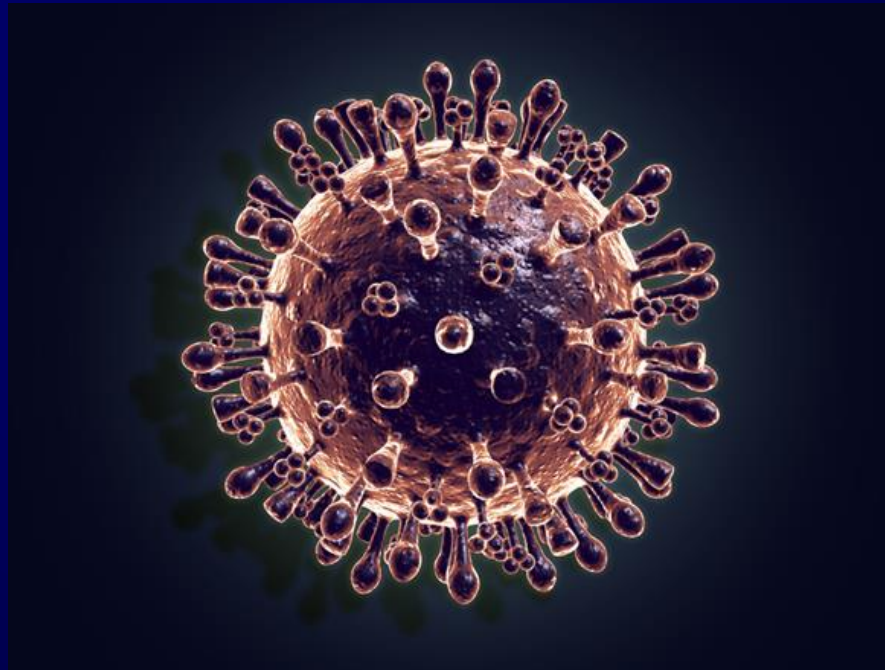
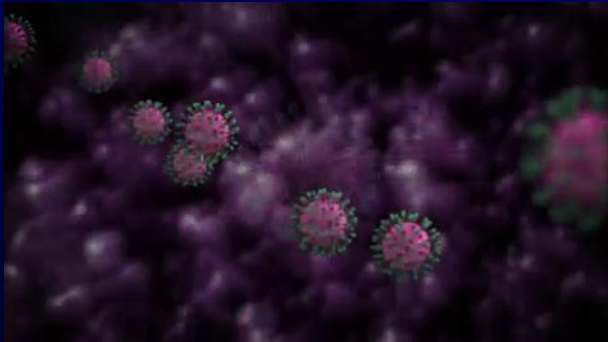
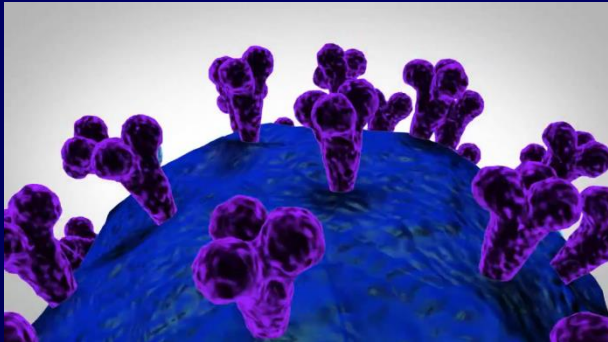


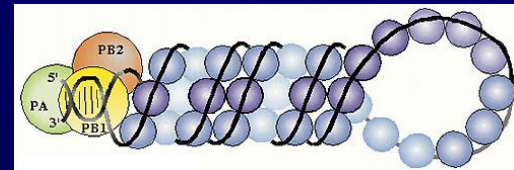
# VÍRUS INFLUENZA RECOMBINANTES PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS



# OS VÍRUS INFLUENZA A

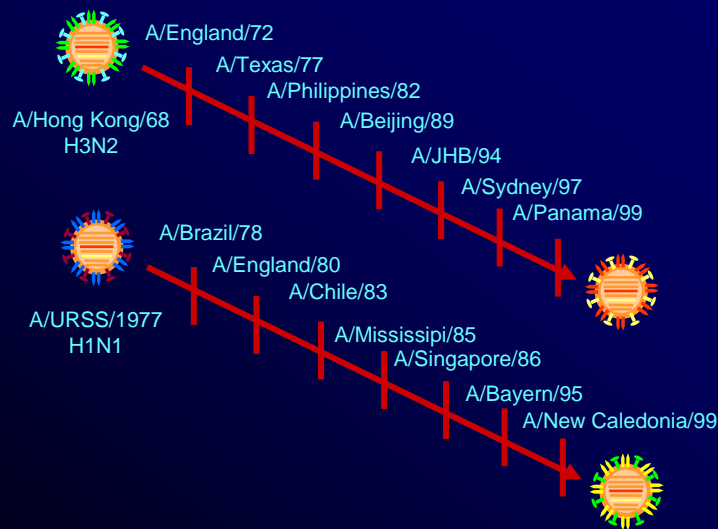
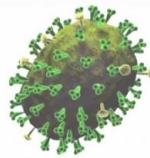


- Vírus envelopado de forma esférica ou filamentosa.
- Duas glicoproteínas estão presentes na superfície da partícula viral: a hemaglutinina e a neuraminidase.
- A HA e a NA são os principais determinantes antigênicos e os principais alvos dos anticorpos neutralizantes.
- Os vírus influenza do tipo A se dividem em diferentes subtipos.
- Já foram identificados 18 tipos de HA e 11 tipos de NA
- O genoma viral é constituído de 8 segmentos de RNA fita simples e polaridade negativa (ARNv).



# UM VÍRUS EM CONSTANTE EVOLUÇÃO DERIVA ANTIGÊNICA

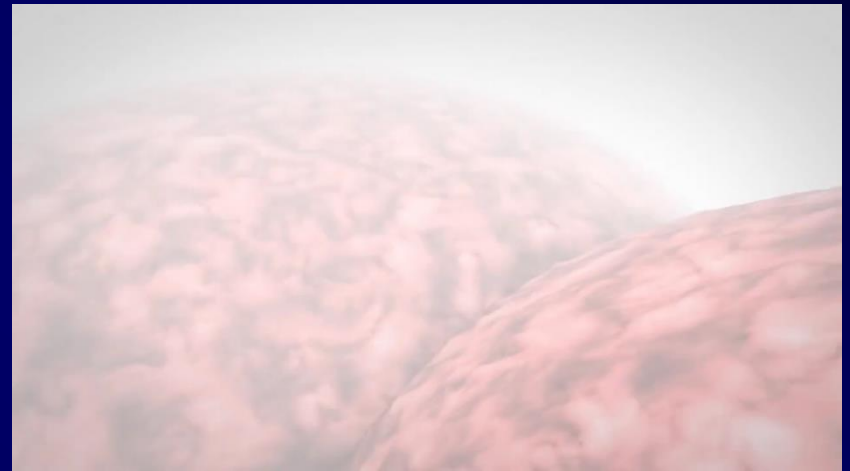
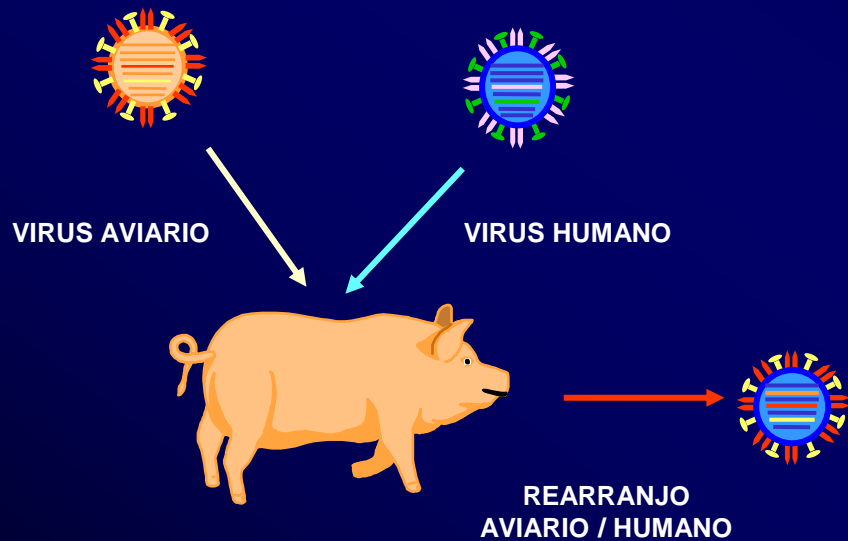
Influenza: *Antigenic Drift*



- Modificações genéticas em vírus de um mesmo subtipo.
- Ocasionadas por mutações pontuais nos genes da hemaglutinina e da neuraminidase.
- Resultam em modificações antigênicas.
- Os anticorpos gerados por infecções prévias ou pela vacinação conferem proteção incompleta.
- Podem ocasionar epidemias de influenza.

# UM VÍRUS EM CONSTANTE EVOLUÇÃO

## REARRANJO GÊNICO

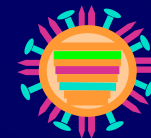


1957 H2N2



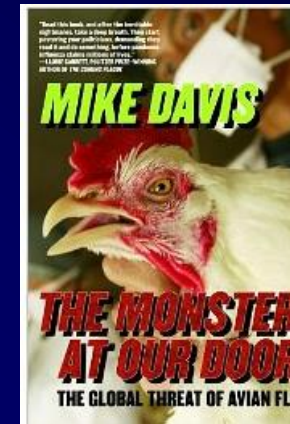
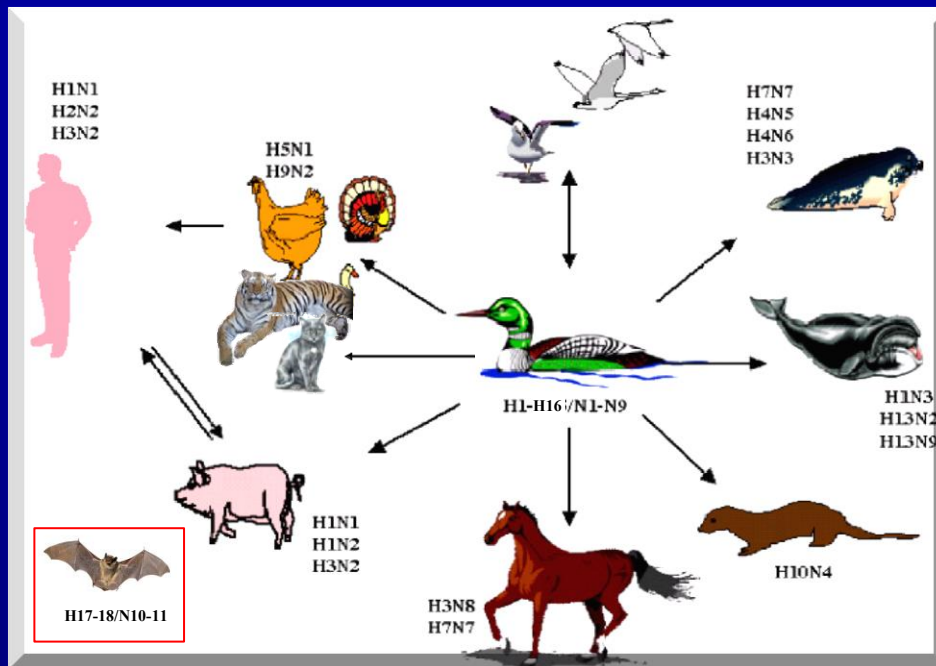
PB1  
H2  
N2

1968 H3N2



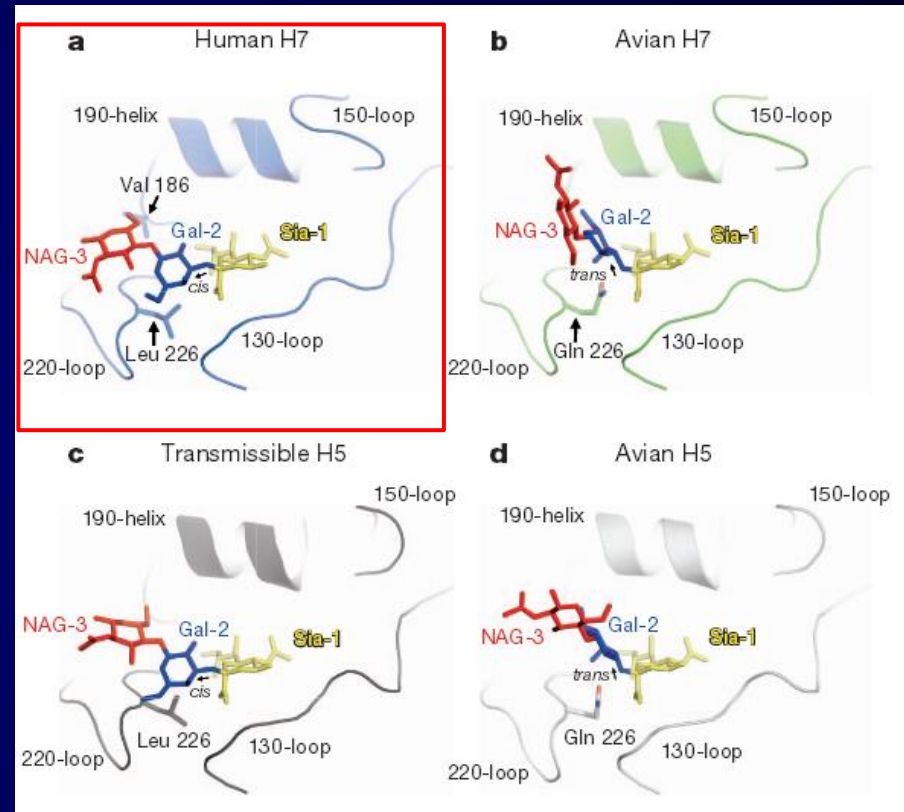
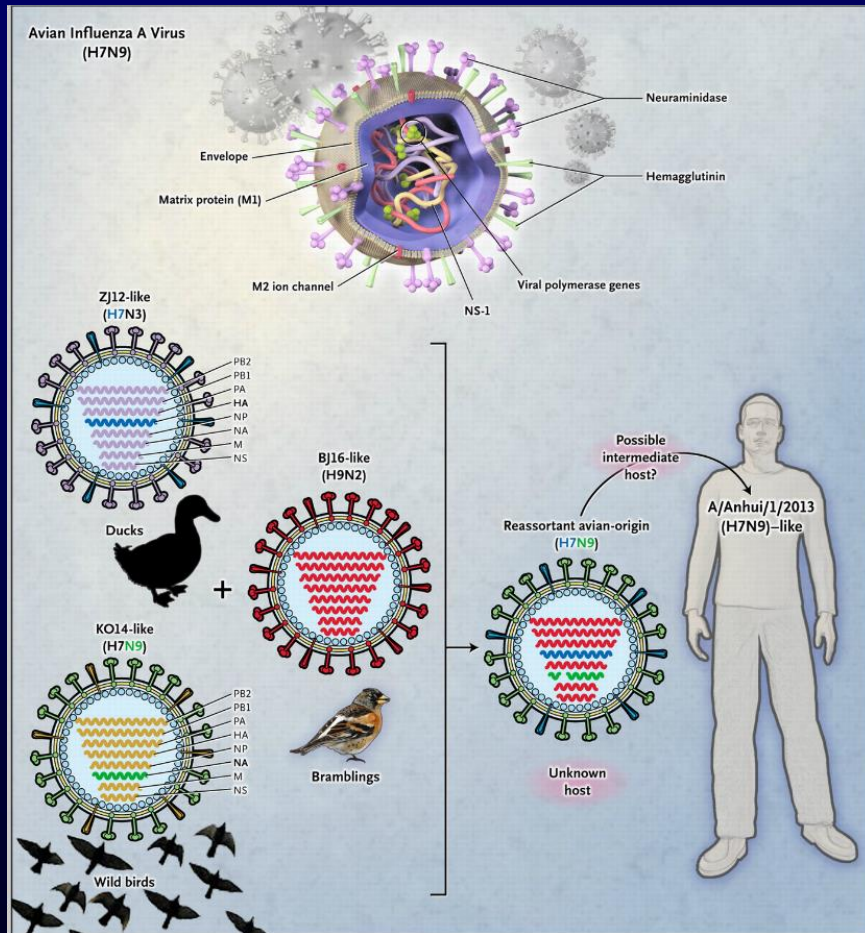
PB1  
H3

# A TRANSMISSÃO INTER-ESPÉCIES E A AMEAÇA DO APARECIMENTO DE VÍRUS PANDÊMICOS





# A ASCENÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA H7N9

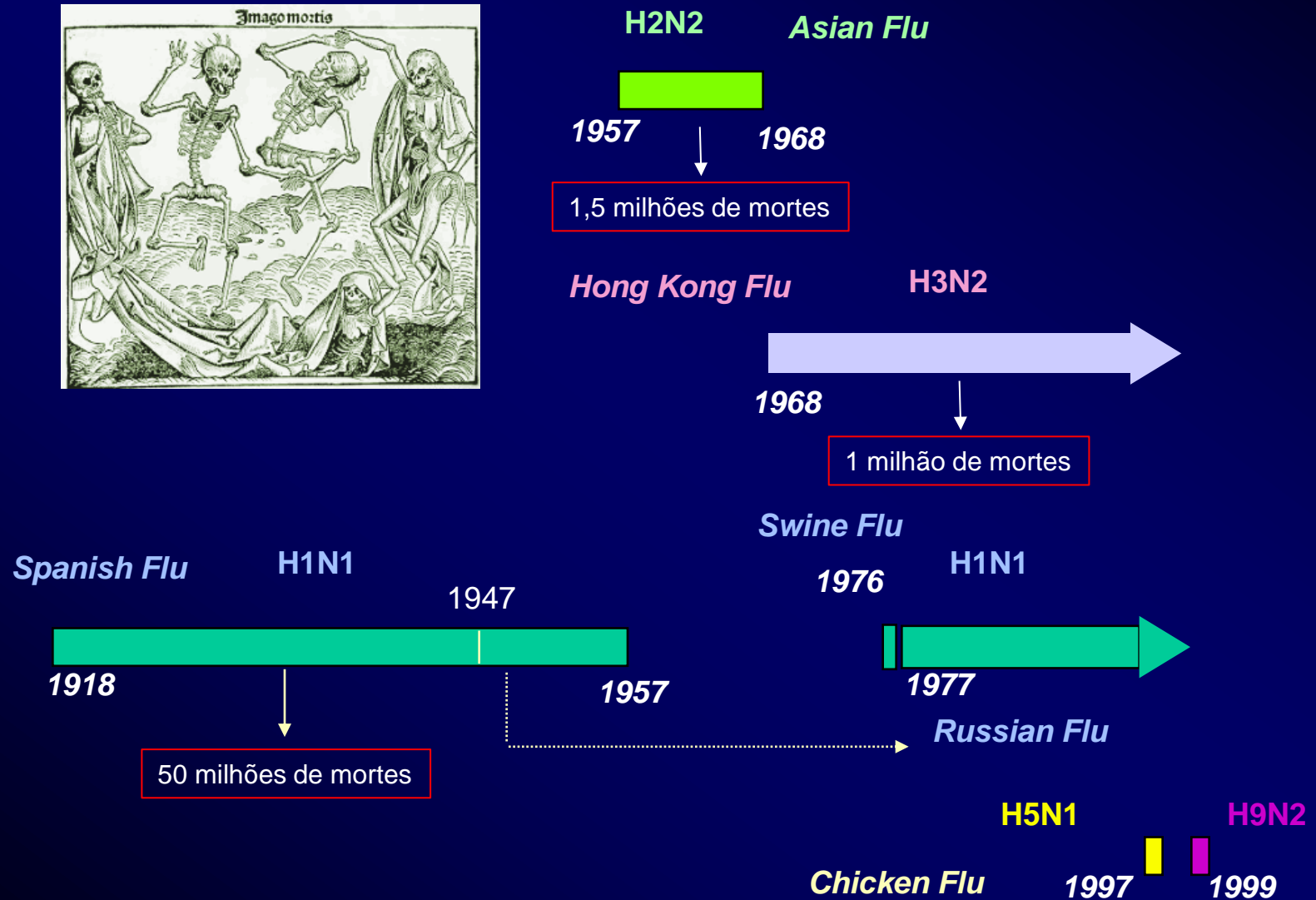


# O IMPACTO DA GRIPE SAZONAL

- A gripe sazonal atinge entre 25-50 milhões de pessoas por ano, somente nos Estados Unidos.
- Resulta em cerca de 150.000 hospitalizações por ano nos EUA.
- Causa entre 30-40 mil mortes por ano nos EUA
- No mundo estima-se:
  - 1 bilhão de casos de gripe sazonal por ano.
  - 3-5 milhões de casos de gripe severa
  - 300-500 mil mortes por ano
- Em países em desenvolvimento, a gripe atinge anualmente cerca de 10-20% da população.
- A gripe resulta em importante impacto sócio-econômico (internações, atendimento ambulatorial, absenteísmo no trabalho).
- As manifestações mais graves normalmente atingem as crianças muito novas, idosos e pacientes com determinadas doenças crônicas.



# PANDEMIAS DE GRIPE NO SÉCULO XX





# IMPACTO DE UMA PANDEMIA DE INFLUENZA

## Possíveis impactos econômicos de uma pandemia de influenza

	Branda	Moderada	Grave
<hr/>			
% de queda do PIB			
Mundial	-0,7	-2,0	-4,8
Alta Renda	-0,7	-2,0	-4,7
Em desenvolvimento	-0,6	-2,1	-5,3
Ásia do leste	-0,8	-3,5	-8,7
Europa e Ásia Central	-2,1	-4,8	-9,9
Oriente Médio e África do Norte	-0,7	-2,8	-7,0
Sul da Ásia	-0,6	-2,1	-4,9
Mortes (milhões)	1,4	14,2	71,1

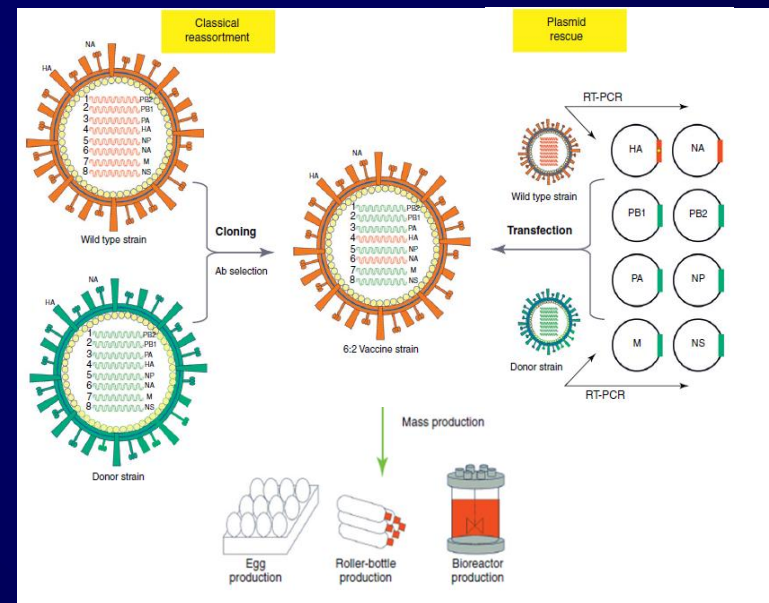
Fonte: Banco Mundial. Cálculos baseados em McKibbin & Sidorenko (2006)

**Custo global da pandemia:** cerca de 1,5 a 3 trilhões de dólares.

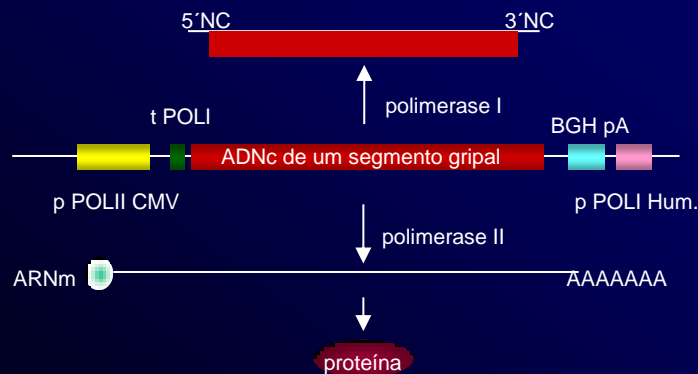
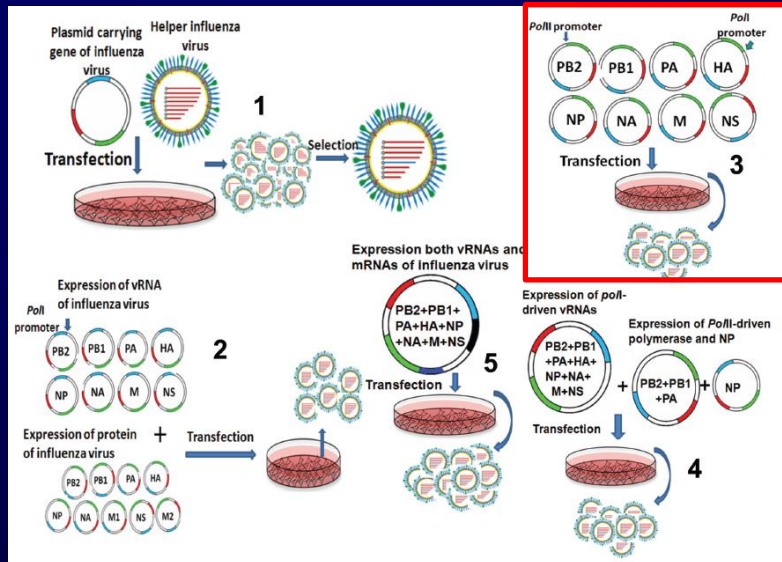
# VACINAS CONTRA O VÍRUS INFLUENZA

- Vacinas trivalentes: influenza A (H1N1 e H3N2) e influenza B.
- Vacinas com vírus inativados.
- Administradas por via intramuscular.
  - Vírus inteiro
  - Vacina subunitárias:
    - Vacinas com partículas rompidas
    - Vacinas com antígenos purificados

- Vacinas com vírus atenuados
- Administradas por via intranasal.
  - Cepa Maasab (genes internos A/Arbor/66 proteínas de superfície da cepa circulante).
  - Cepa A/Leningrad/73



# A GENÉTICA REVERSA DO VÍRUS INFLUENZA

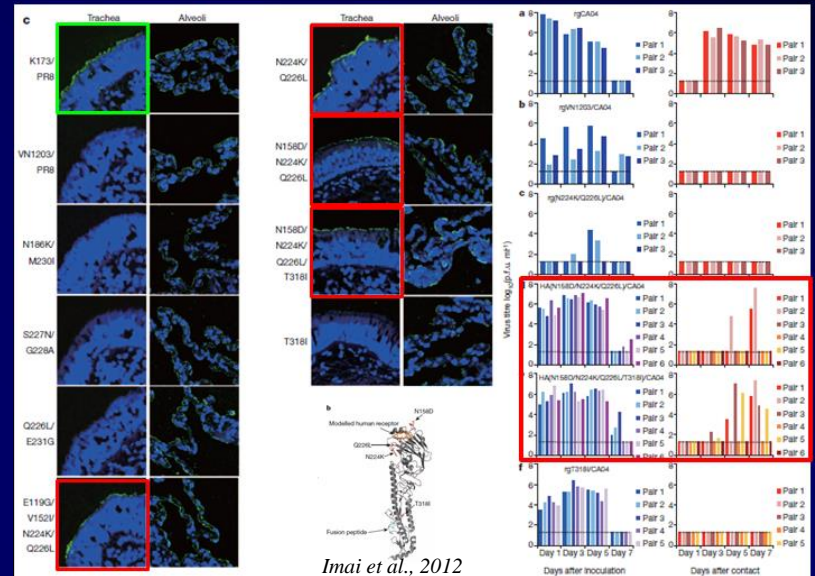


**Table 1.** Evolution of influenza virus reverse genetics

Year	Milestone	Helper Virus	Plasmids
1994 <sup>19</sup>	RNA pol I is manipulated to transcribe influenza viral RNA	Yes	
1999 <sup>20</sup>	Viruses are generated entirely from cloned cDNA encoding 8 genes	No	17
1999 <sup>22</sup>	Reduction in plasmid number leads to higher efficiency transfections and increased viral titers	No	12
2000 <sup>23</sup>	Introduction of RNA pol I/II system for influenza virus reverse genetics	No	8
2005 <sup>24</sup>	Three-plasmid system: 1) vRNA-transcription units, 2) polymerase proteins, and 3) NP	No	3
2009 <sup>25</sup>	One-plasmid system produces high titers in chicken cells	No	1

# UMA FERRAMENTA PODEROSA

- Aplicações da genética reversa:
- Estudos de determinantes moleculares de atenuação e virulência do vírus influenza
- Paleovirologia
- Desenvolvimento de vacinas contra a gripe sazonal
- Desenvolvimento de vacinas contra a gripe pandêmica
- Desenvolvimento de vetores virais influenza

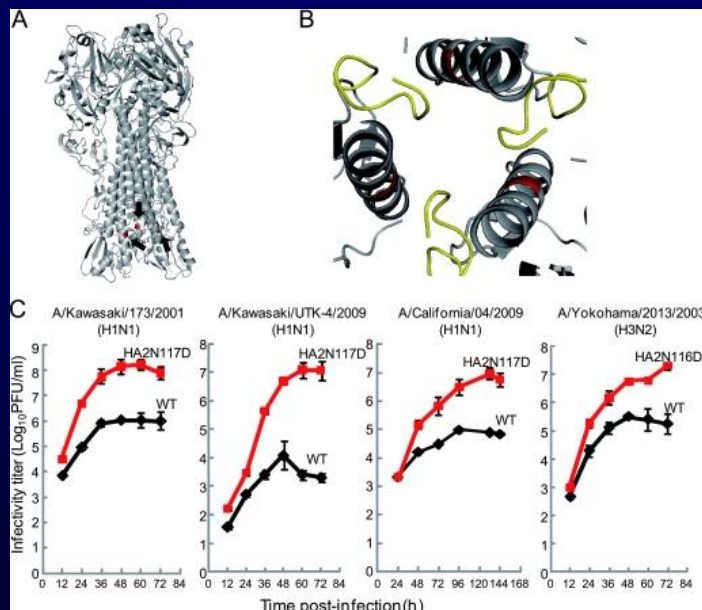


# DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA A GRIPE SAZONAL

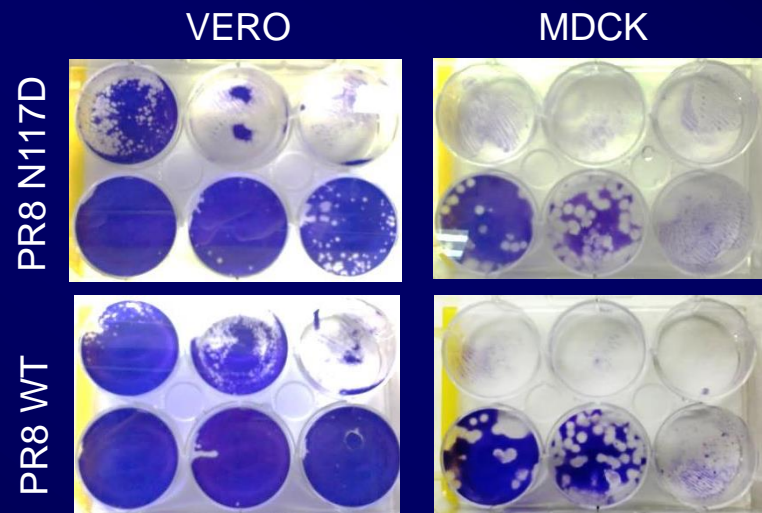
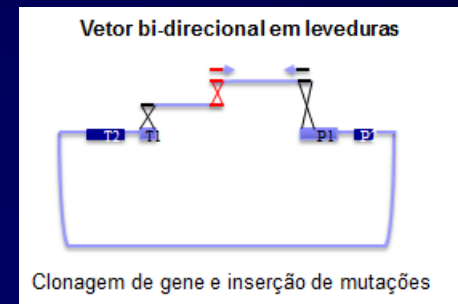


# GENÉTICA REVERSA PARA A PRODUÇÃO DE VACINAS CONTRA A GRIPE SAZONAL

Introdução de mutações pontuais que aumentem a multiplicação dos vírus recombinantes em células



*Murakami et al., 2012, J. Virol., 1405*



Resultados – Dra Laura Gil CPqAM

# DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA A VÍRUS INFLUENZA PANDÊMICOS

# VANTAGENS DA GENÉTICA REVERSA NA PRODUÇÃO DE VACINAS CONTRA VÍRUS INFLUENZA PANDÊMICOS

- Eliminação da necessidade de se manipular cepas altamente patogênicas do vírus .
- Possibilidade de se introduzir modificações no genoma viral capazes de conferir atenuação.
- Abordagem racional para o desenvolvimento de uma vacina, eliminando assim os possíveis rearranjos não desejados.
- Eliminação da contaminação com vírus selvagem.
- Possibilidade de se eliminar os ovos embrionados para a produção de vacinas.
- Maior rapidez para o desenvolvimento e produção da vacina.
- Ex: Desenvolvimento de vacina para o vírus H5N1
- Vacina inativada obtido pelo método tradicional - 8 meses após o isolamento do vírus
- Vacina inativada obtida por genética reversa - 4 semanas após o isolamento do vírus

# VACINAS CONTRA VÍRUS INFLUENZA PRODUZIDAS POR GENÉTICA REVERSA

**Table 1. Regulatory status of major manufacturers' prototype pandemic vaccine.**

Company	Strains	Regulatory status
GlaxoSmithKline Biologicals	H9N2 and H2N2	Submitted to EMEA (December 2005)
	H5N1 (whole plus alum)	EU approval (March 2007)
	H5N1 (split plus AS03)	EU approval (May 2008)
Novartis V&D	H9N2 and H5N3 (surface antigen plus MF59)	Submitted to EMEA
	H5N1 (surface antigen plus MF59)	EU approval (2007)
CSL Limited	H5N1 (split plus alum)	TGA approval (June 2008)
Baxter	H5N1 (whole, no adjuvant, cell culture)	EU approval (March 2009)
sanofi pasteur	H5N1 (split, no adjuvant)	FDA approval (April 2007)
	H5N1 (split plus alum)	Submitted to EMEA (May 2007)
Sinovac	H5N1 (whole plus alum)	China SFDA approval (April 2008)
Biken	H5N1 (whole plus alum)	MHLW approval (October 2007)
Kitasato Institute	H5N1 (whole plus alum)	MHLW approval (October 2007)
Kaketsuken	H5N1 (whole plus alum)	Submitted to MHLW (April 2008)
Denka Seiken	H5N1 (whole plus alum)	Submitted to MHLW (January 2007)

Note: GlaxoSmithKline and Novartis undertook earlier work on H9N2/H2N2/H5N3 strains as indicated, in addition to subsequent H5N1 studies.  
CHMP: Committee for medicinal products for human use; MHLW: Ministry of Health, Labor and Welfare; SFDA: State food and drug administration; TGA: Therapeutic goods administration.

**26 September 2013**

Parent virus	Candidate vaccine virus	Type of virus or reassortant	Developing institute	Available from
A/Shanghai/2/2013 Synthetic HA&NA	IDCDC-RG32A*	Reverse genetics	CDC, USA	CDC, USA
	NIBRG-267*	Reverse genetics	NIBSC, UK	NIBSC, UK
	CBER-RG4A*	Reverse genetics	CBER, USA	CBER, USA
A/Anhui/1/2013	Wild type virus			WHO CCs
	NIBRG-268*	Reverse genetics	NIBSC, UK	NIBSC, UK
	NIIDRG-10.1*	Reverse genetics	NIID, Japan	NIID, Japan
	IDCDC-RG33A**	Reverse genetics	CDC, USA	CDC, USA

# PROJETO VACINA INFLUENZA PANDÊMICA FIOCRUZ

- OBJETIVO:

- Estabelecer a tecnologia para a produção de vírus influenza pandêmicos em cultura de células utilizando a técnica de genética reversa.

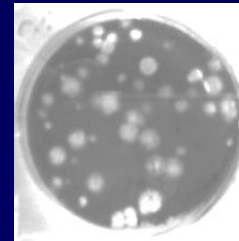
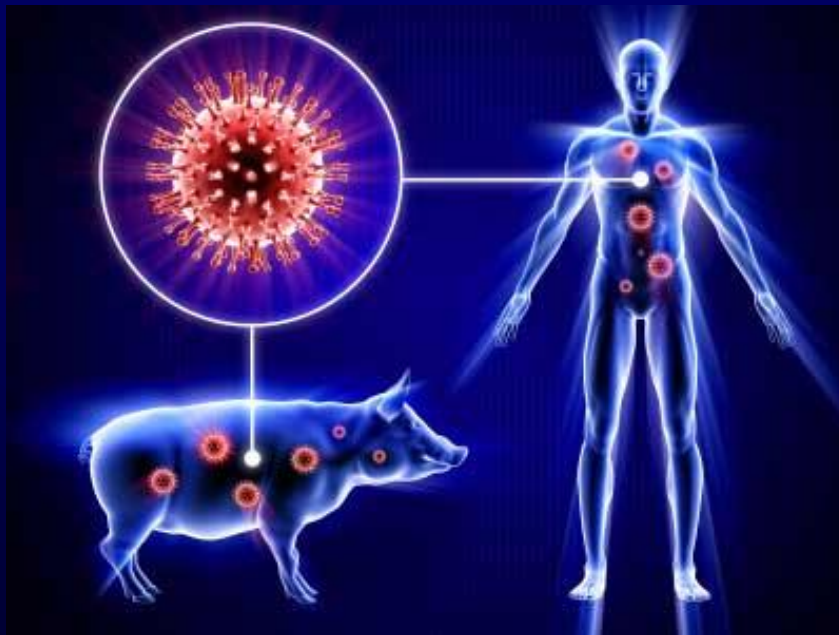


- Parceria entre Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ-MG), Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), Instituto Oswaldo Cruz, Biomanguinhos (FIOCRUZ-RJ).

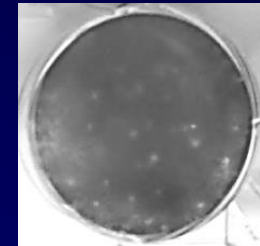




# GENÉTICA REVERSA PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINA CONTRA A GRIPE PANDÊMICA



WT 828

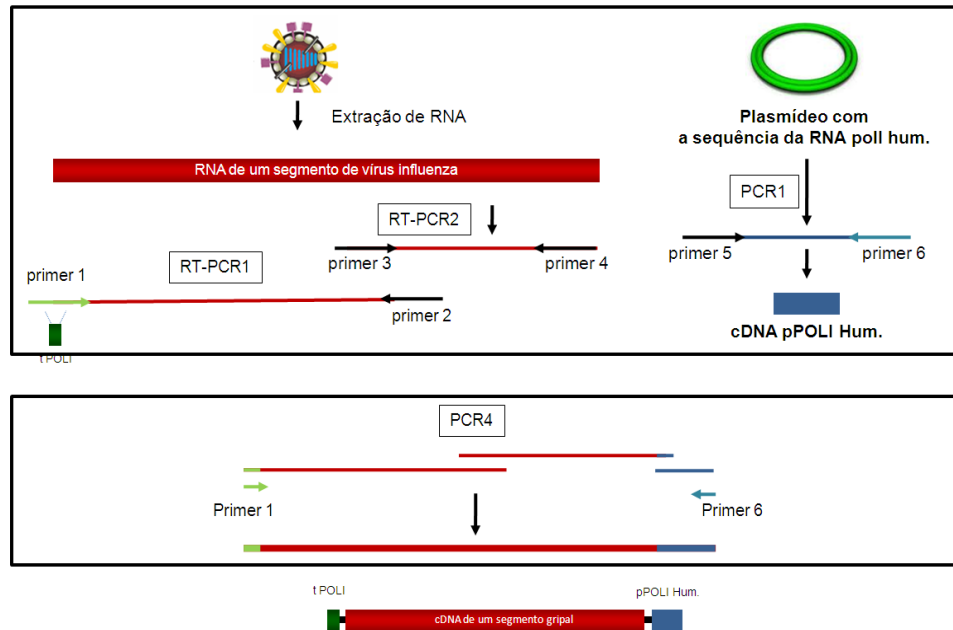


gn828

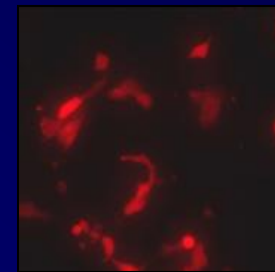


PR8

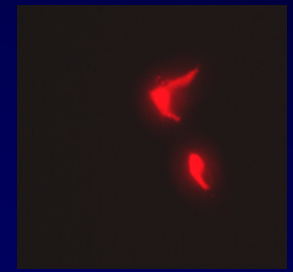
# BIOLOGIA SINTÉTICA PARA A CONSTRUÇÃO DE VÍRUS INFLUENZA RECOMBINANTES



Chen et al., PLoS One. 2012;7(9):e46378



PLASMÍDEO

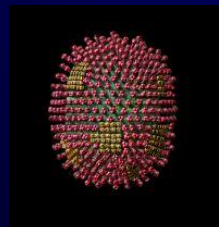
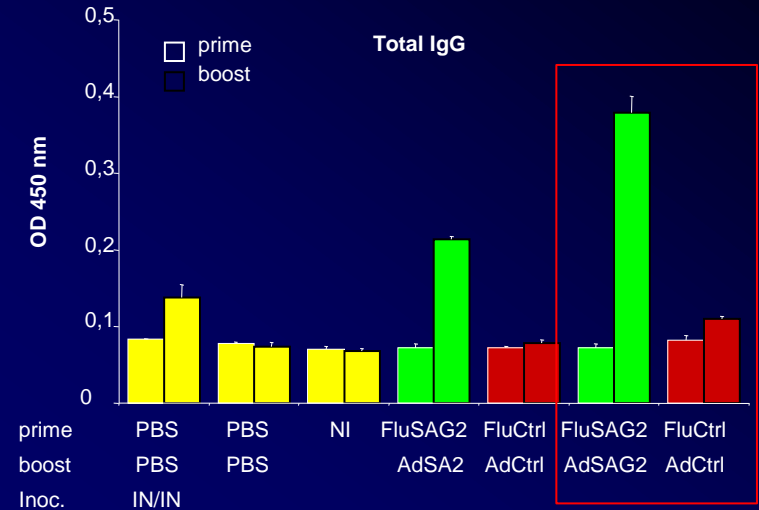
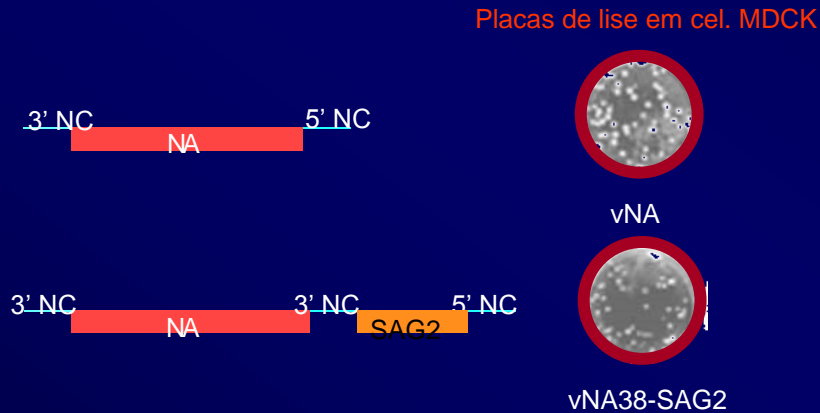


PRODUTO DE  
PCR

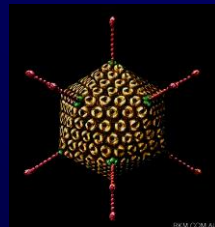
- Esta estratégia permite a construção de um vírus influenza recombinante em menos de 48 após a recepção da amostra viral.
- Estratégia para rápida introdução de mutações no genoma viral.

# DESENVOLVIMENTO VÍRUS INFLUENZA RECOMBINANTES

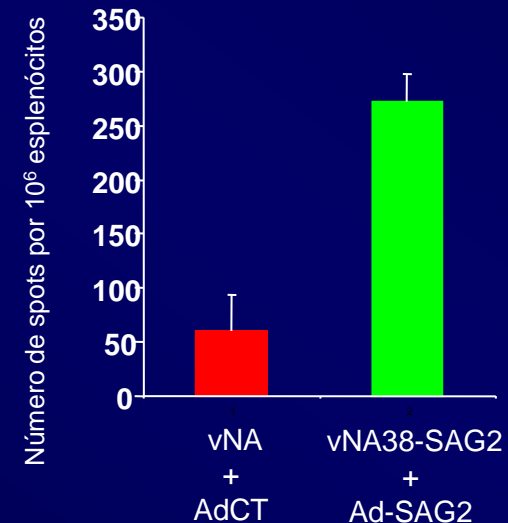
# VÍRUS RECOMBINANTES EXPRESSANDO O ANTÍGENO SAG 2 COMO VACINAS PARA TOXOPLASMOSE



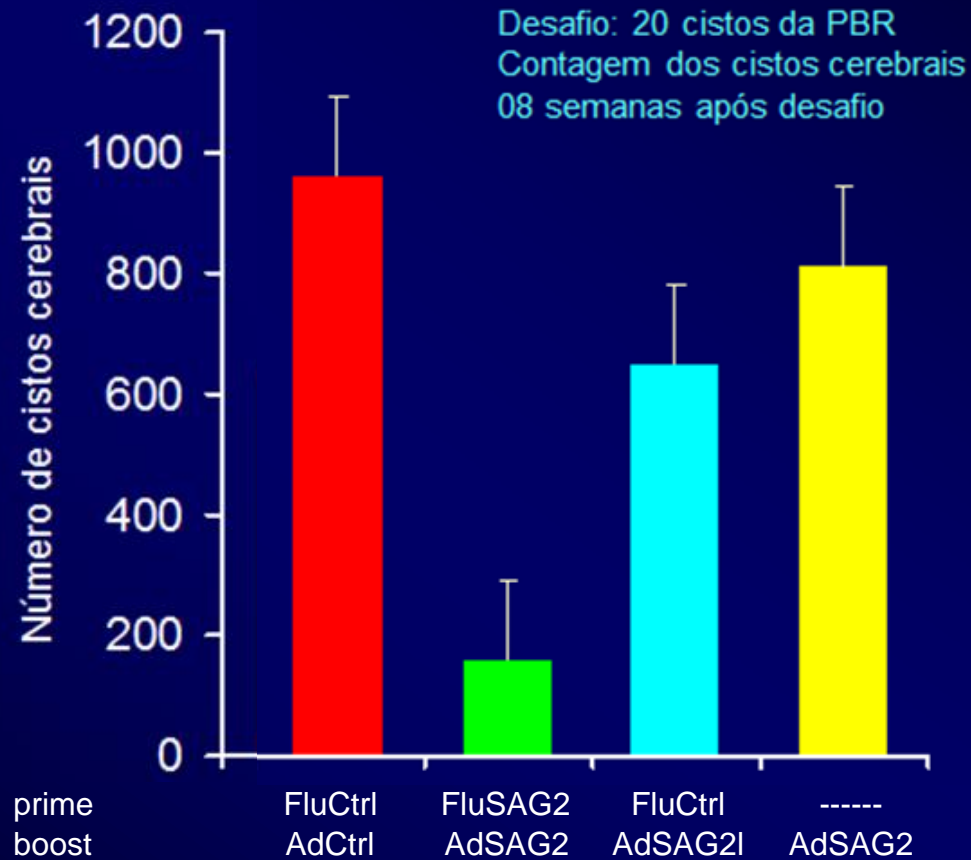
Vírus influenza  
(prime – via IN)



Adenovírus  
(Boost via SC)

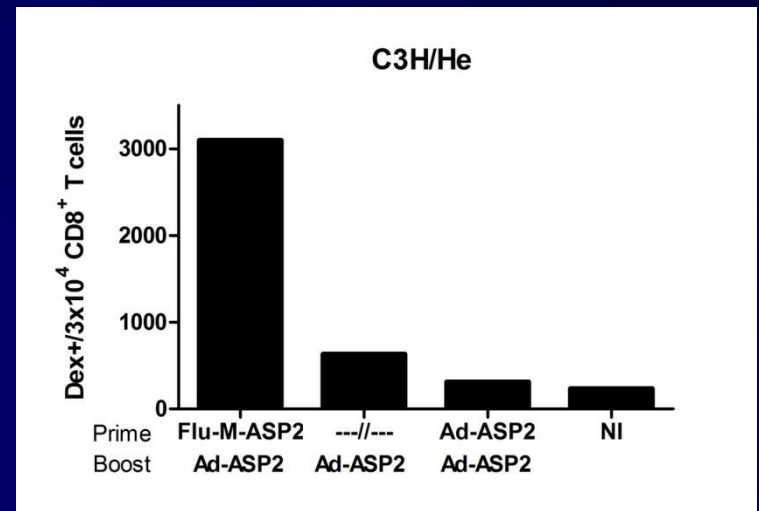
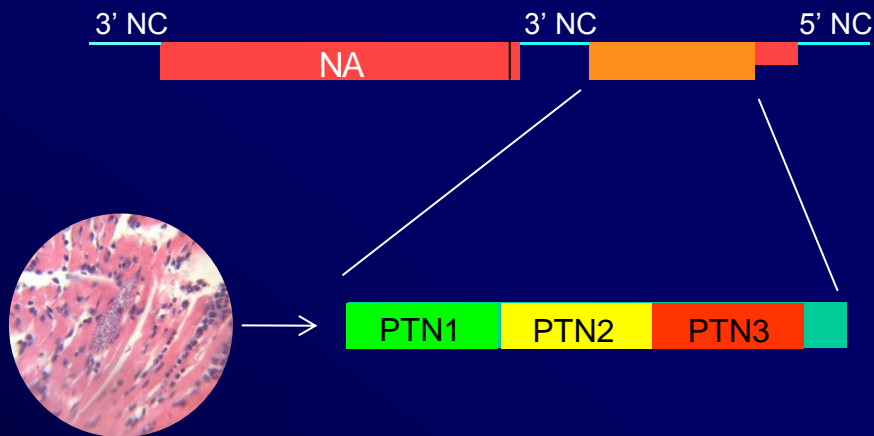


# INFECÇÃO EXPERIMENTAL DOS ANIMAIS IMUNIZADOS



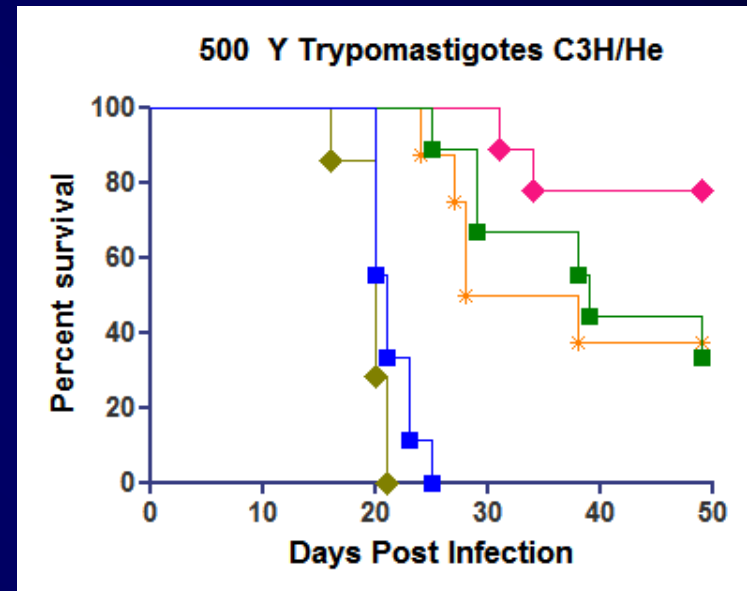
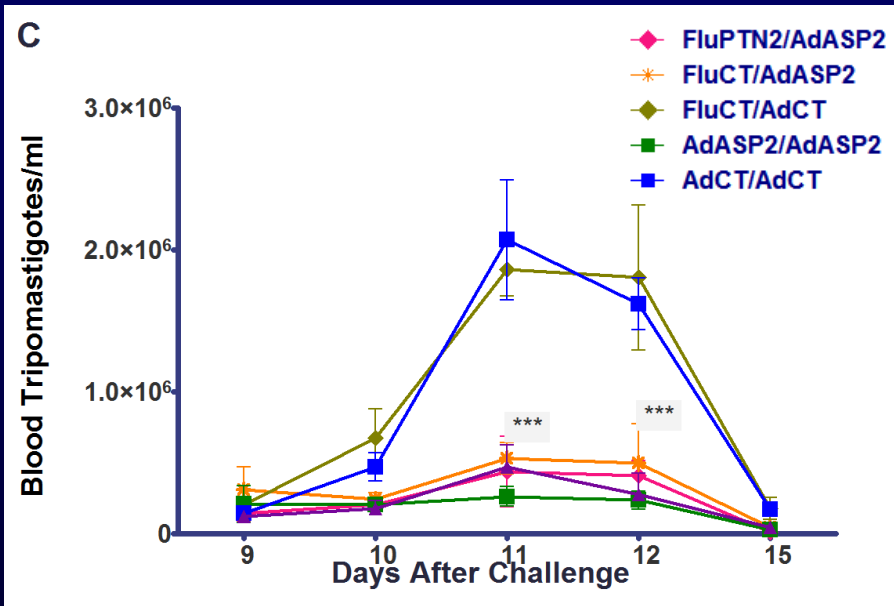


# RECOMBINANT VIRUSES AS VACCINES AGAINST CHAGAS DISEASE

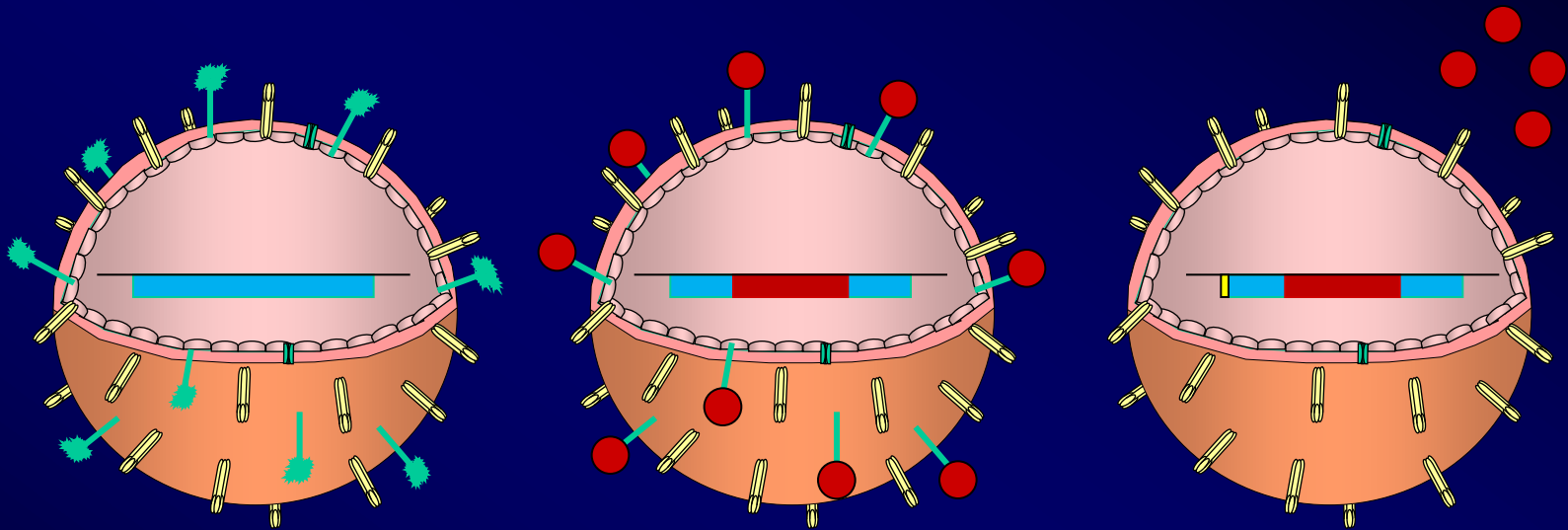


<div>% of effector CD8<sup>+</sup> T cells in mice immunized with recombinant viruses</div>								
Immun. Protocol	% total CD8 <sup>+</sup> T cell Dex. Neg.	% CD8 <sup>+</sup> T cell Dex. Neg.			% total CD8 <sup>+</sup> T cell Dex. Pos.	% CD8 <sup>+</sup> T cell Dex. Pos.		
		CD107 <sup>+</sup>	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$		CD107 <sup>+</sup>	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$
Flu-ASP2 + Ad-ASP2	89.5	9.9	9.0	6.1	10.5	2.1	1.3	0.8
----- + Ad-ASP2	97.7	5.1	4.1	3.2	2.3	0.5	0.4	0.3
Ad-ASP2 + Ad-ASP2	98.5	11.5	10.3	8.7	1.5	0.6	0.4	0.3
Non infected	99.3	1.1	0.3	0.2	0.7	0.2	0.0	0.0

# RECOMBINANT VIRUSES AS VACCINES AGAINST CHAGAS DISEASE



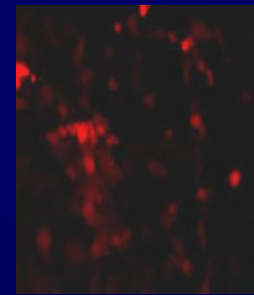
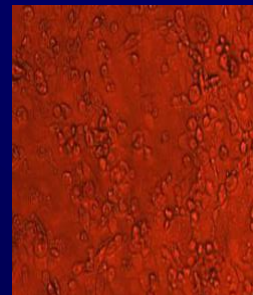
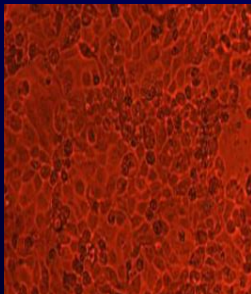
# EM BUSCA DE UM VETOR VIRAL EFICAZ E SEGURO



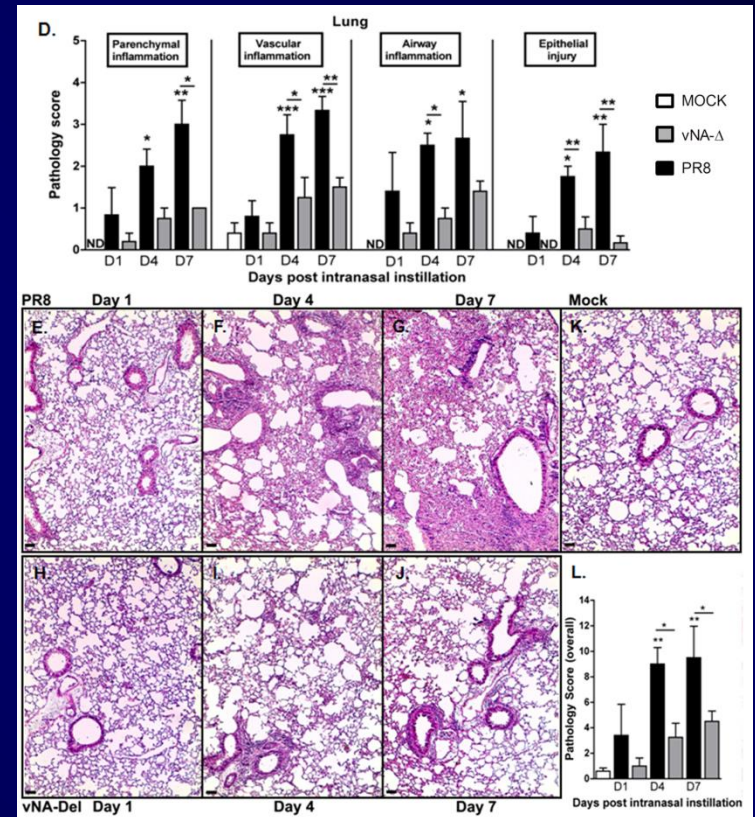
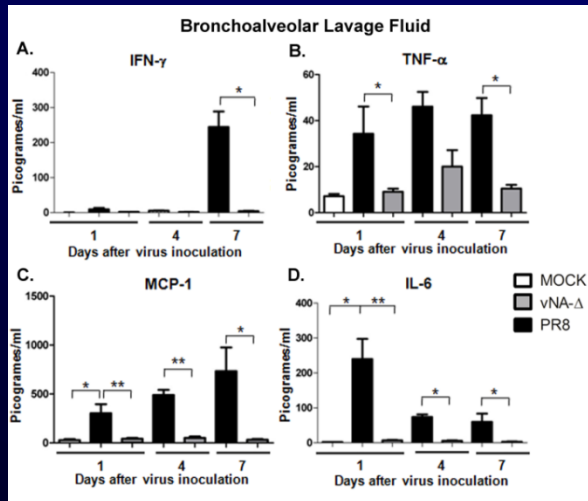
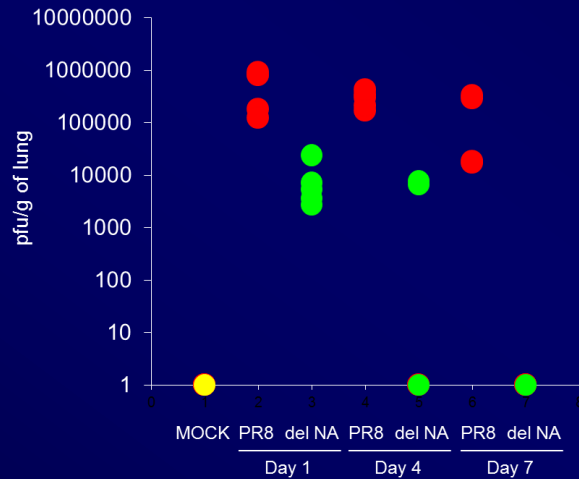
FLU-CT

FLU-RFP

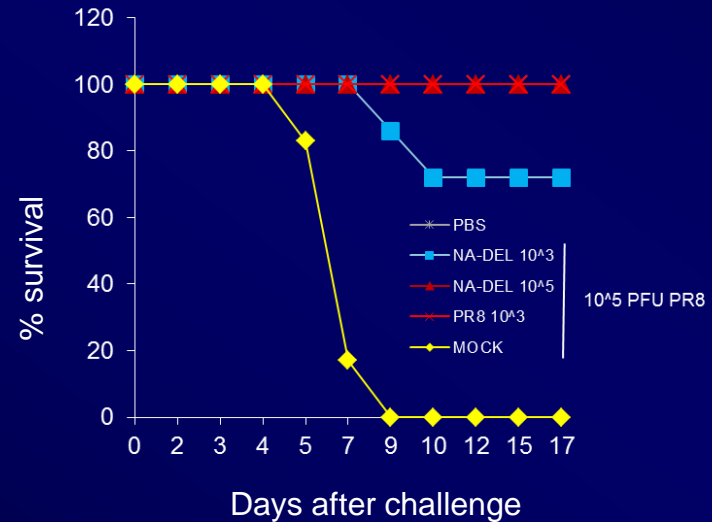
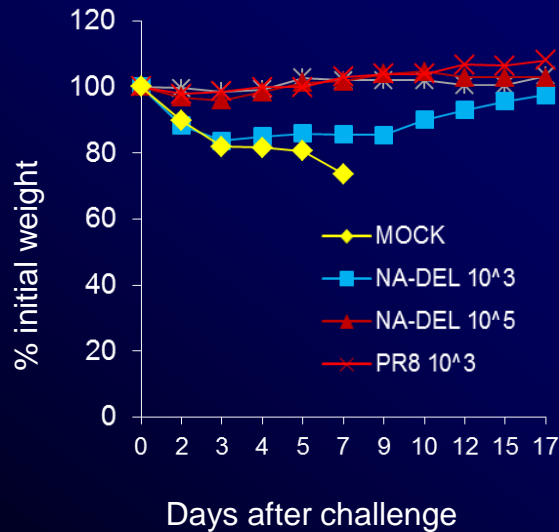
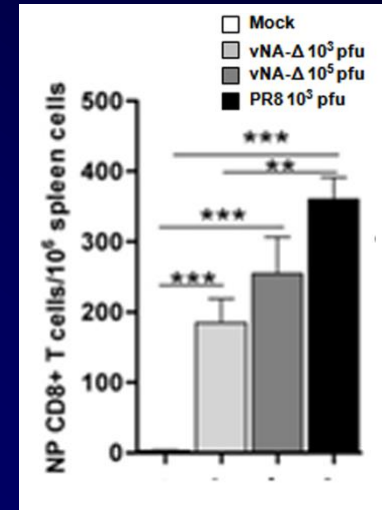
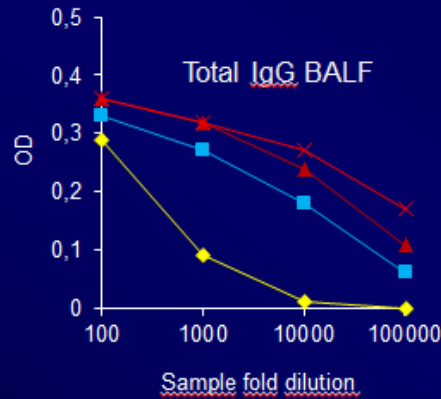
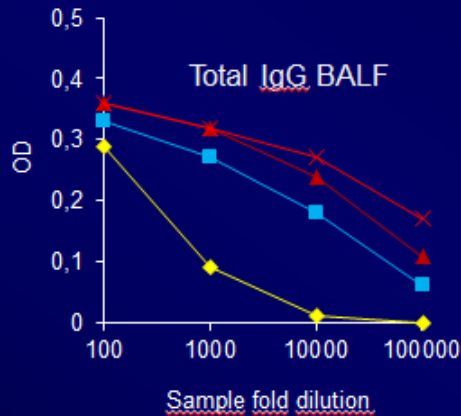
Fuji et al., 2003



# RECOMBINANT VIRUSES FITNESS IN MICE

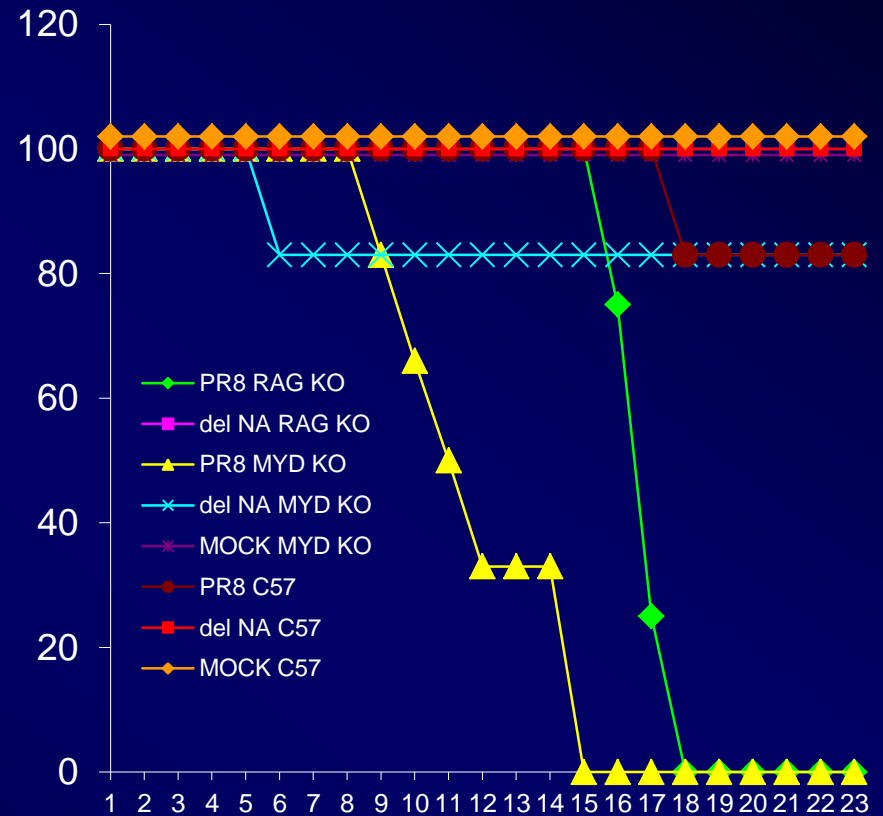
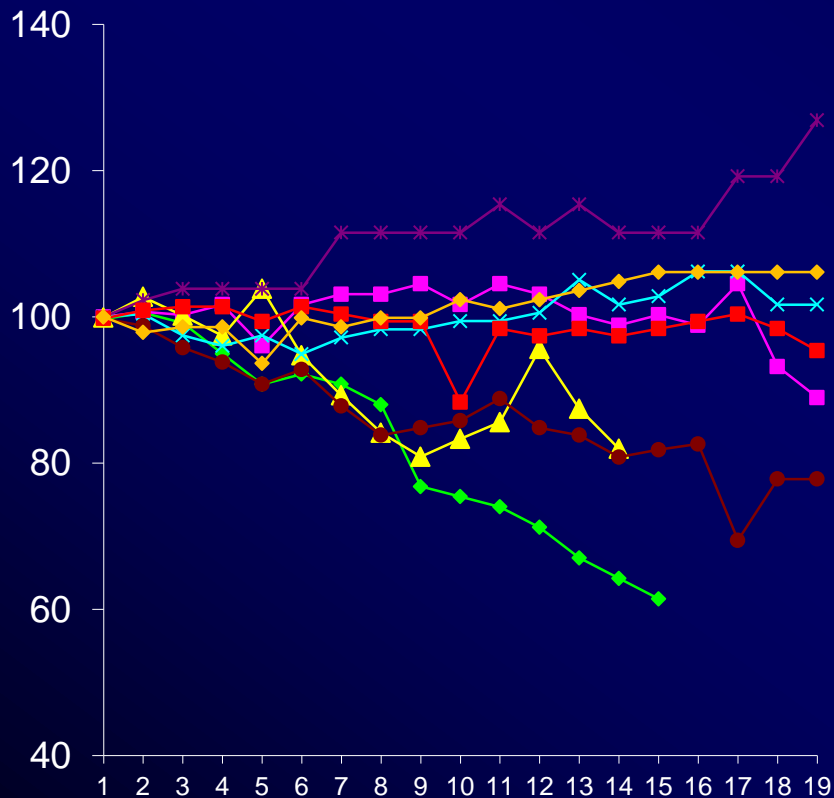


# RECOMBINANT VIRUSES FITNESS IN MICE

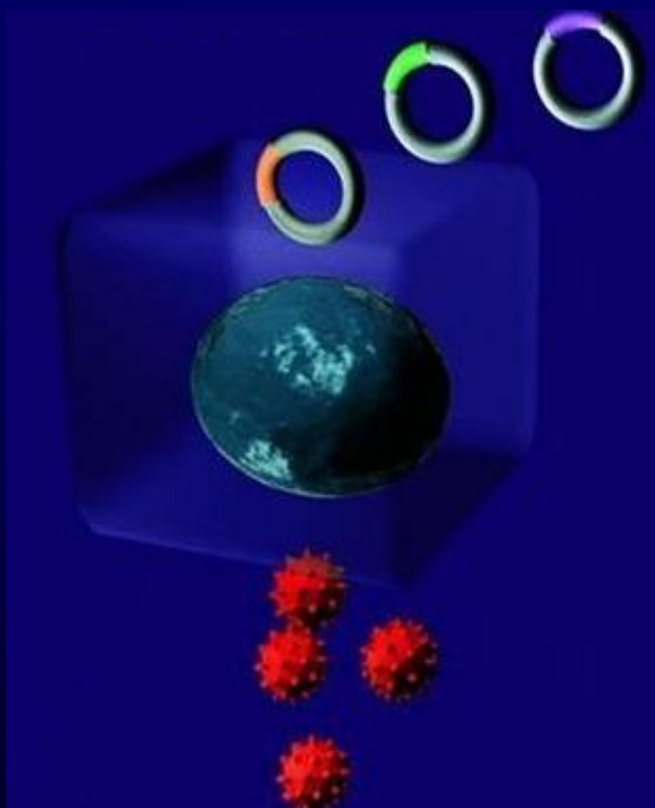




# VIRULENCE OF DEL-NA RECOMBINANT INFLUENZA VIRUSES IN KNOCK OUT MICES



Aplicações: vírus influenza recombinantes carregando antígenos de outros patógenos: *T. cruzi*, circovírus suíno.  
vírus influenza recombinantes carregando citocinas e quimiocinas



### Laboratório de Imunopatologia – CPqRR (FIOCRUZ /MG)

Ricardo T. GAZZINELLI – Pesquisador Titular

Alexandre de M. V. MACHADO – Pesquisador Associado

Marco Antonio CAMPOS – Pesquisador Titular

Rafael Polidoro Alves BARBOSA – mestrando

Érica Azevedo COSTA – pós doutoranda

Ana Paula de Faria Gonçalves – MsC em Bioquímica

Igor Augusto PEREIRA – Graduado em Biologia

Marta LAMOUNIER – Iniciação Científica

Olga Ceribeli – Iniciação Científica

### Colaboradores– UFSC

Oscar Bruña Romero- Pesquisador colaborador

### Colaboradores– UNIFESP/SP

Maurício Martins Rodrigues- Pesquisador colaborador

### Financiamento

CNPq, FAPEMIG, FIOCRUZ