



Vacinas de DNA MULTIVALENTES

Pesquisas abrem caminho para a vacina ideal

Marcio de Oliveira Lásaro

Aluno de doutorado do curso de Pós-graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ
molasar@biof.ufrj.br

Carolina Tereza Cequalini Rohr

Aluna de Biologia - Universidade Presbiteriana Mackenzie
carolzinbar@hotmail.com

Luís Carlos de Souza Ferreira

Professor Titular Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas- USP
lcsf@usp.br



Figura 1: Estratégia para a geração de vacinas de DNA multivalente baseada em mistura de plasmídeos que codificam para antígenos diferentes. Cada um dos genes *x* e *y* são clonados em diferentes plasmídeos e inoculados juntos na mesma formulação. As proteínas expressas são processadas individualmente e apresentadas ao sistema imune por moléculas de MHC

Após cerca de 180 anos da descoberta e aplicação da vacina contra a varíola, feita pelo Dr. Edward Jenner, em Gloucestershire, um pequeno município a oeste de Londres, a doença foi considerada erradicada do planeta, em 1977. Esse evento celebrou de forma definitiva o papel das vacinas na prevenção de doenças infecciosas e consagrou-as como uma das mais importantes descobertas na área médica de todos os tempos. Entretanto, a vitória contra a varíola representou apenas uma batalha vencida em uma guerra, na qual, a cada ano, milhões de vidas ainda são perdidas, sobretudo de crianças, vítimas de doenças que poderiam ser evitadas caso dispuséssemos de formulações vacinais contra diversos patógenos que afligem a humanidade.

Em 1974, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu como prioridade a implantação do Programa Ampliado de Imunização com vistas a permitir à população infantil ter acesso a vacinas eficazes contra algumas das principais doenças infecciosas (pólio, tuberculose, difteria, tétano, coqueluche, sarampo, cachumba, rubéola, hepatite). Outras vacinas capazes de prevenir doenças que ainda apresentam elevados índices de mortalidade e morbidade são aquelas desenvolvidas para o controle das meningites bacterianas (meningocócica e a causada pelo *H. influenza* do tipo B), a catapora (varicela), a pneumonia bacteriana e a gripe. A maioria dessas vacinas são administradas em regime de múltiplas doses, com intervalos definidos e em diferentes momentos da vida do indivíduo, o que aumenta os custos e pode levá-lo à desistência du-

rante os programas de imunização. Uma alternativa para esse problema são vacinas multivalentes, isto é, formulações que contenham em sua composição antígenos capazes de gerar proteção contra diversas doenças. O sucesso dessa abordagem foi demonstrado por exemplos como a vacina tríplice viral (sarampo, cachumba e rubéola), a tríplice bacteriana (difteria, coqueluche e tétano), ou ainda as vacinas multivalentes contra meningites meningocócicas e pneumonia pneumocócica, todas utilizadas com sucesso há vários anos. Infelizmente a estratégia não é universal e algumas limitações não puderam ser superadas. Restrições relacionadas com a solubilidade dos antígenos vacinais e a competição antigênica, quando a presença de um antígeno suprime ou diminui as respostas imunológicas induzidas contra outro antígeno co-administrado, impediram o desenvolvimento de novas formulações multivalentes ativas contra um maior número de doenças.

Recentes descobertas na área de pesquisa vacinal reacenderam as esperanças que novas formulações multivalentes, ativas contra um número ilimitado de doenças, possam ser criadas em um breve futuro. Dentre essas novas tecnologias, destacam-se as vacinas genéticas, ou vacinas de DNA. Essas vacinas são formadas por plasmídeos capazes de induzir respostas imunológicas em indivíduos inoculados com DNA purificado, reflexo da transfecção de células que passam a produzir os antígenos responsáveis pela proteção contra um patógeno específico (Azevedo & Oliveira, 1997; Silva, 1997; Lásaro & Ferreira, 1999). Ao contrário das vacinas convencionais, que se baseiam na inoculação de microrganismos mortos, atenuados ou de frações celulares purificadas para induzir uma resposta imunológica, as vacinas de DNA empre-

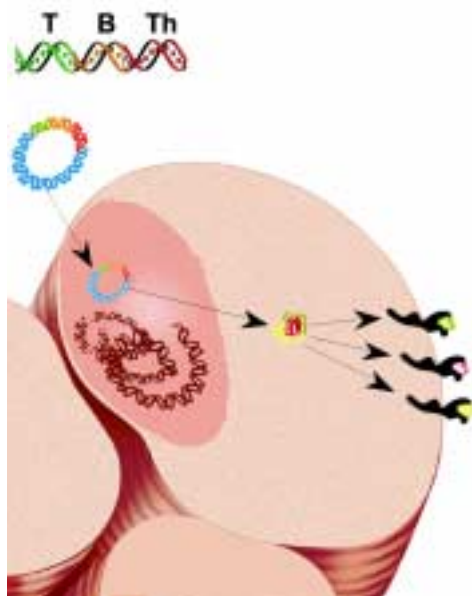


Figura 2: Estratégia para geração de vacinas de DNA multivalente baseada em minigenes ou politopos. Regiões de genes que codificam epitopos específicos para linfócitos T citotóxicos, B ou T auxiliares (T, B, Th; na figura) são clonados na mesma fase de leitura em um único plasmídeo. Após a inoculação do plasmídeo no hospedeiro, o minigene expresso é processado e os epitopos são apresentados ao sistema imune por moléculas de MHC

gam um protocolo único para sua produção, o que resulta em considerável redução de custos, além de evitar o contato direto com o patógeno ou com produtos dele extraídos.

Pela própria composição e mecanismo de ação, as vacinas de DNA mostram grande potencial para a elaboração de formulações multivalentes. Como não se trabalha com os microrganismos ou com produtos deles isolados, as limitações ficam eliminadas quanto à solubilidade antigênica. Com o auxílio de técnicas de clonagem gênica, é possível inserir em um mesmo plasmídeo, ou em plasmídeos diferentes, vários genes que codifiquem para antígenos oriundos de um mesmo patógeno ou de patógenos diferentes. Por outro lado, como as células transfectadas do próprio indivíduo se encarregam de produzir os antígenos codificados pelos genes nelas introduzidos, espera-se que sejam

minimizados problemas relacionados com a competição antigênica. As pesquisas para o desenvolvimento de vacinas de DNA multivalentes avançam em ritmo acelerado e três estratégias principais são investigadas por grupos de pesquisa que trabalham nessa área: (i) vacinas baseadas em mistura de plasmídeos, (ii) vacinas baseadas em politopos ou minigenes e (iii) vacinas que codificam proteínas híbridas.

Vacinas de DNA multivalentes baseadas em mistura de plasmídeos

Nesse tipo de estratégia, dois ou mais plasmídeos, cada um deles codificando para um antígeno específico, são combinados em uma única formulação (Figura 1). Animais inoculados com a mistura de plasmídeos desenvolveram resposta imunológica e/ou proteção tão eficientemente ou melhor do que aqueles indivíduos imunizados com apenas um plasmídeo que dirige a expressão de um único antígeno. Vacinas baseadas nessa metodologia podem empregar um mesmo tipo de vetor plasmidial ou plasmídeos diferentes, desde que estes sejam capazes de promover a expressão dos antígenos necessários à indução da resposta imunológica. Por exemplo, uma vacina de DNA composta por plasmídeos diferentes que codificavam para as proteínas ESAT-16, MPT-64, MPT-63 e KatG do *Mycobacterium tuberculosis*, resultou na indução de respostas imunológicas específicas a cada um dos antígenos em níveis semelhantes aos observados em animais imunizados com cada um dos plasmídeos isoladamente (Morris *et al.*, 2000).

Outro estudo baseado no vírus influenza mostrou que a mistura de dois plasmídeos, que codificavam para a hemaglutinina (HA) e a neuroaminidase (NA) virais conferiu maior proteção em camundongos do que aquela obtida com os mesmos plasmídeos aplicados isoladamente (Chen *et al.*, 1999). Além disso, a adição de um terceiro plasmídeo que codificava para outra proteína viral não interferiu nas respostas imunológicas obtidas para as proteínas HA e NA. Essas observações demonstram que vacinas de DNA multivalentes baseadas na mistura de plasmídeos podem ser feitas sem o comprometimento da resposta induzida por cada um dos antígenos codificados.

Entretanto, o uso de plasmídeos que

possuem promotores com atividade muito diferente pode acarretar diferença nas quantidades de antígenos e resultar em resposta imune induzida diferenciada frente aos respectivos antígenos codificados. A produção de um determinado antígeno sob o controle de um promotor forte pode gerar um quadro semelhante à competição antigênica em função do maior recrutamento de células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês antigen-presenting cells). Essa competição pelas APCs pode resultar em resposta imunológica maior e mais rápida em relação ao(s) antígeno(s) presente(s) em maior quantidade. Talvez um reflexo de um microambiente induzido pela produção de mediadores químicos da resposta imune (citocinas), que, por sua vez, influenciam a resposta imune tanto em magnitude (produção de anticorpos) como em população de linfócitos T ativados (padrão Th1/Th2). Tais desdobramentos indicam que as vacinas de DNA multivalentes baseadas em mistura de plasmídeos devem, sempre que possível, utilizar um mesmo plasmídeo para a construção das formas recombinantes, presentes na formulação final.

A inoculação de vacinas de DNA pode ser feita de várias maneiras: a biobalística emprega partículas de ouro revestidas com DNA introduzidas através da pele por gases sob pressão. O DNA pode ser encapsulado em partículas lipídicas (lipossomos) e administrado por via intranasal, ou, ainda, bactérias atenuadas, como *Salmonella* ou *Shigella*, que podem ser administradas por via oral e, após destruição por células fagocitárias, acabam por liberar o DNA, que conduzirá a expressão do antígeno pelas células do hospedeiro (Azevedo & Oliveira, 1997, Lásaro & Ferreira, 2000). No entanto, a inoculação intramuscular ainda representa a forma mais usual de aplicação de vacinas de DNA, tanto em animais como em humanos, e a quantidade mínima de DNA capaz de induzir resposta imune protetora representa uma grande preocupação para aqueles que trabalham no desenvolvimento de formulações multivalentes. A dose de DNA a ser inoculada não pode ser tão baixa a ponto de mostrar-se incapaz de induzir resposta imune no hospedeiro mamífero, nem tão alta a ponto de saturar a capacidade do indivíduo em responder ao estímulo, o que acarretaria desperdício do material vacinal. Alguns pesquisadores,



Figura 3: Estratégia baseada na expressão de proteínas híbridas. Genes que codificam para proteínas inteiras ou somente domínios imunologicamente importantes são clonados na mesma fase de leitura, em um único plasmídeo. Após a inoculação do plasmídeo no hospedeiro, a proteína híbrida é processada e apresentada ao sistema imune por moléculas de MHC

preocupados com essa questão, demonstraram que cobaias imunizadas com pequenas quantidades (13 µg) de uma mistura de plasmídeos que codificavam para glicoproteínas do vírus herpes simplex do tipo 2 (HSV-2), agente causador do herpes genital, obtiveram uma proteção tão boa quanto aquelas observadas em animais imunizados com doses maiores (McClements *et al.*, 1996). Estes resultados, assim como outros trabalhos baseados em diferentes vacinas de DNA, demonstram que formulações multivalentes podem ser aplicadas em quantidades relativamente pequenas sem o comprometimento das respostas imunológicas induzidas.

Vacinas de DNA multivalentes baseadas em minigenes

Vacinas de DNA multivalentes também podem ser geradas a partir da

construção de minigenes ou politopos. Essa estratégia consiste na utilização de oligonucleotídeos que, uma vez clonados em ordem contígua e no mesmo plasmídeo, codificam para epitopos derivados de antígenos oriundos de um ou mais patógenos (Figura 2). Uma vantagem inerente a essa estratégia é o fato de ser possível expressar epitopos específicos para linfócitos B, T ou citotóxicos e excluir seqüências não relevantes para gerar resposta imunológica, ou mesmo seqüências responsáveis pela indução de respostas cruzadas com antígenos do próprio indivíduo, o que poderia resultar em doença auto-imune.

Em um estudo baseado em uma vacina que continha dez epitopos oriundos de antígenos do vírus influenza, citomegalovírus murino, vírus da coriomeningite linfocitária, adenovírus e vírus Sendai, mostrou que essa estratégia é capaz de ativar resposta citotóxica e de memória até um ano após a imunização de camundongos (Thomson *et al.*, 1998). Em outro estudo, uma vacina de minigenes composta por seis epitopos específicos para linfócitos B, T citotóxicos e T auxiliares, derivados dos vírus da estomatite vesicular, sincicial respiratório, coriomeningite linfocitária, mungovírus e vírus Sendai, além de antígeno da bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, foi capaz de gerar resposta imunológica em todos os camundongos imunizados, sem indícios de competição antigênica. Além disso, os animais imunizados com a vacina de DNA multivalente desenvolveram resposta protetora para o mungovírus e o vírus da coriomeningite linfocitária (Ling Ling & Whitton, 1996).

Na estratégia de minigenes podem ser incorporados aminoácidos que atuam como espaçadores para os diferentes epitopos expressos pela vacina de DNA, de modo que lhe confira uma maior flexibilidade estrutural do produto e permita sua apresentação mais eficiente pelas APCs. Essa hipótese foi testada com plasmídeos que expressavam vários epitopos de diferentes proteínas do vírus do papiloma humano (HPV), o principal agente etiológico do câncer cervical uterino (Velders *et al.*, 2001). Tais plasmídeos diferiam entre si

quanto à presença de nucleotídeos que ladeavam os minigenes e codificavam para a seqüência de aminoácidos Ala-Ala-Tyr. A incorporação dessas seqüências espaçadoras melhorou o processamento e a apresentação dos epitopos pelas APCs, e aumentou a proteção conferida pela vacina de 50% para 100% dos animais imunizados quanto ao desenvolvimento de tumores ainda não estabelecidos. Para animais que já tinham um tumor estabelecido, a vacina com os minigenes e os espaçadores resultou na cura de 90% dos animais imunizados. Esses resultados atestam o potencial profilático e terapêutico das vacinas de DNA multivalentes e ressaltam a importância dessa estratégia vacinal, tanto para o controle de doenças infecciosas como para a erradicação de certos tipos de câncer.

No entanto, para que seja possível empregar a estratégia vacinal multivalente baseada em minigenes, é imprescindível que os diferentes epitopos tenham sido previamente definidos e caracterizados quanto ao seu potencial imunogênico. Além disso, o polimorfismo natural das populações humanas para moléculas do sistema de histocompatibilidade principal (MHC), responsável pela apresentação de epitopos processados na superfície de APCs, representa uma potencial limitação capaz de influir negativamente na eficácia dessas vacinas. Entretanto, essas dificuldades podem ser contornadas com a expressão de um maior número de epitopos ou pelo emprego de seqüências proteicas maiores que englobem vários epitopos.

Vacinas de DNA multivalentes baseadas em proteínas híbridas

Nessa estratégia, genes que codificam para proteínas inteiras, ou para domínios estruturais importantes, de um ou mais patógenos, são clonados em um único plasmídeo (Figura 3). Dessa forma, não há necessidade de localizar ou caracterizar os epitopos presentes e, dependendo da construção a ser feita, torna-se possível preservar, pelo menos em parte, epitopos não contíguos ou conformacionais. Nessas construções, a restrição imposta pela variabilidade natural do MHC é minimizada, pois, a partir de seqüências proteicas maiores, o processamento e a apresentação pelas APCs ocorrerá na grande maioria dos indivíduos imunizados.

Uma vacina de DNA multivalente capaz de conferir proteção contra diferentes sorotipos do vírus da raiva exemplifica a estratégia baseada na expressão de proteínas híbridas (Jallet *et al.*, 1999). Nesse trabalho, foram construídos plasmídeos capazes de codificar proteínas híbridas oriundas da fusão de diferentes regiões de proteínas G do envelope de diferentes sorotipos virais. Algumas dessas construções foram capazes de induzir respostas imunológicas contra as diferentes proteínas G e conferir proteção a vários sorotipos virais em camundongos imunizados.

Em nosso laboratório trabalhamos com um protótipo de vacina de DNA bivalente baseada na expressão de uma proteína híbrida, resultado da fusão da glicoproteína D (gD) do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e uma adesina fimbrial (CFA/D), responsável pela aderência ao epitélio intestinal humano da *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), um dos principais agentes causadores da diarreia dos viajantes. A estratégia empregada consistiu na substituição de uma seqüência central da proteína gD do HSV-1 pela seqüência do antígeno CFA/I de ETEC. A administração intramuscular dessa vacina de DNA bivalente em camundongos foi capaz de gerar anticorpos contra os dois antígenos (Figura 4). Experimentos adicionais indicaram que os anticorpos anti-gD gerados nos animais imunizados com a vacina bivalente foram capazes de bloquear a infecção viral enquanto os anticorpos contra a porção CFA/I reconheciam a proteína expressa pela ETEC. Além disso, a utilização dessa vacina bivalente em consórcio com uma outra vacina baseada em linhagem atenuada de *Salmonella*, capaz de expressar o antígeno CFA/I, ocasionou em marcante efeito sinérgico, tanto para a resposta de anticorpos sistêmicos, mas, sobretudo, para a resposta local, com a produção de anticorpos do isotipo IgA, específicos para o CFA/I, resposta essencial para uma efetiva proteção contra patógenos entéricos, como a ETEC (Lásaro & Ferreira, 2000). Esses resultados abrem perspectivas interessantes para o desenvolvimento de vacinas de DNA multivalentes contra patógenos que possuam estratégias de virulência distintas e exigem, portanto, a indução de uma ampla gama de respostas imunológicas.

Conclusões e perspectivas

O principal objetivo da pesquisa em



Figura 4: Resposta de anticorpos séricos em camundongos imunizados com vacina de DNA bivalente baseada na fusão da proteína gD de HSV-1 e a proteína CFA/I, de ETEC. O soro de animais imunizados com duas doses (100mg) da vacina por via intramuscular, foram testados em reações em que a proteína CFA/I, isolada de ETEC, ou a proteína gD, do HSV, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e, posteriormente, transferidas para membranas de nitrocelulose. A presença de bandas reativas, após a ligação dos anticorpos, foi demonstrada com o uso de anticorpos de coelho conjugados com a peroxidase, capazes de reconhecer imunoglobulinas de camundongos

vacinas é criar uma formulação multivalente ideal que seja segura mesmo para indivíduos imunocomprometidos, e capaz de induzir níveis de proteção elevados e duradouros contra um grande número de doenças infecciosas, em uma única dose. Embora a vacina ideal ainda não possa ser obtida com a tecnologia atualmente disponível, o impressionante avanço das pesquisas nesse campo, como a descoberta das vacinas de DNA, nos levam a crer que esse sonho está cada vez mais próximo da realidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Am, L.L. & Whitton, J.L. (1997) A multi-

valent minigene vaccine, containing B-cell, cytotoxic T-lymphocyte, and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen. **Journal of Virology** **71**:2292-2302.

Azevedo, V. & Oliveira, S.C. (1997) Vacinas de DNA. **Biotechnologia, Ciência & Desenvolvimento** **5**:40-43.

Chen, Z.; Matsuo, K.; Asanuma, H.; Takahashi, H.; Iwasaki, T.; Susuki, Y.; Aizawa, C.; Kurata, T. & Tamura, S. (1999) Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase- expressing DNAs. **Vaccine** **17**:653-659.

Jallet, C.; Jacob, Y.; Bahloul, C.; Drings, A.; Desmezieres, E.; Tordo, N. & Perrin, P. (1999) Chimeric Lyssavirus Glycoproteins with Increased Immunological Potential. **Journal of Virology** **73**:225-233.

Lásaro, M.O. & Ferreira, L.C.S. (2000). Vacinas contra diarreia. Novas perspectivas baseadas em vacinas de DNA. **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, **14**:28-32.

McClements, W. L.; Armstrong, M. E.; Keys, R. D. & Liu, M. A. (1996) Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**:11414-11420.

Morris, S.; Kelley, C.; Howard, A.; Li, Z & Collins, F. (2000) The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. **Vaccine** **18**:2155-2163.

Silva, CL. (1997) Vacinas Gênicas. **Biotechnologia, Ciência & Desenvolvimento** **3**:323-34

Thomson, S.A.; Sherritt, M.A.; Medveczky, J.; Elliott, S.L.; Moss, D.J.; Fernando, G.J. P.; Brown, L.E. & Suhrbier, A. (1998) Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. **Journal of Immunology** **160**:1717-1723.

Velders, M.P.; Weijzen, S.; Eiben, G.L.; Elmishad, A.G.; Kloetzel, P.M.; Higgins, T.; Ciccarelli, R.B.; Evans, M.; Man, S.; Smith, L. & Kast, W.M. (2001) Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. **Journal of Immunology** **166**:5366-5373.