

LEONEIDE ÉRICA MADURO BOUILLET

**DESENVOLVIMENTO DE VACINAS RECOMBINANTES
CONTRA MALÁRIA HUMANA E TESTE *IN VIVO* EM
MODELO MURINO**

ORIENTADOR: Prof. OSCAR BRUNA ROMERO

BELO HORIZONTE

MAIO 2009

LEONEIDE ÉRICA MADURO BOUILLET

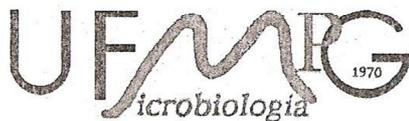
**DESENVOLVIMENTO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA
MALÁRIA HUMANA E TESTE *IN VIVO* EM MODELO MURINO**

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Microbiologia.

ORIENTADOR: Prof. OSCAR BRUNA ROMERO

BELO HORIZONTE

MAIO 2009



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNA: LEONEIDE ÉRICA MADURO BOUILLET

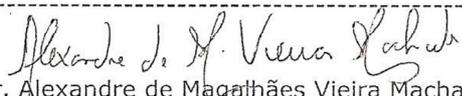
Nº matrícula: 2005234227

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL DOUTORADO

Defesa de Tese: 22 de maio de 2009

Título: "Desenvolvimento de Vacinas recombinantes contra malária humana e testes em modelos animais"

A Tese foi submetida à apreciação da Profa. Daniele da Glória de Souza que emitiu parecer favorável.


Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado
Examinador

Aprovada: *Sim*


Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto
Examinador

Aprovada: *SIM*


Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito
Examinadora

Aprovada: *Sim*


Dra. Daniele da Glória de Souza
Examinadora

Aprovada: *SIM*


Prof. Oscar Bruna-Romero
Orientador

Aprovada: *SIM*

Maria Aparecida de Resende
Profa. Maria Aparecida de Resende
Coordenadora

Trabalho realizado no Laboratório de Agentes Recombinantes do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, com auxílio financeiro:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
 - Bolsa de Doutorado/ 2005 – 2009.
- Fundação Oswaldo Cruz: projeto PDTIS - Vacinas para malária
- CNPq

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo nº 140/2005.

Foram feitos depósitos de patentes com os resultados deste projeto:

- INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)
 - A)** Número pedido: PI0706003-3 A2
Data depósito: 26/10/2007
Título: **Sequência geneticamente modificada do antígeno AMA-1 de *Plasmodium vivax*, proteína recombinante AMA-1 e adenovírus geneticamente modificado que expressa o antígeno AMA-1 recombinante.**
Inventores: BOUILLET, L. E. M., SOARES, I., GAZZINELLI, R. T., BRUNA-ROMERO, O.
Publicado em: Revista da Propriedade Industrial - RPI nº 2007 (23/06/2009), com retificação em RPI nº 2060 (29/06/2010)
 - B)** Número pedido: PI0705990-6 A2
Data depósito: 26/10/2007
Título: **Sequência geneticamente modificada do antígeno MSP-1, proteína recombinante MSP-1 e adenovírus geneticamente modificado que expressa o antígeno MSP-1.**
Inventores: BOUILLET, L.E.M., RODRIGUES, M.M., GAZZINELLI, R.T., BRUNA-ROMERO, O.
Publicado em: Revista da Propriedade Industrial - RPI nº 2007 (23/06/2009)
- World Intellectual Property Organization /Patent Cooperation Treaty – PCT
Número pedido: PCT/ BR 2009/000130
Data depósito: 05/05/2009
Título: **Genetically-modified sequences encoding Plasmodium vivax antigens, vaccine composition containing recombinant purified antigens and recombinant viruses that express those antigens and prime-boost vaccination protocol against Malaria.**
Inventores: BOUILLET, L. E. M., CASTELUBER, M. C. F., de ANDRADE, B P, BRITO, C. F. A., CARRARA, C.L, FONSECA, F. G., SOARES, I. S., M.M.RODRIGUES,, GAZZINELLI, R. T., BRUNA-ROMERO, O.
Publicado em: WIPO Número WO/2010/127420 (11/11/2010)

A minha mãe, Zuleide, obrigada pela educação e pelos valores
– peças fundamentais na construção do meu caráter – e por
sempre acreditar no meu potencial.
Com todo amor e gratidão.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança”.

Albert Eistein.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo carinho, incentivo e apoio constante, em especial a minha Mãe.

Agradeço ao Fabinho pelo apoio e companheirismo.

Ao meu orientador Oscar pela oportunidade de aprendizado, pelo apoio e valiosos ensinamentos que, além de me engrandecerem profissionalmente, me fizeram crescer como pessoa.

Agradeço as minhas estagiárias, Natália e Mariana, que na realidade são mais que estagiárias, são dois anjinhos na minha vida. Obrigada pela dedicação no estágio e principalmente pelo trabalho árduo. A ajuda de vocês foi imprescindível para o desenvolvimento desta tese.

Às minhas amigas meus sinceros agradecimentos pelos inestimáveis conselhos e risos constantes.

Às amigas do LAR, Bruninha, Cristina, Camila e Maria Rosa. Com a presença de vocês o nosso LAR ficava mais agradável.

Ao laboratório de Imunoparasitologia – Departamento de Bioquímica – ICB/UFMG pela utilização de suas instalações e pelo apoio durante o início deste projeto.

Ao João Rodrigues pelas dicas preciosas e pelo incansável apoio.

À Tânia Mara, que com seu jeito amigo e prestativo, sempre me ajudou nas horas difíceis.

À FIOCRUZ, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Vacinas que promovem a proteção contra a malária são urgentemente necessárias para o controle da doença. O antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) e o fragmento de 19kDa da proteína 1 de superfície de merozoíto (MSP-1₁₉) são os principais candidatos a vacina contra o estágio sanguíneo da malária devido a estudos de proteção encorajadores em animais e humanos. Neste estudo, nós investigamos o efeito de candidatos a vacinas contra *P.vivax* geneticamente modificados, PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉, em diferentes combinações de protocolos de imunizações do tipo dose-reforço. Com este objetivo foram construídos adenovírus recombinantes expressando PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉ para modular e ativar uma resposta celular efetiva. Além disso, os polipeptídeos equivalentes foram expressos em *E.coli*, purificados e utilizados para induzir resposta humoral. Após a caracterização dos antígenos vacinais, os vírus recombinantes e as proteínas formuladas com o adjuvante Montanide ISA 720 foram empregados na imunização de camundongos BALB/c. A vacinação com os protocolos de imunização Ad/Ad, Ad/prot, prot/prot e prot/Ad levou à produção de IgG anti- PvAMA-1 e anti-PvMSP-1₁₉ específica em todos os grupos vacinais. No entanto, os protocolos prot/prot e prot/Ad foram mais eficientes, produzindo elevados títulos de anticorpos, tanto para PvAMA-1 como para PvMSP-1₁₉. PvAMA-1 foi capaz de induzir a proliferação celular-antígeno específica, sendo que os protocolos Ad/Ad e prot/prot foram capazes de induzir maiores níveis de proliferação celular que os protocolos prot/Ad e Ad/prot. PvMSP-1₁₉ foi capaz de ativar resposta imune celular do tipo Th1, com elevados níveis de produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Além disso, foi capaz de induzir a produção de IL-10, mas não desencadeou a produção de IL-4. Desta forma, pode-se concluir que a vacinação com os protocolos de imunização do tipo dose-reforço prot/prot, prot/Ad foram melhores em induzir resposta humoral e celular, já o protocolo Ad/Ad induziu uma melhor resposta celular. Estes resultados são encorajadores para estudos pré-clínicos em macacos *Aotus* spp e sugere-se a utilização dos protocolos prot/prot, prot/Ad e Ad/Ad.

Palavras-chaves: Adenovírus humano sorotipo 5, vacinas recombinantes, malária, AMA-1, MSP-1₁₉

ABSTRACT

Vaccines that provide protection against malaria are urgently needed for disease control. Several studies have demonstrated that Apical membrane antigen-1 (AMA-1) and 19KDa fragment of merozoit surface protein (MSP-1₁₉) are the main vaccine candidates against blood stages of malaria due to their capacity to induce protection in humans and animals. In this study, we investigated the effect of *P. vivax* vaccine candidates genetically modified PvAMA-1 and PvMSP-1 in different combinations of prime-boost immunization protocols. With this aim we constructed recombinant adenoviruses expressing PvAMA-1 and PvMSP-1 to active and modulate an effective type of T-cell response. Equivalent recombinant polypeptides purified from *E.coli*-expressing bacteria were used to induce humoral response. After the characterization of vaccine antigens, BALB/c mice were immunized with virus and proteins formulated in Montanide ISA 720 adjuvant. The animals vaccinated with the following immunization protocols Ad/Ad, Ad/prot, prot/prot and prot/Ad generated specific anti-PvAMA-1 and anti-PvMSP-1₁₉ IgG antibodies. However, the prime-boost protocols prot/prot and prot/Ad efficiently enhanced antibodies response, showing high antibody titers to AMA-1 and MSP-1₁₉. PvAMA-1 was able to induce specific antigen-cellular proliferation and the protocols Ad/Ad and prot/prot were able to induce highest levels of cell proliferation. PvMSP-1₁₉ was able of elicited cell responses predominantly a Th1-biased, inducing higher levels of IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Furthermore, it was able to induce the production of IL-10 but not triggered the production of IL-4. In such way, we conclude that immunization with the prime-boost protocols prot/prot and prot/Ad induced efficient humoral and cellular immune response. In the other hand, Ad/Ad elicited efficient cellular immune response. These results are encouraging for preclinical studies in monkeys *Aotus* spp using the following three protocols prot/prot, prot/Ad and Ad/Ad.

Key words: Human adenovirus serotype 5, recombinant vaccines, malaria, AMA-1, MSP-1₁₉