

MARIANA OLIVEIRA DIAS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO VACINAL
EXPERIMENTAL CONTENDO PEPTÍDEOS MULTI-SOROTIPO
DO VÍRUS DA DENGUE INCLUÍDOS EM PARTÍCULAS
PSEUDOVIRAIS QUIMÉRICAS (VLPs) DO VÍRUS DA HEPATITE
B, E TESTE EM MURINOS**

ORIENTADOR: Dr. OSCAR BRUNA ROMERO

ORIENTADOR HONORIS CAUSA: Dr. DANIEL SANTOS MANSUR

CO-ORIENTADORES: Dra. LEONEIDE ÉRICA MADURO BOUILLET

Dr. RICARDO TOSHIO FUJIWARA

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO 2013

MARIANA OLIVEIRA DIAS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO VACINAL
EXPERIMENTAL CONTENDO PEPTÍDEOS MULTI-SOROTIPO DO
VÍRUS DA DENGUE INCLUÍDOS EM PARTÍCULAS PSEUDOVIRAIS
QUIMÉRICAS (VLPs) DO VÍRUS DA HEPATITE B, E TESTE EM
MURINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

ORIENTADOR: Dr. OSCAR BRUÑA-ROMERO

ORIENTADOR HONORIS CAUSA: Dr. DANIEL SANTOS MANSUR

CO-ORIENTADORES: Dra. LEONEIDE ÉRICA MADURO BOUILLET

Dr. RICARDO TOSHIO FUJIWARA

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos de minha família, especialmente meus pais e irmãos pelo incentivo constante, compreensão, dedicação e carinho diários.

Agradeço ao Gui por todos os momentos de apoio.

Ao meu orientador Oscar pelos ensinamentos diários que me fizeram amadurecer profissionalmente.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório, que hoje se tornaram meus amigos que quero levar para toda vida. Obrigada Ana Paula, Dulcilene, Rodrigo, Hortência, Roberta, Ronaldo, Isabelle, Mara Camila, Carol e todos os outros que muito me ajudaram no mestrado.

Ao Laboratório de Imunobiologia - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) - CCB/UFSC, especialmente o professor Daniel Mansur, Paula Santos e Renata Fleith pela ajuda e receptividade quando estive em Florianópolis. Sem vocês esse mestrado não teria sido realizado.

Aos meus amigos e amigas de infância e aqueles que adquiri na graduação que sempre estiveram presentes nos momentos bons e ruins.

Agradeço especialmente às minhas amigas Leoneide e Tânia, pelos ensinamentos, ajudas e lições de vida.

À CAPES e GSK pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Dengue é a doença viral infecciosa humana transmitida por artrópode de maior relevância mundial. O vírus da Dengue (DENV) é responsável por causar cerca de 50 a 100 milhões de casos anualmente e cerca de 500 mil casos das formas mais graves da doença. Apesar de alto impacto na saúde pública, as medidas profiláticas se baseiam no controle do vetor, e não existe tratamento específico da doença, fazendo com que o desenvolvimento de uma vacina, seja uma prioridade. Um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue é que o DENV pode pertencer a quatro sorotipos (DENV-1, 2, 3 e 4) e a resposta imune induzida após infecção com um sorotipo pode não proteger, e ainda ser prejudicial, caso aconteça uma infecção por outro sorotipo. Este trabalho propôs a construção de candidatos vacinais tetravalentes baseados em dois peptídeos, conservados nos quatro sorotipos de DENV, e que representam regiões da proteína E (alvo dos anticorpos neutralizantes da infecção). Estes peptídeos foram fusionados no *loop* da proteína do core do vírus da Hepatite B (HBcAg), com a intenção de gerar partículas pseudovirais (VLPs) quiméricas que intensificassem a resposta imune. As proteínas recombinantes (HBcAg-Pep1 e HBcAg-Pep2) foram construídas em sistemas procariotos, purificadas e foram utilizadas como imunógenos vacinais separadamente ou em conjunto em camundongos C57BL/6, em protocolos do tipo dose-reforço associadas ao adjuvante Montanide ISA720. Após a primeira dose, ambas proteínas se apresentaram imunogênicas, com destaque para a HBcAg-Pep2. A segunda dose, no entanto, intensificou a resposta imune humoral de todos os protocolos vacinais. No grupo que recebeu a HBcAg-Pep2, os anticorpos específicos contra essa proteína alcançaram títulos de 1/102400, sendo que os anticorpos tipo-específicos induzidos pela HBcAg-Pep1 tiveram o título de 1/12800. Em breve serão realizados os testes funcionais das respostas imunes induzidas, incluindo ensaios de soroneutralização e de proteção contra um desafio com vírus vivo.

Palavras-chave: Dengue, formulação vacinal multi-sorotipo, proteína E, HBcAg protocolo dose-reforço

ABSTRACT

Dengue is the most relevant arthropod-borne human viral infectious disease worldwide. Dengue virus (DENV) is responsible for 50 to 100 million cases per year of the disease and 500.000 cases of the most severe forms (sometimes life-threatening) of the disease. Despite the high impact in public health, prophylactic measures are still based in controlling the mosquito vector, without any specific treatment developed to date. A vaccine is thus a priority. One of the main obstacles for developing a vaccine against dengue is the co-existence of four viral serotypes (DENV-1, 2, 3 e 4), which do not cross-protect against each other and can even act as disease-enhancers in case of an infection by a different viral serotype. In this study we have tried to develop a multivalent vaccine candidate based in two highly-conserved peptides from the sequence of the E protein (target of the virus-neutralizing antibodies). These peptides were fused to the external *loop* of the hepatitis B virus core protein (HBcAg) in an attempt to generate hepatitis B viral-like particles (VLPs) that could intensify the anti-DENV immune responses. Bacteria-produced recombinant proteins (HBcAg-Pep1 e HBcAg-Pep2) were purified and administered in Montanide ISA720 adjuvant individually or together as immunogens for C57BL/6. After the first dose, both proteins were immunogenic, in particular HBcAg-Pep2. The second dose *Boosted* all immune responses, and groups that received HBcAg-Pep2 reached antibody titers of 1/102400, while HBcAg-Pep1 inoculated animals displayed titers of 1/12800. Regarding those animals that received HBcAg-Pep1+2 immunogens together, antibody titers reached 1/25600 and 1/1600 respectively for each immunogen. Those are promising results when considering the need of inducing high levels of antibodies to neutralize DENV. The key point now is to determine the levels of neutralizing antibodies that are present in those animals as well as their capacity to protect the animals against a challenge with live DENVs.

Key words: Dengue, multivalente vaccine formulation, E-protein, HBcAg, prime-boost protocol.