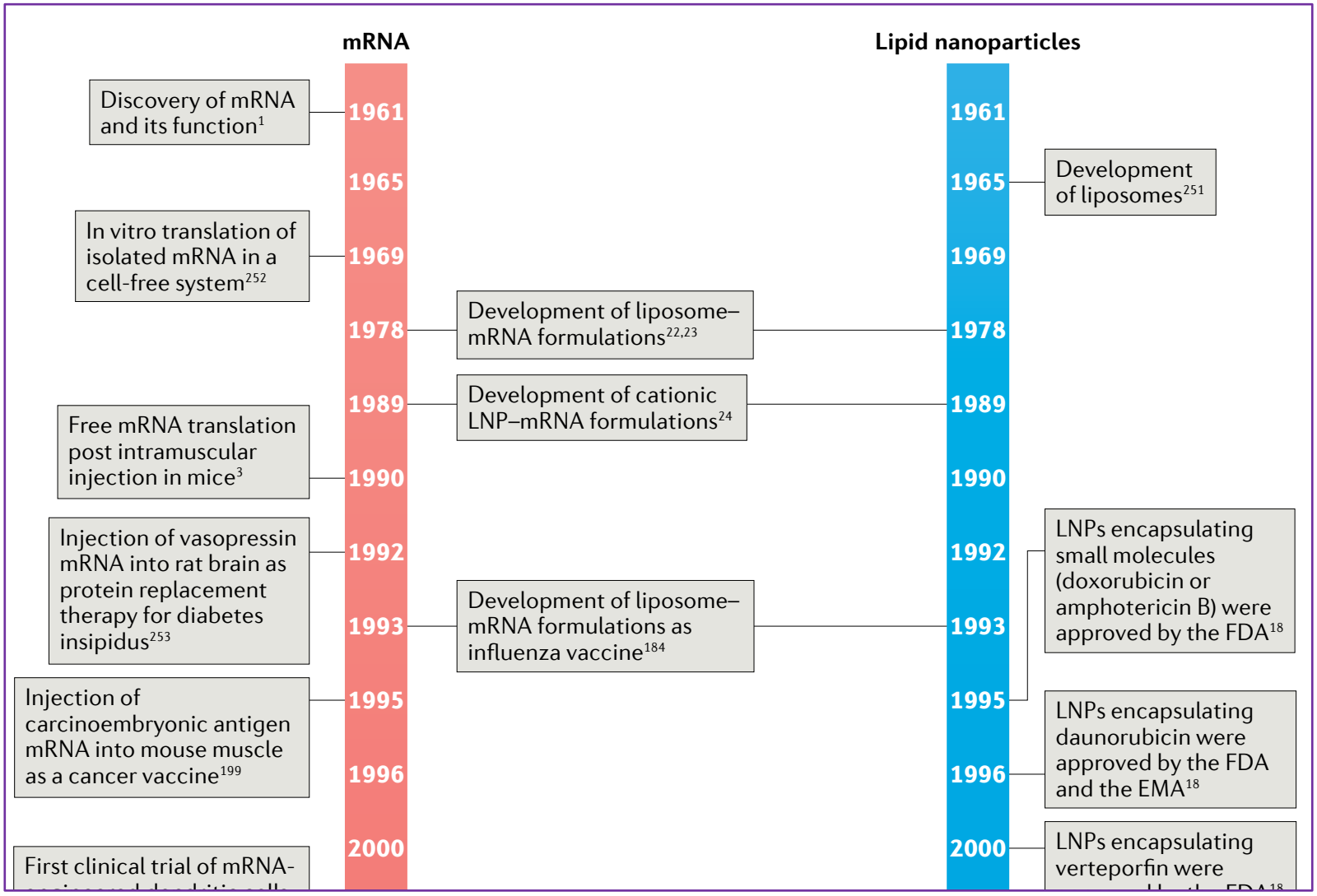
3. Sistema de entrega da molécula de mRNA

Nanopartícula lipídica:



3. Sistema de entrega da molécula de mRNA

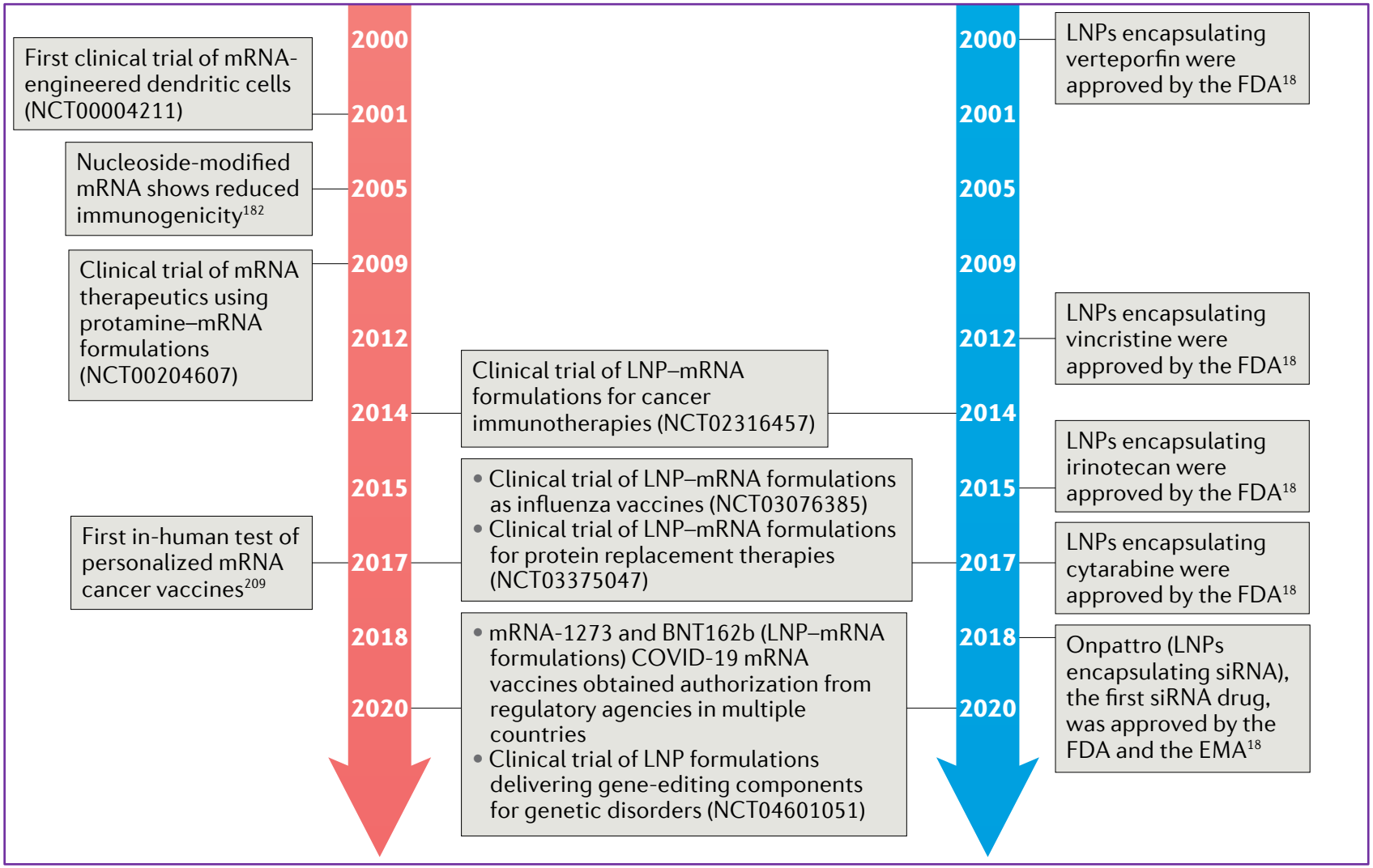
Nanopartícula lipídica:



Hou *et al* 2021 *Nature* 6: 1078

3. Sistema de entrega da molécula de mRNA

Nanopartícula lipídica:



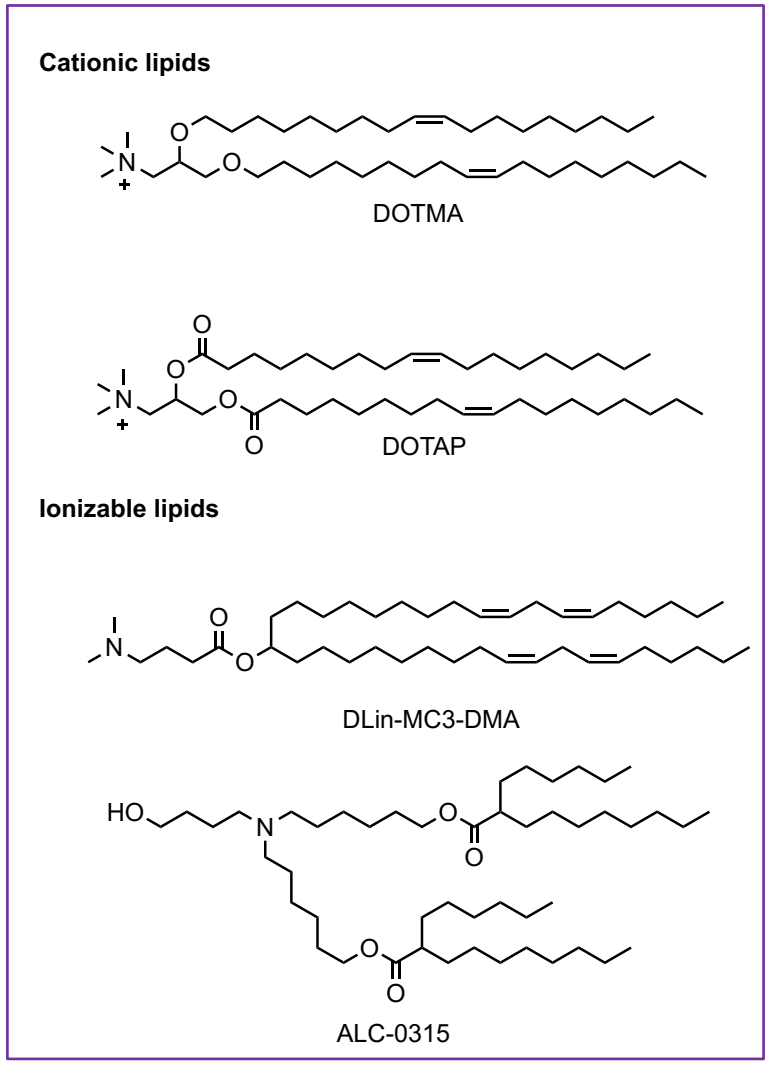
Hou *et al* 2021 *Nature* 6: 1078

3. Sistema de entrega da molécula de mRNA

Nanopartícula lipídica: vacinas de mRNA anti-COVID-19

4 moléculas lipídicas:

1. Lipídeo catiônico
2. Lipídeo ionizável
3. Fosfolipídeo
4. Colesterol



Hou *et al* 2021 *Nature* 6: 1078

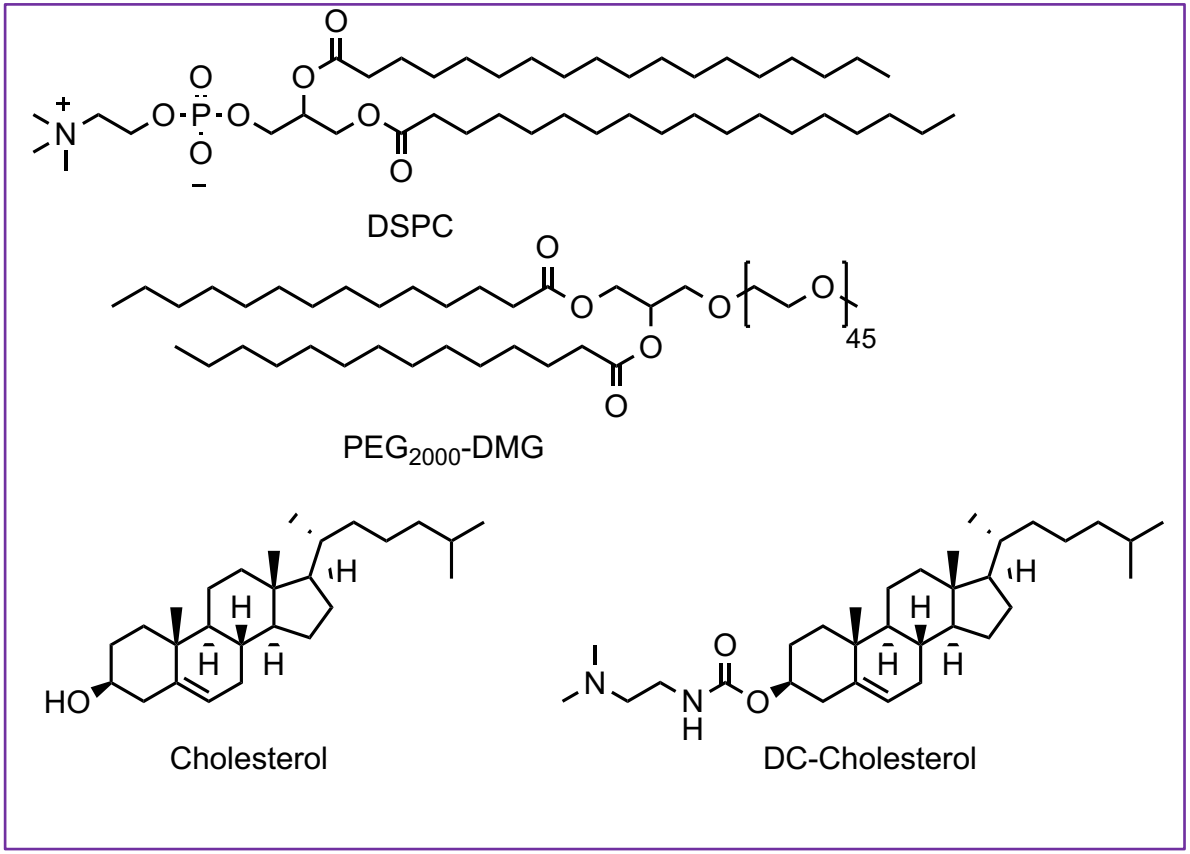
3. Sistema de entrega da molécula de mRNA

Nanopartícula lipídica: vacinas de mRNA anti-COVID-19

4 moléculas lipídicas:

3. Fosfolipídeo

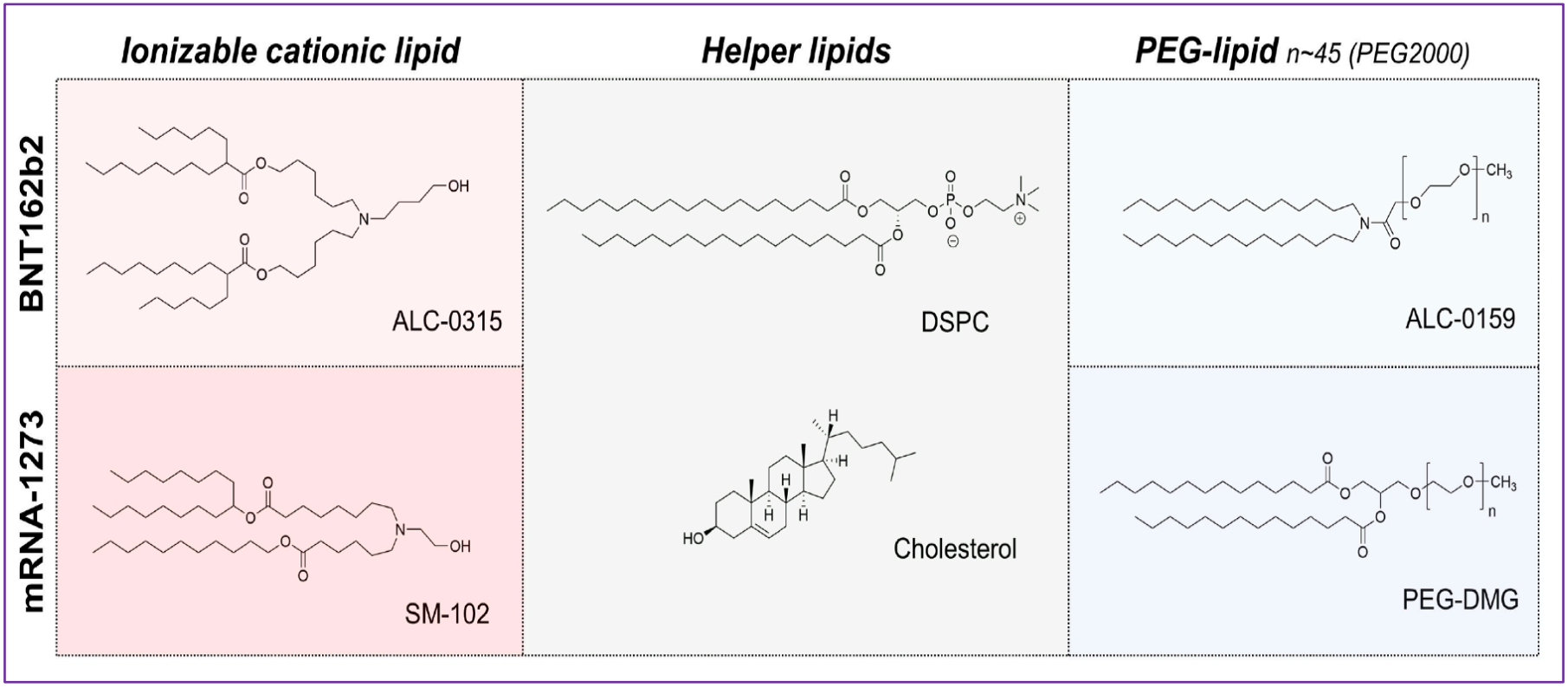
4. Colesterol



Hou *et al* 2021 *Nature* 6: 1078

3. Sistema de entrega da molécula de mRNA

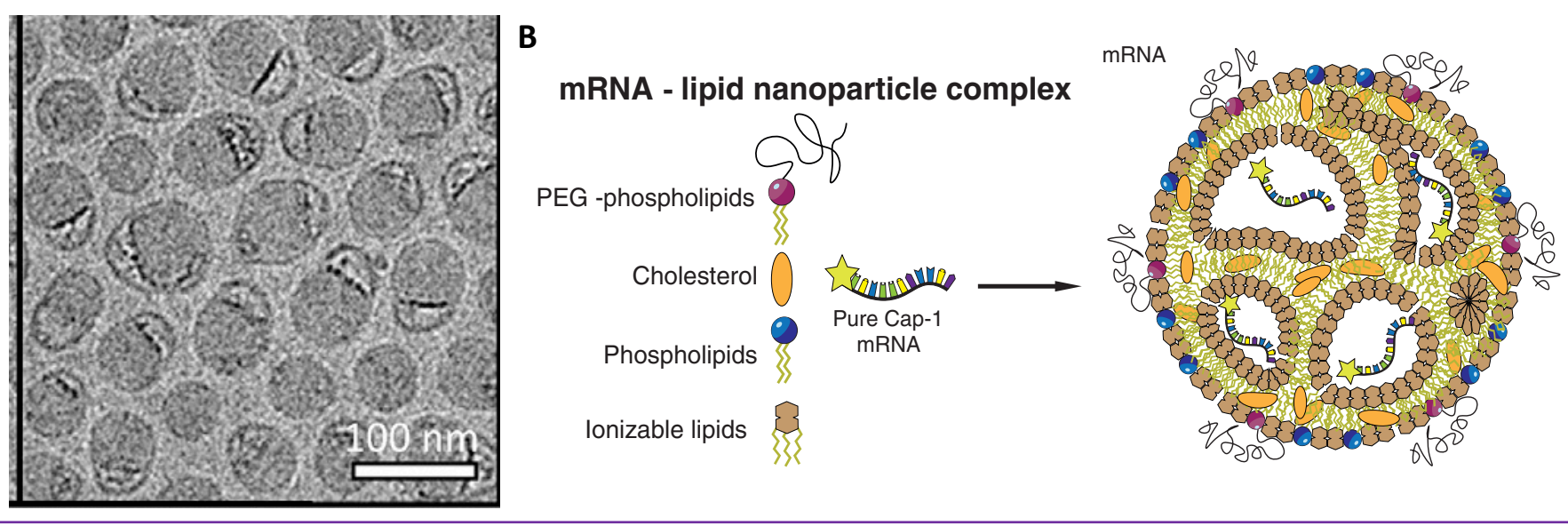
Nanopartícula lipídica: vacinas de mRNA anti-COVID-19



Schoenmaker *et al* 2021 *Nature* 6: 1078

3. Sistema de entrega da molécula de mRNA

Nanopartícula lipídica: vacinas de mRNA anti-COVID-19



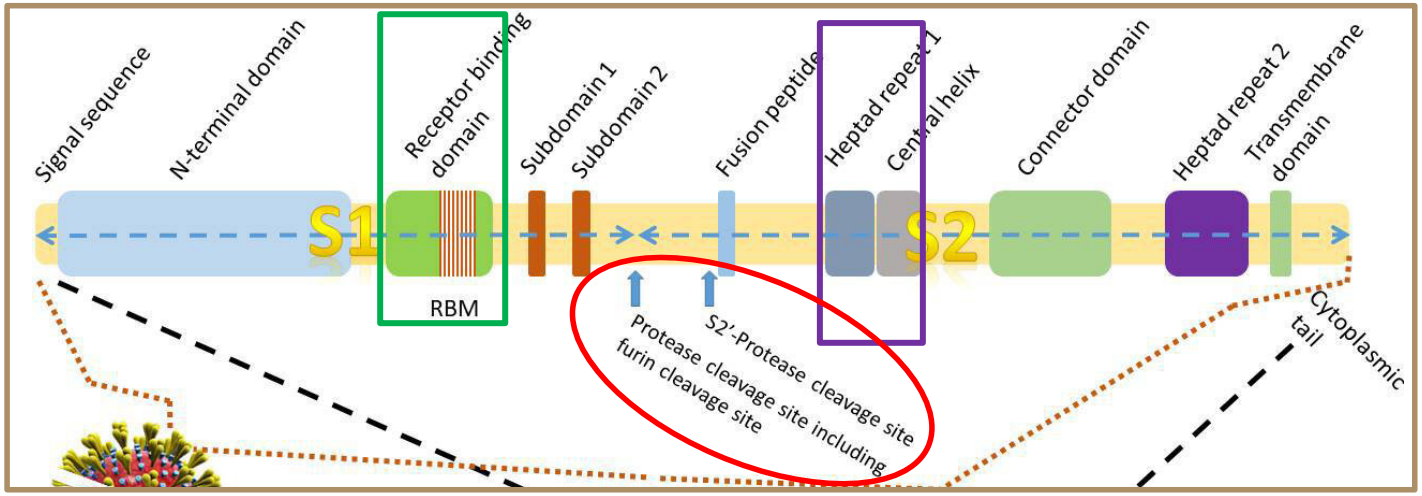
Brader et al 2021, Biophys J. 120: 2766 e Linares-Fernades *et al* 2021 *Trends Mol Med* 26: 311

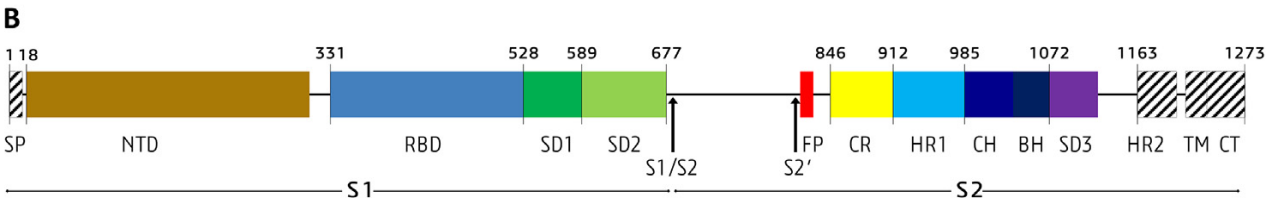
4. mRNA and Protein Spike

Gene of the month

Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein

Pillay TS. *J Clin Pathol* 2020;**73**:366–369.



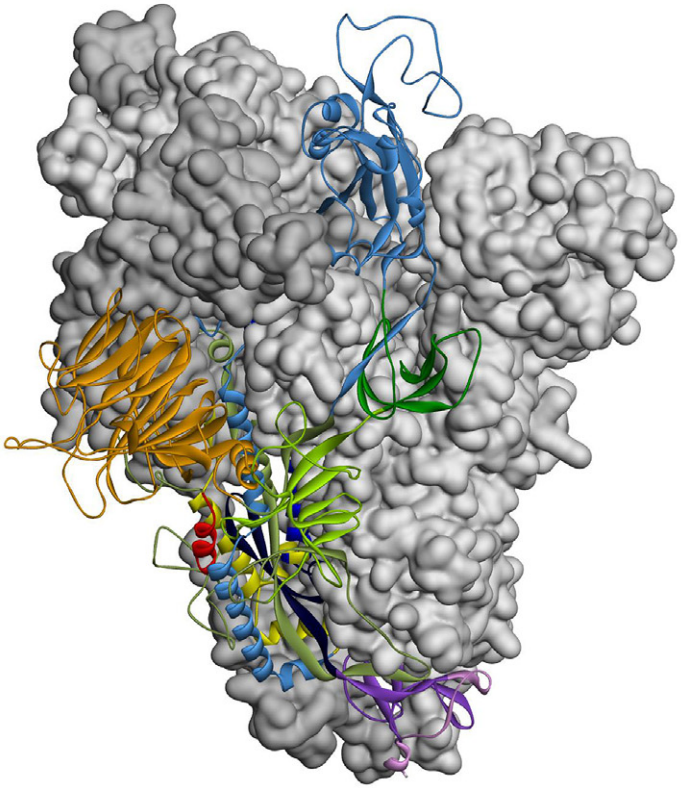


Infection, Genetics and Evolution 84 (2020) 104389

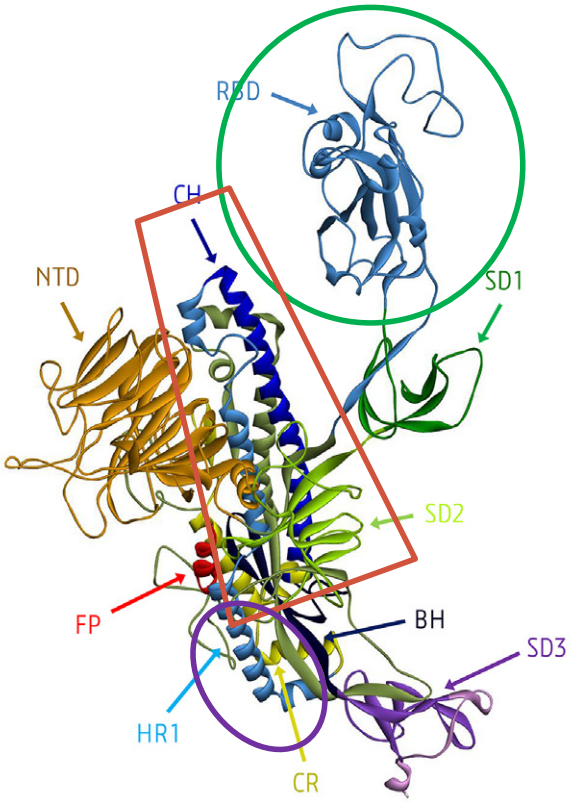
SARS-CoV-2 Spike Protein

Proteína transmembranal do tipo I, semelhante a proteína ENV do HIV-1, apresenta dois domínios **S1** e **S2** e dois sítios de clivagem no domínio S2.

4. mRNA and Protein Spike



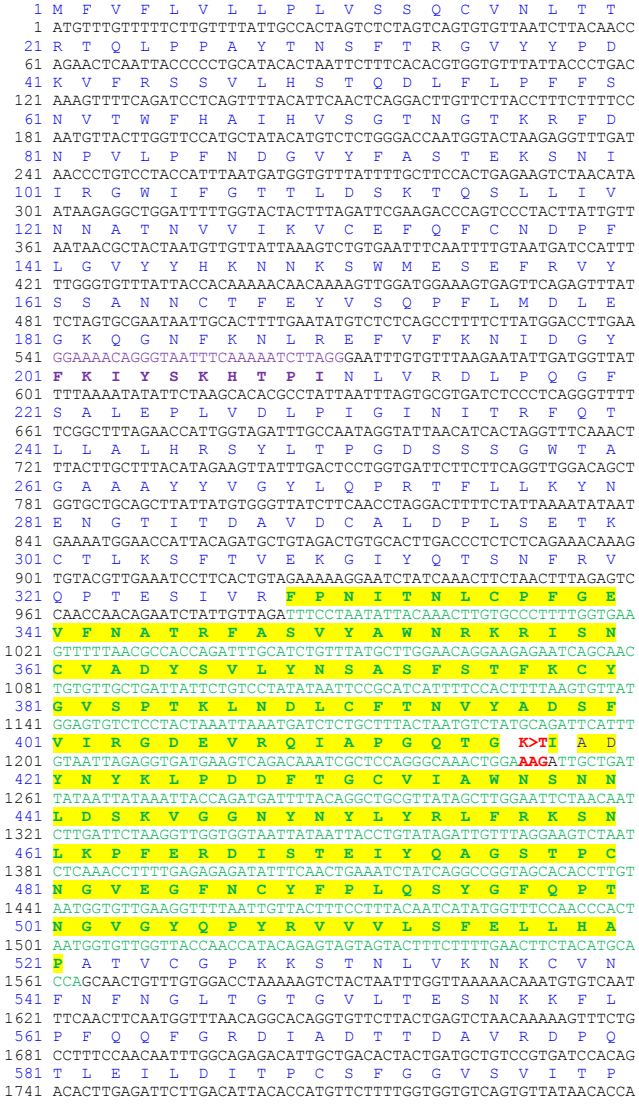
Homology Model of
SARS-CoV-2 Spike Protein Trimer



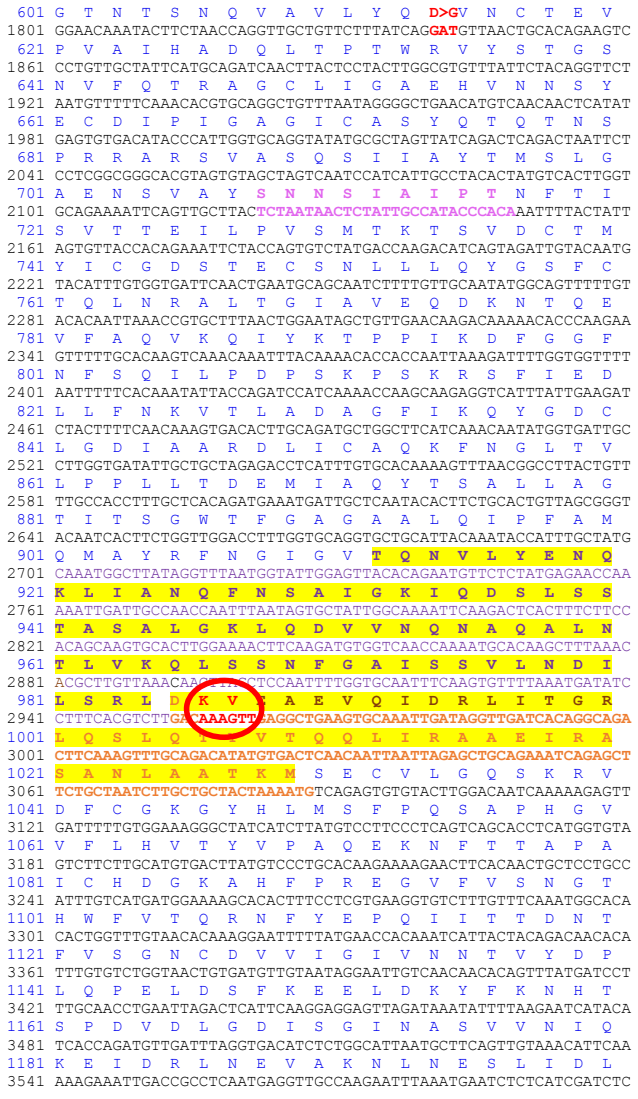
Ribbon diagram of
SARS-CoV-2 Spike Protein Monomer

Lockman et al 2020 Infection, Genetics and Evolution 84 (2020) 104389

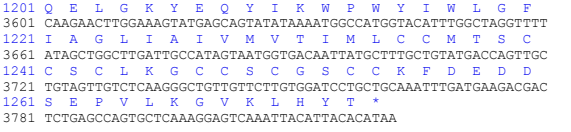
4. mRNA and Protein Spike



Pfizer e BioNTech



Moderna e Pfizer



Domínio CH (central helix)

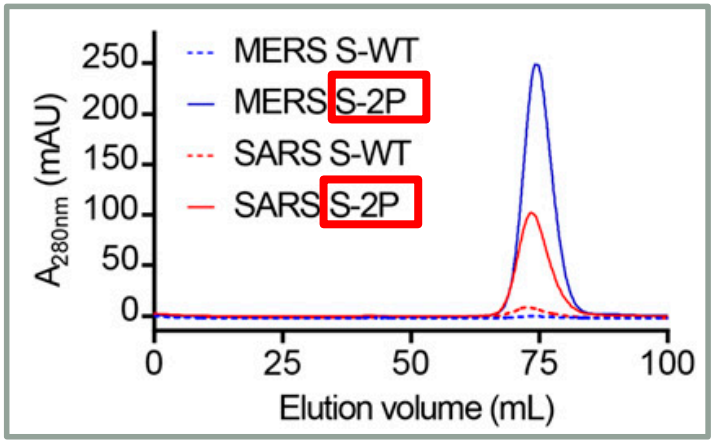
Domínio RBD

Destaques em: 1) variantes brasileiras de Fev/21 (domínio RBD K417T); 2) variante D614>G - mais comum e 3) sítio de furina (rosa).

Há duas vacinas da Pfizer: **BNT162b1** (apenas domínio RDB) e BNT162b2 (similar a Moderna [completa e 2P])

4. mRNA and Protein Spike

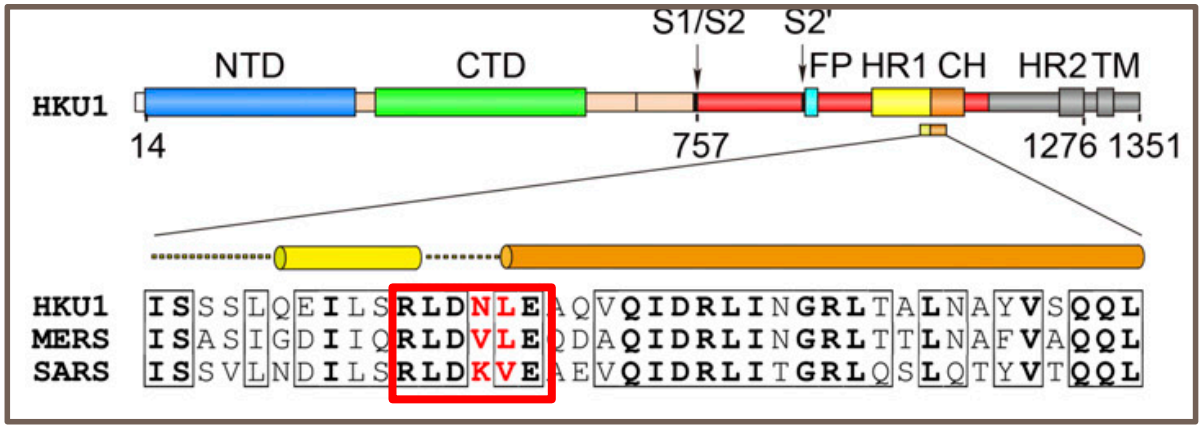
Características outras spikes: Pallessen *et al* 2017



Perfil gel-filtração a partir de 1 litro de produção transiente. Com relação ao sítio assinalado: duas proteínas spikes são mutantes (2P) e duas selvagens.

Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen PNAS E7348-E7357

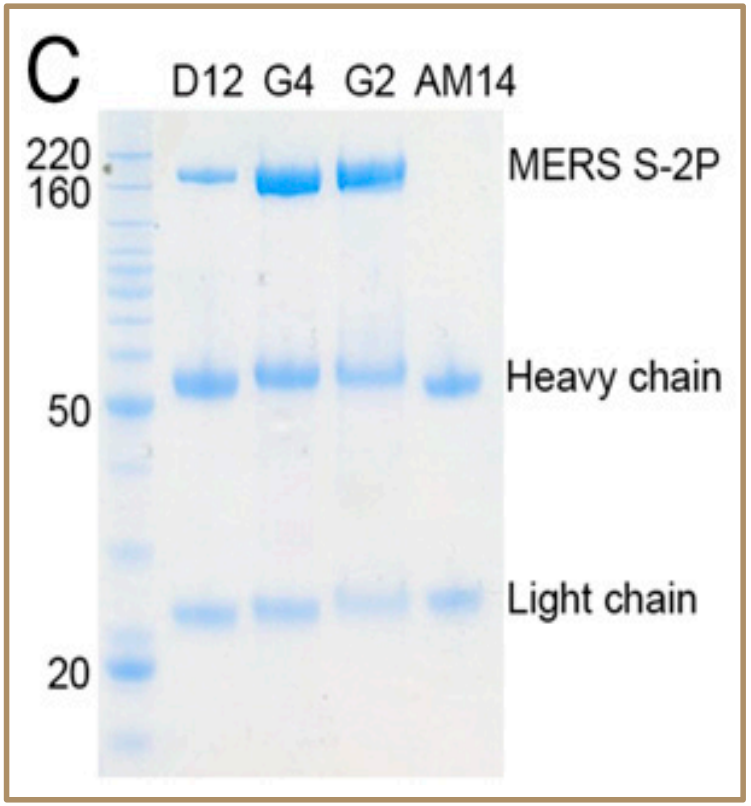
Jesper Pallesen[a,1], Nianshuang Wang[b,1,2], Kizzmekia S. Corbett[c,1], Daniel Wrapp[b], Robert N. Kirchdoerfer[a], Hannah L. Turner[a], Christopher A. Cottrell[a], Michelle M. Becker[d], Lingshu Wang[e], Wei Shi[e], Wing-Pui Kong[e], Erica L. Andres[d], Arminja N. Kettenbach[b,f], Mark R. Denison[d,g], James D. Chappell[d], Barney S. Graham[c], Andrew B. Ward[a,2], and Jason S. McLellan[b,2]



4. mRNA and Protein Spike

Características *spike* híbrida: Pallessen *et al* 2017

All four proteins were expressed with a C-terminal T4 fibritin trimerization domain



Análise em SDS/PAGE da proteína MERS-S-2P expressa em células 293-T mostrando que mantém a capacidade de reconhecer diferentes anticorpos. AM14 – anticorpo controle.

4. mRNA and Protein Spike

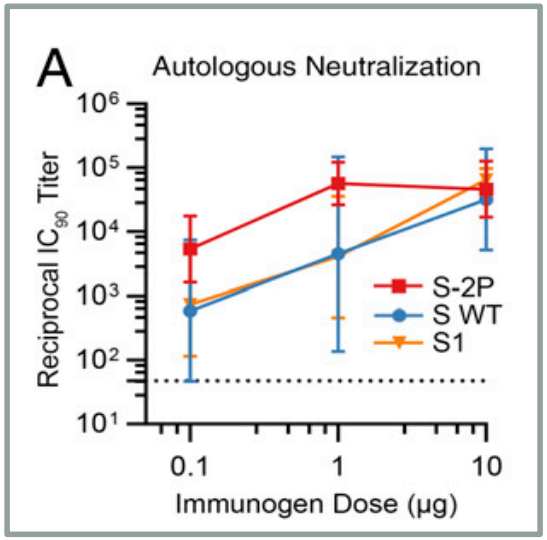
Spike: imunogenicidade - outros coronavirus

Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen

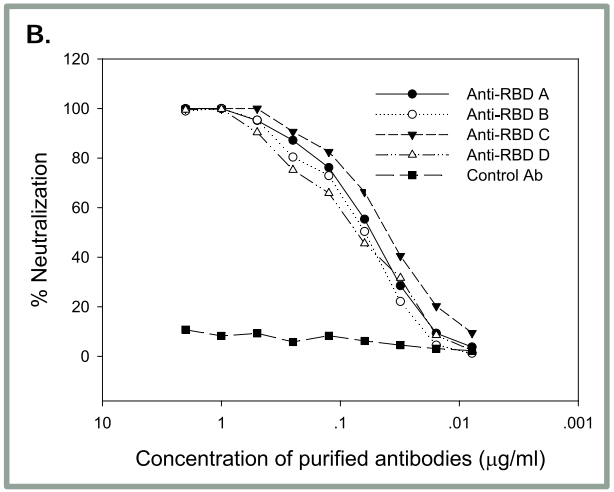
Jesper Pallesen[a,1], Nianshuang Wang[b,1,2], Kizzmekia S. Corbett[c,1], Daniel Wrapp[b], Robert N. Kirchdoerfer[a], Hannah L. Turner[a], Christopher A. Cottrell[a], Michelle M. Becker[d], Lingshu Wang[e], Wei Shi[e], Wing-Pui Kong[e], Erica L. Andres[d], Arminja N. Kettenbach[b,f], Mark R. Denison[d,g], James D. Chappell[d], Barney S. Graham[c], Andrew B. Ward[a,2], and Jason S. McLellan[b,2]

Potent and persistent antibody responses against the receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein in recovered patients

Zhiliang Cao[1†], Lifeng Liu[2†], Lanying Du[3], Chao Zhang[1], Shibo Jiang[3], Taisheng Li[2*], Yuxian He[1*]



Spike 2P [MERS] atividade neutralizante no soro

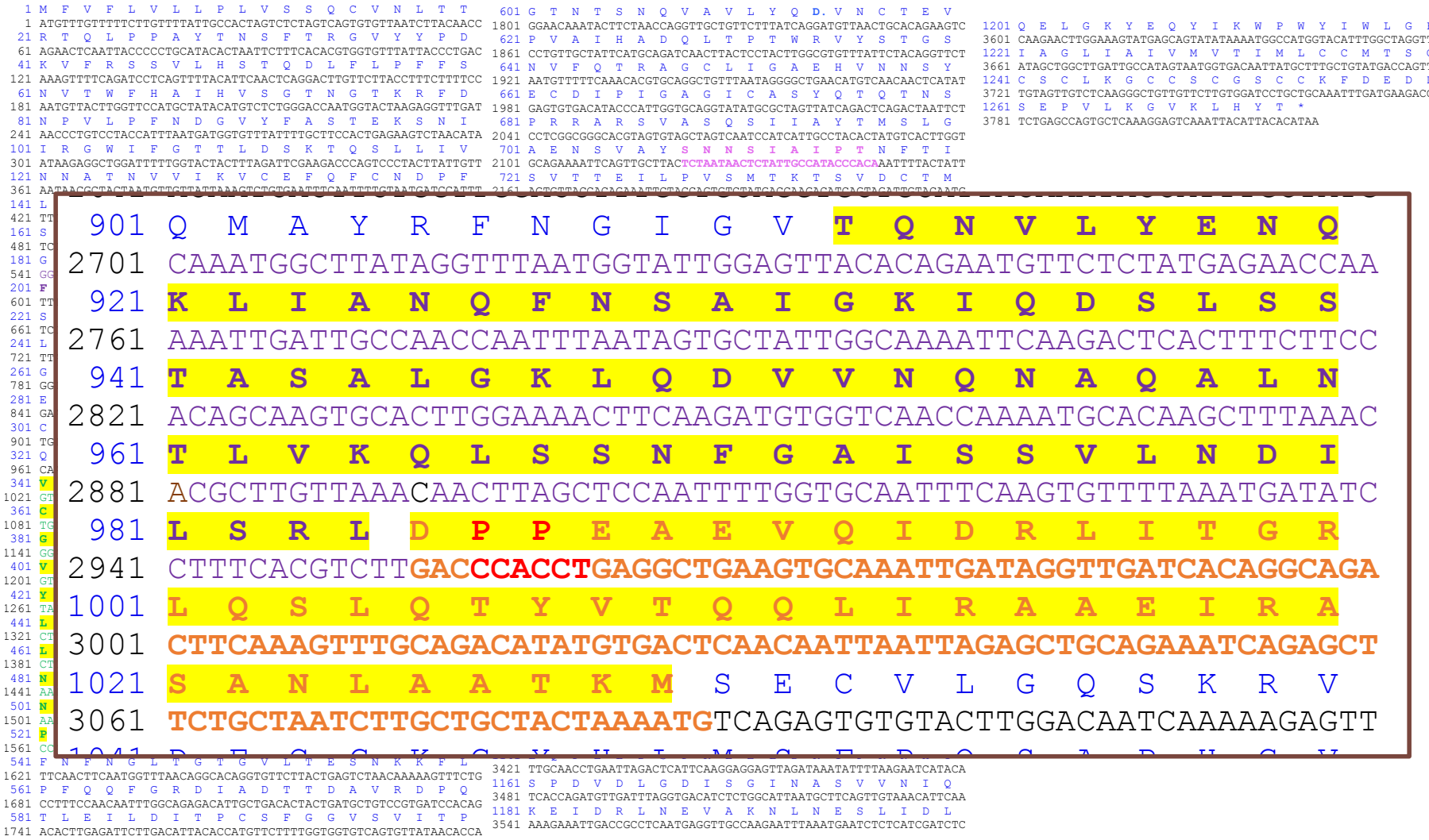


Neutralização da infecção por pseudovírus SARS-CoV-1 utilizando anticorpo específico domínio RBD

Pallesen *et al* 2017 PNAS E7349

Cao et al 2010 Virology J. 7:299

5. mRNA-1273 – MODERNA – SARS-CoV-2 S-SP



5. mRNA-1273 – MODERNA – Resposta humoral

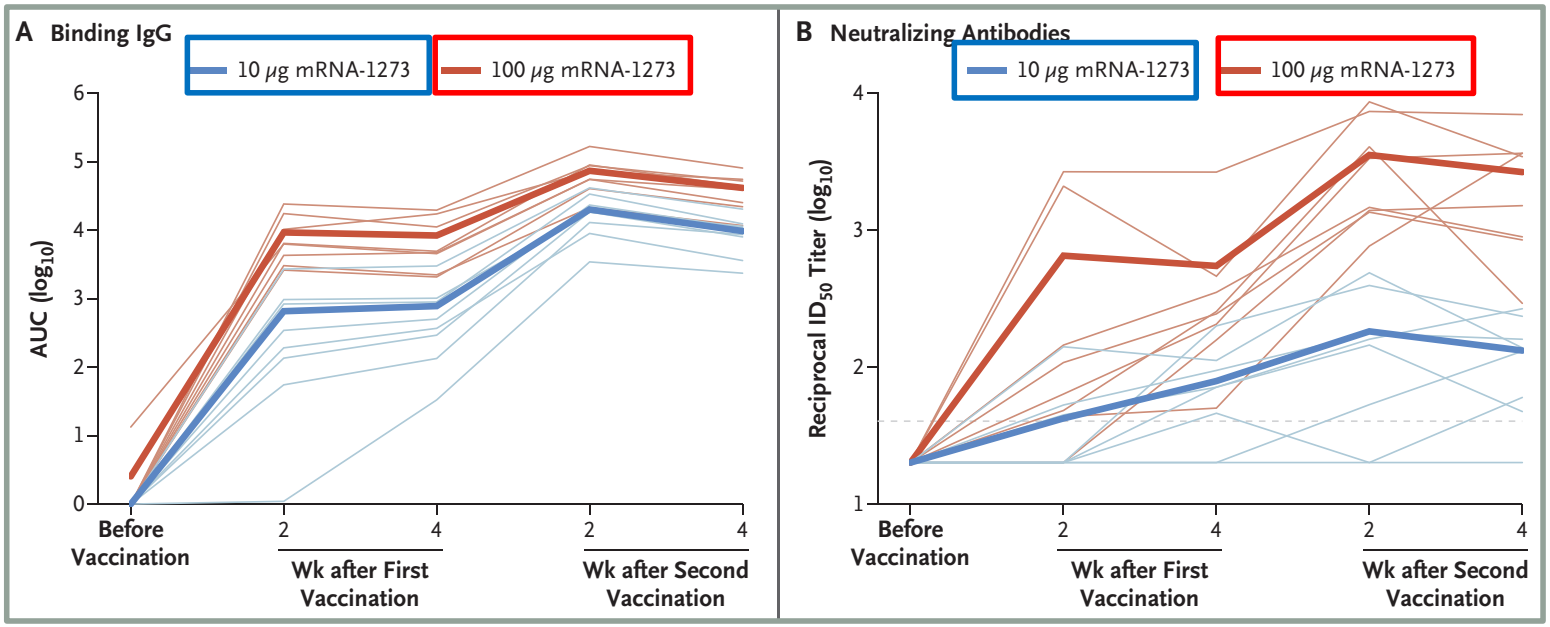
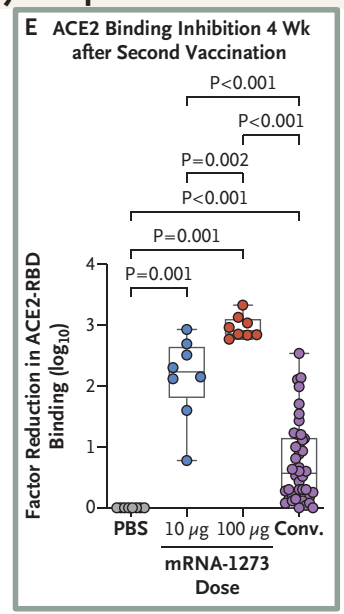
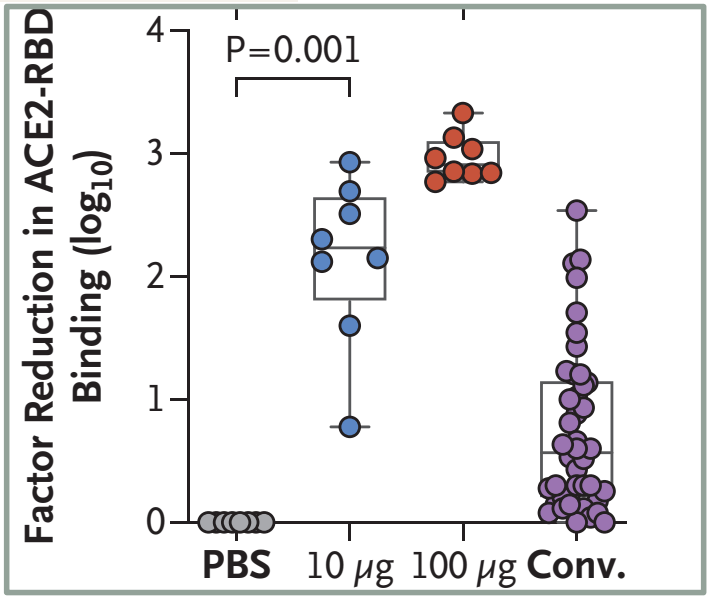
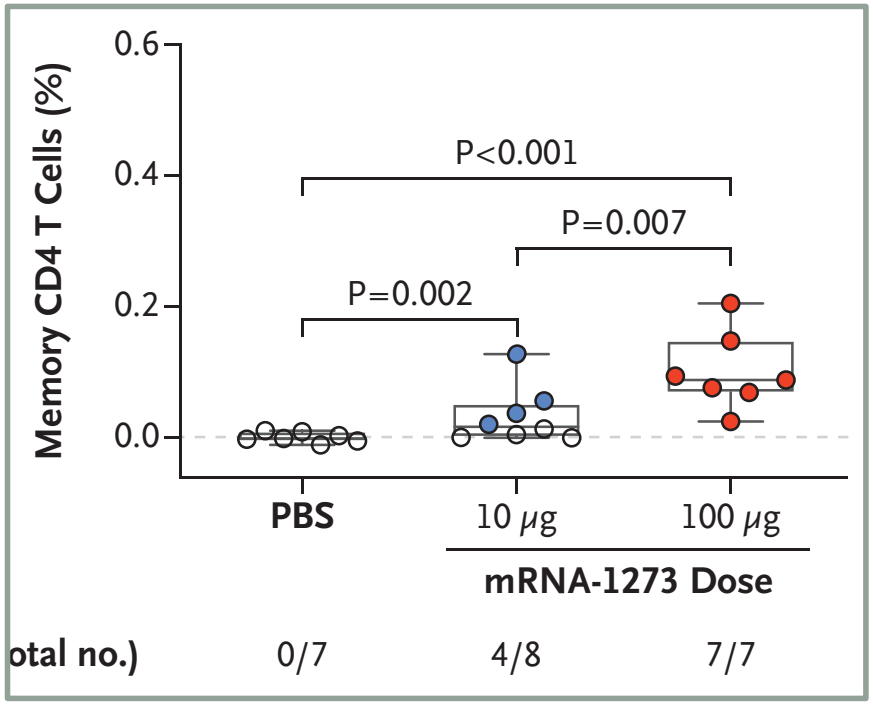


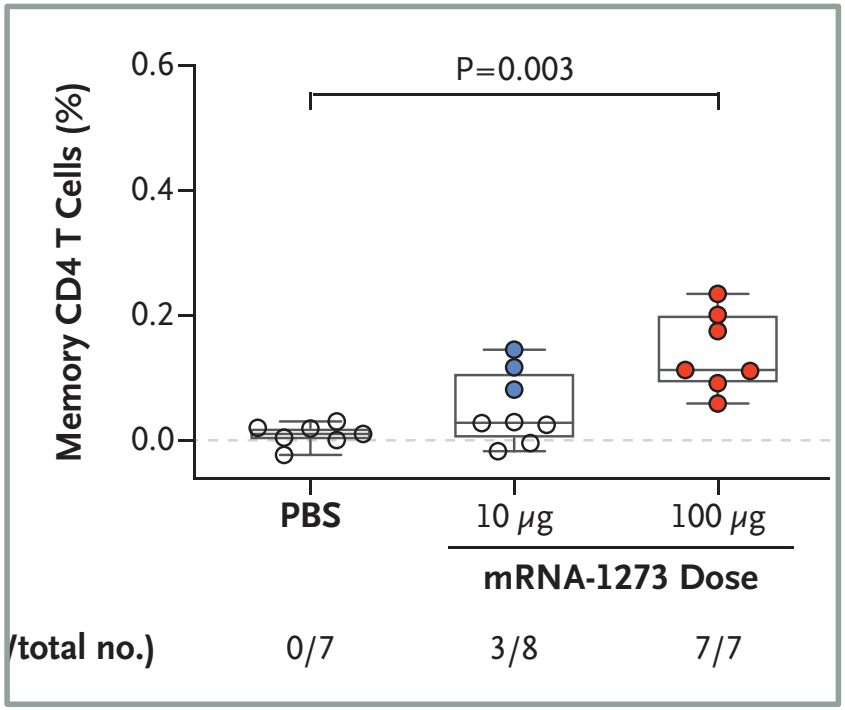
Figure 1. Antibody Responses after mRNA-1273 Vaccination in Rhesus Macaques.





5. mRNA-1273 – MODERNA – Resposta celular





Aumento da resposta T helper 1 foi observada 4 semanas após a segunda dose: 4/4 com 10 ug e 7/7 com 100 ug.

CD40L modula a ativação de linfócito B. 3/8 tiveram ativação de CD40-L com 10 ug e 7/7 com 100 ug.

Th2 responses were low to undetectable in both vaccine dose groups (Fig. 2B). CD8 T-cell responses were also low to undetectable after mRNA-1273 vaccination.

5. mRNA-1273 – MODERNA – SARS-CoV-2 S-SP

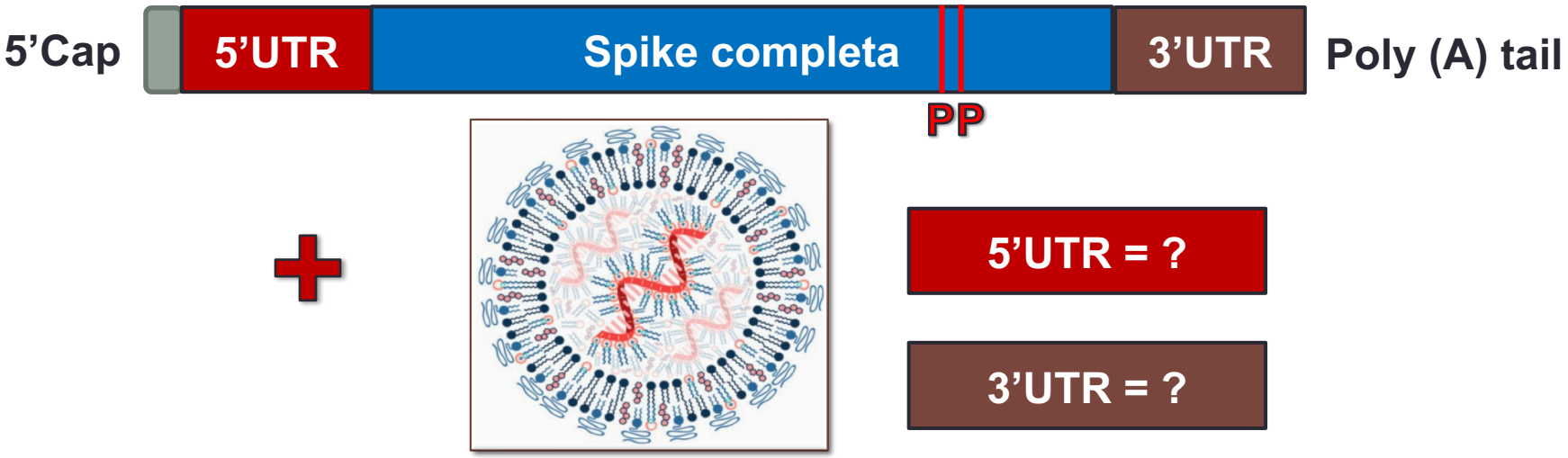
RESULTS

First, we evaluated temporal SARS-CoV-2 S-2P–specific antibody responses after vaccination. IgG binding to the conformationally defined prefusion S-2P protein[25,26] was increased over baseline

25. Pallesen J, Wang N, Corbett KS, et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 2017; 114:E7348-E7357.

26. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science 2020;367:1260-3.

Como é a moléculas mRNA da vacina anti-SARS-CoV-2 da Moderna



5. mRNA-1273 – MODERNA – SARS-CoV-2 S-SP

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine

L.R. Baden, H.M. El Sahly, B. Essink, K. Kotloff, S. Frey, R. Novak, D. Diemert, S.A. Spector, N. Rouphael, C.B. Creech, J. McGettigan, S. Khetan, N. Segall, J. Solis, A. Brosz, C. Fierro, H. Schwartz, K. Neuzil, L. Corey, P. Gilbert, H. Janes, D. Follmann, M. Marovich, J. Mascola, L. Polakowski, J. Ledgerwood, B.S. Graham, H. Bennett, R. Pajon, C. Knightly, B. Leav, W. Deng, H. Zhou, S. Han, M. Ivarsson, J. Miller, and T. Zaks, for the COVE Study Group*

RESULTS

The trial enrolled 30,420 volunteers who were randomly assigned in a 1:1 ratio to receive either vaccine or placebo (15,210 participants in each group). More than

5. mRNA-1273 – MODERNA – SARS-CoV-2 S-SP

Conclusão:

mRNA com 3822 nt contendo a região codificadora completa, isto é, 1273 aas da proteína *spike* e duas mutações *missense* nas posições – K986 > P e V987 > P.

Perguntas:

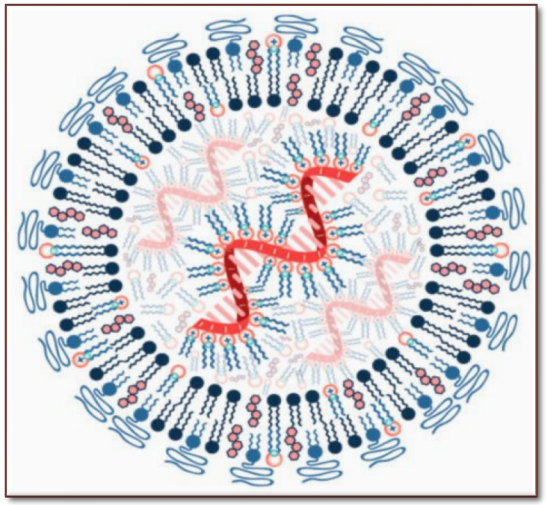
Quais os tamanhos das regiões 5' UTR e 3' UTR e suas respectivas sequências?

Qual o tamanho da cauda poli A?

6. mRNA vaccine BNT162b2

Construção da molécula de mRNA: similar à Moderna

+



Nanopartícula lipídica

4 moléculas lipídicas (50:10:38.5:1.5)

Article

BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2

Nature | Vol 592 | 8 April 2021 | **283**

https://doi.org/10.1038/s41586-021-03275-y

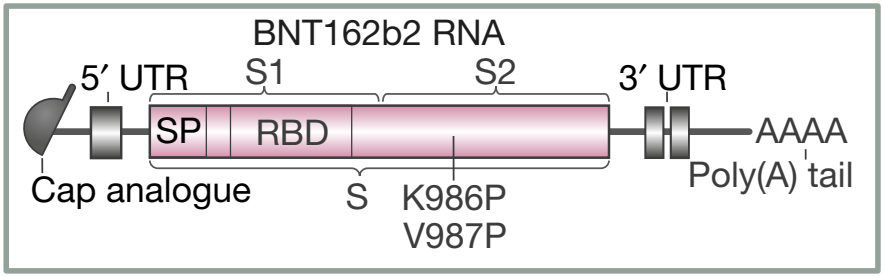
Received: 1 September 2020

Accepted: 20 January 2021

Published online: 1 February 2021

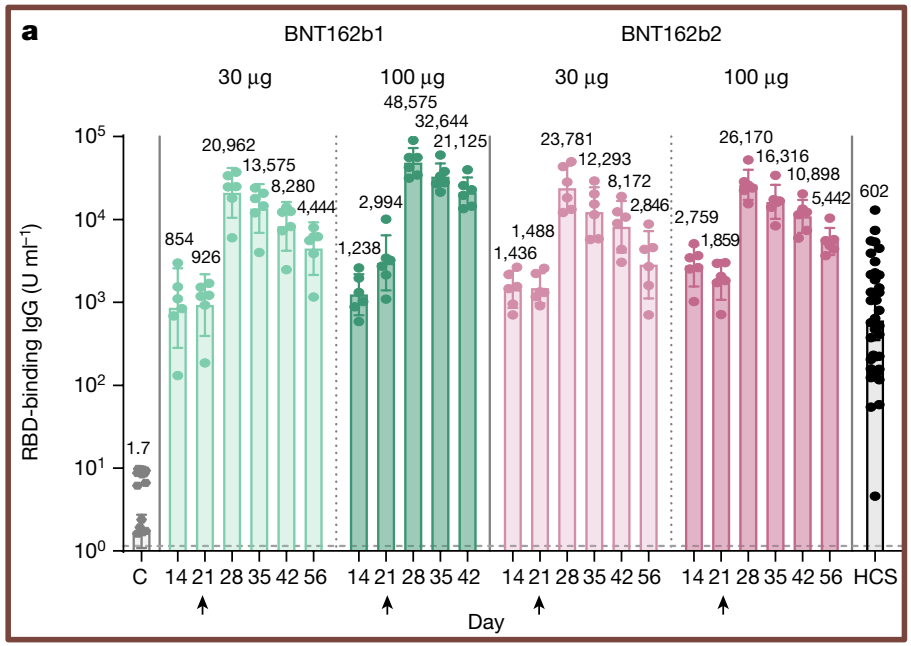
Check for updates

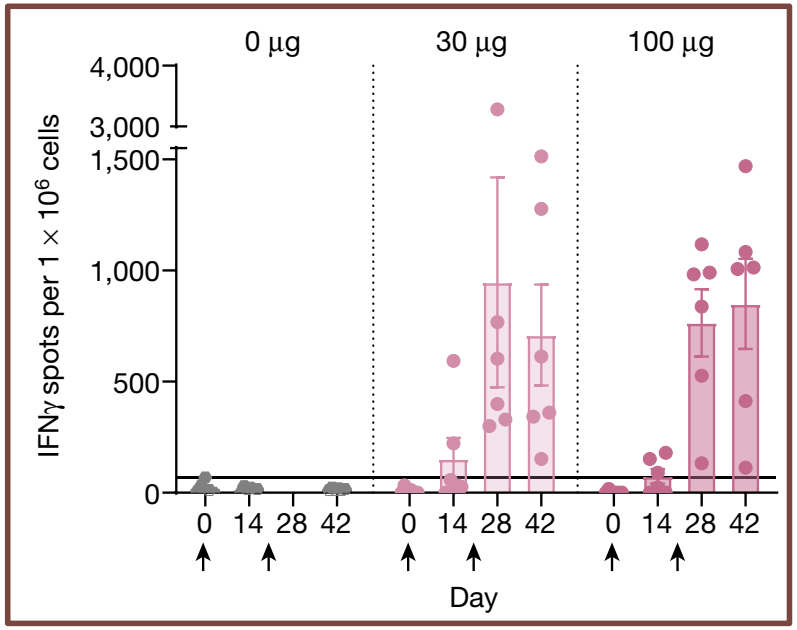
Annette B. Vogel[1,10], Isis Kanevsky[2,10], Ye Che[3,10], Kena A. Swanson[2], Alexander Muik[1], Mathias Vormehr[1], Lena M. Kranz[1], Kerstin C. Walzer[1], Stephanie Hein[1], Alptekin Güler[1], Jakob Loschko[2], Mohan S. Maddur[2], Ayuko Ota-Setlik[2], Kristin Tompkins[2], Journey Cole[4], Bonny G. Lui[1], Thomas Ziegenhals[1], Arianne Plaschke[1], David Eisel[1], Sarah C. Dany[1], Stephanie Fesser[1], Stephanie Erbar[1], Ferdia Bates[1], Diana Schneider[1], Bernadette Jesionek[1], Bianca Sänger[1], Ann-Kathrin Wallisch[1], Yvonne Feuchter[1], Hanna Junginger[1], Stefanie A. Krumm[1], André P. Heinen[1], Petra Adams-Quack[1], Julia Schlereth[1], Stefan Schille[1], Christoph Kröner[1], Ramón de la Caridad Güimil Garcia[1], Thomas Hiller[1], Leyla Fischer[1], Rani S. Sellers[2], Shambhunath Choudhary[2], Olga Gonzalez[4], Fulvia Vascotto[5], Matthew R. Gutman[6], Jane A. Fontenot[7], Shannan Hall-Ursone[4], Kathleen Brasky[4], Matthew C. Griffor[3], Seungil Han[3], Andreas A. H. Su[1], Joshua A. Lees[3], Nicole L. Nedoma[3], Ellene H. Mashalidis[3], Parag V. Sahasrabudhe[3], Charles Y. Tan[2], Danka Pavliakova[2], Guy Singh[2], Camila Fontes-Garfias[8], Michael Pride[2], Ingrid L. Scully[2], Tara Ciolino[2], Jennifer Obregon[2], Michal Gazi[9], Ricardo Carrion Jr[4], Kendra J. Alfson[5], Warren V. Kalina[2], Deepak Kaushal[4], Pei-Yong Shi[8], Thorsten Klamp[1], Corinna Rosenbaum[1], Andreas N. Kuhn[1], Özlem Türeci[1], Philip R. Dormitzer[2], Kathrin U. Jansen[2] & Ugur Sahin[1,5]✉



6. mRNA vaccine BNT162b2

Avaliação da imunogenicidade em macaco:





Concentração do anticorpo IgG em diferentes teipos após a segunda dose da vacina em duas diferentes concentrações.

Elevada fraçãp de células T-CD4+ e T-CD8+ por meio do nível de produção de IFN–γ.

**** A seta no eixo X indica o dia da segunda dose**

6. mRNA vaccine BNT162b2

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812 DECEMBER 31, 2020 VOL. 383 NO. 27

Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine

Fernando P. Polack, M.D., Stephen J. Thomas, M.D., Nicholas Kitchin, M.D., Judith Absalon, M.D., Alejandra Gurtman, M.D., Stephen Lockhart, D.M., John L. Perez, M.D., Gonzalo Pérez Marc, M.D., Edson D. Moreira, M.D., Cristiano Zerbini, M.D., Ruth Bailey, B.Sc., Kena A. Swanson, Ph.D., Satrajit Roychoudhury, Ph.D., Kenneth Koury, Ph.D., Ping Li, Ph.D., Warren V. Kalina, Ph.D., David Cooper, Ph.D., Robert W. Frenck, Jr., M.D., Laura L. Hammitt, M.D., Özlem Türeci, M.D., Haylene Nell, M.D., Axel Schaefer, M.D., Serhat Ünal, M.D., Dina B. Tresnan, D.V.M., Ph.D., Susan Mather, M.D., Philip R. Dormitzer, M.D., Ph.D., Uğur Şahin, M.D., Kathrin U. Jansen, Ph.D., and William C. Gruber, M.D., for the C4591001 Clinical Trial Group*

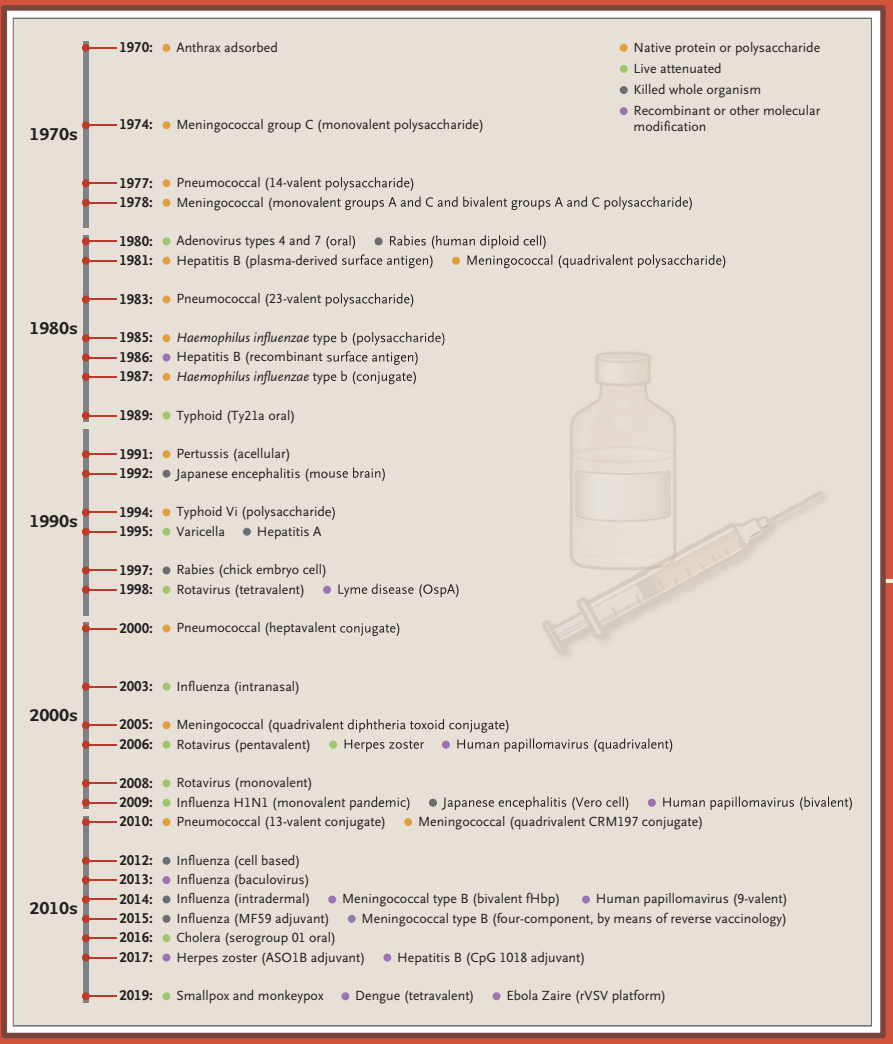
RESULTS

A total of 43,548 participants underwent randomization, of whom 43,448 received injections: 21,720 with BNT162b2 and 21,728 with placebo. There were 8 cases of

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

Perspective

FEBRUARY 4, 2021



A resposta a COVID-19 foi o melhor exemplo de como novas vacinas podem agora serem desenvolvidas.

Em menos de 1 ano, o primeiro ensaio clínico estava completo e foram as primeiras vacinas autorizadas para o **uso emergencial.**

Inicia-se um **novo desafio** em outras áreas da medicina. Ex. *vacinas terapêuticas* anti-tumorais.