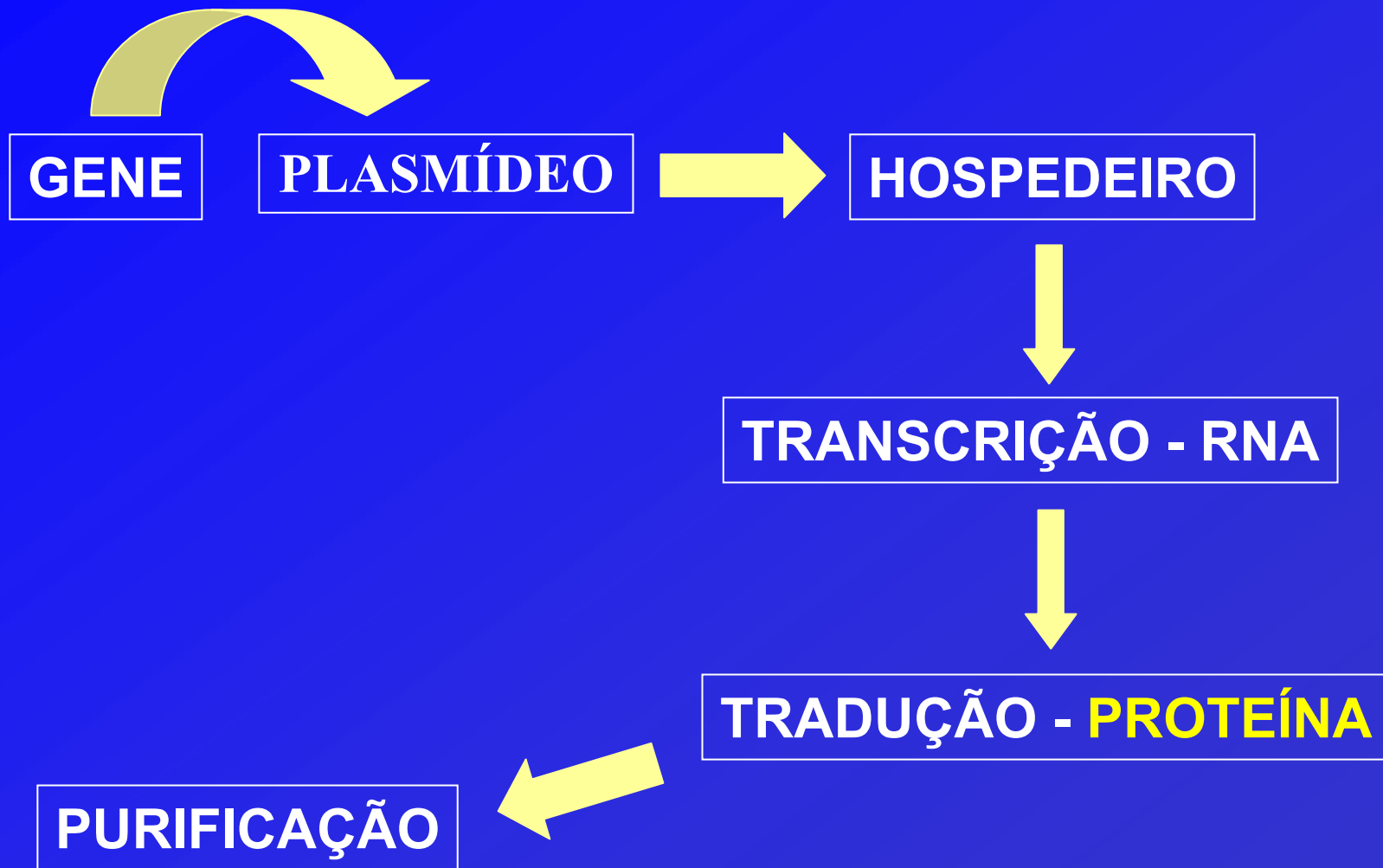
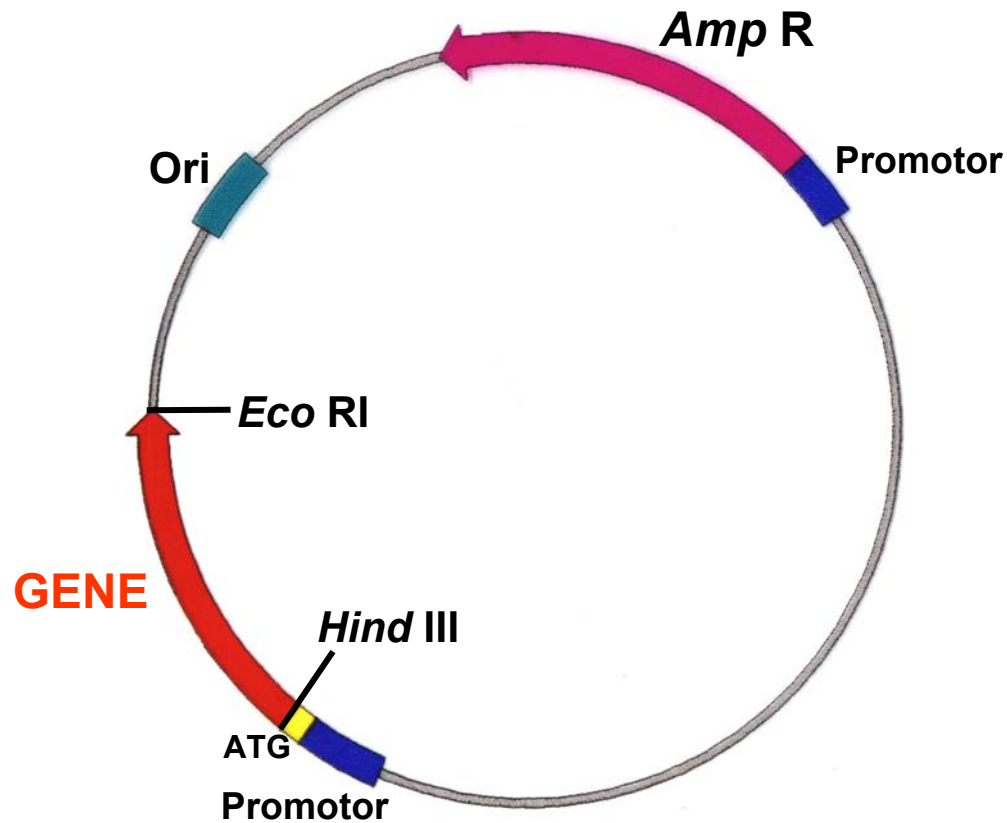


**A BIOLOGIA MOLECULAR NA
PRODUÇÃO DE
IMUNOBIOLÓGICOS**

PRODUÇÃO DE INSUMOS BIOLÓGICOS



PLASMÍEO PADRÃO



DIFERENTES SISTEMAS DE EXPRESSÃO

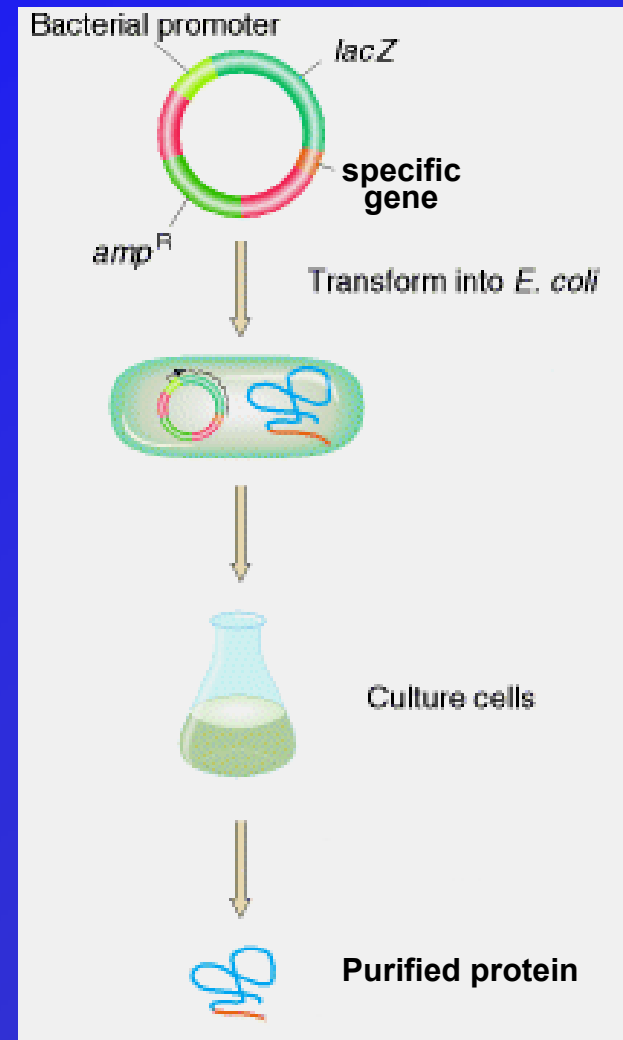
Bactérias - *Escherichia coli*

Vantagens:

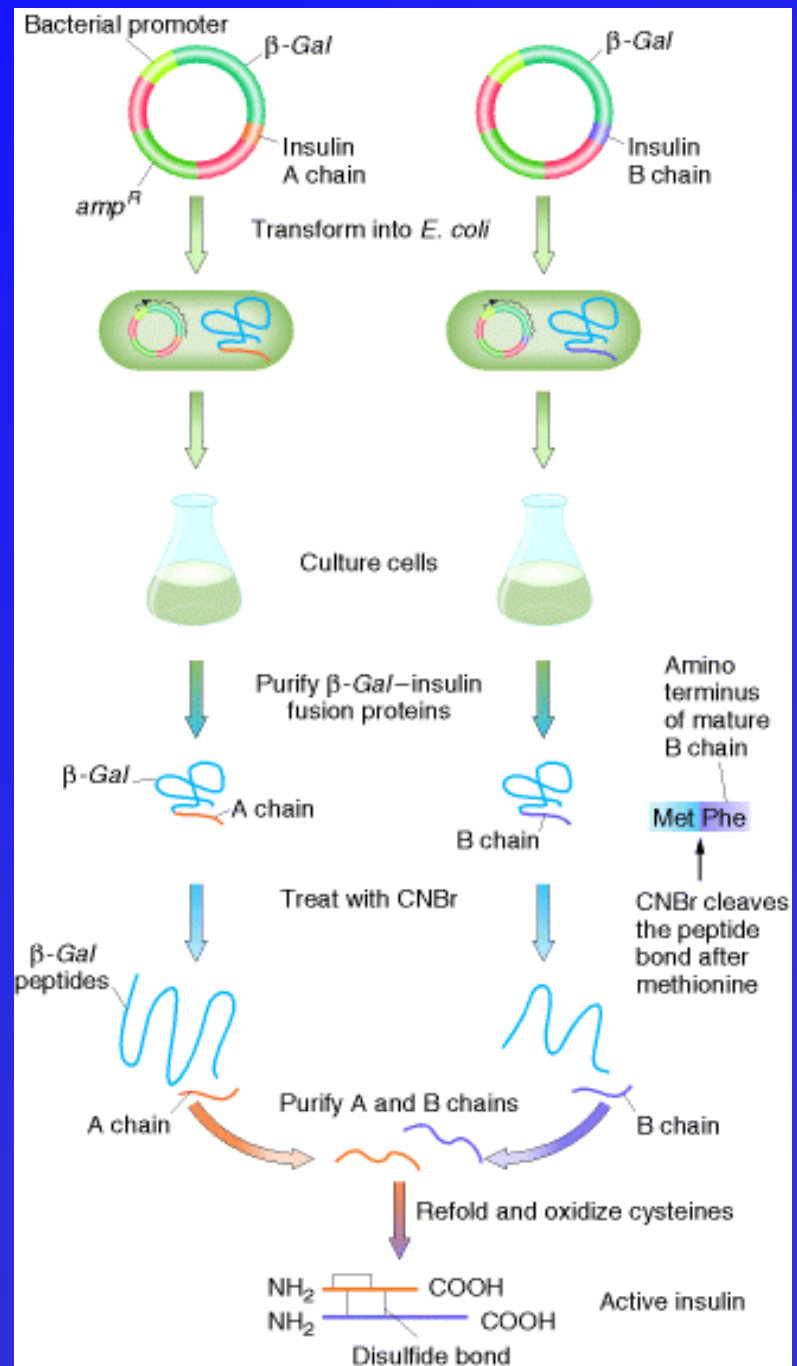
- . Facilidade de crescimento
- . Purificação (secreção, fusionadas)
- . Várias cepas com o genótipo conhecido
- . Vários plasmídeos comercialmente disponíveis
- . Menor custo

Desvantagens:

- . Sem modificações pós-tradução (ex: glicosilações)



Exemplo: Produção de Insulina



Leveduras - *Saccharomyces cerevisiae*

Vantagens:

- . Algumas modificações pós-tradução

Desvantagens:

- . Maior custo
- . Modificações não desejáveis

Culturas de células de mamífero e inseto (Baculovírus)

Vantagens:

- . Modificações pós- tradução

Desvantagens:

- . Crescimento lento
- . Custo mais elevado

INSUMOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS

PRODUTO	SISTEMA DE EXPRESSÃO
Imunomoduladores	
Interferon- α	<i>E. coli</i> e levedura
Interferon- β	<i>E. coli</i> e levedura
Interferon- γ	<i>E. coli</i> , levedura e cultura de células
Fatores de Crescimento	
TGF- α	<i>E. coli</i> e levedura
TGF- β	Levedura
Hormônios	
Hormônio de crescimento humano	<i>E. coli</i> , levedura e cultura de células
Insulina	<i>E. coli</i> e levedura
Proinsulina	<i>E. coli</i> e levedura
Proteínas do Sangue	
Albumina	<i>E. coli</i> , levedura e cultura de células
Fator VII	Levedura e cultura de células (baculovírus)
Fator VIII	Cultura de células (mamíferos e baculovírus)
Vacinas	
Hepatite B	Levedura

ANIMAIS TRANSGÊNICOS

+

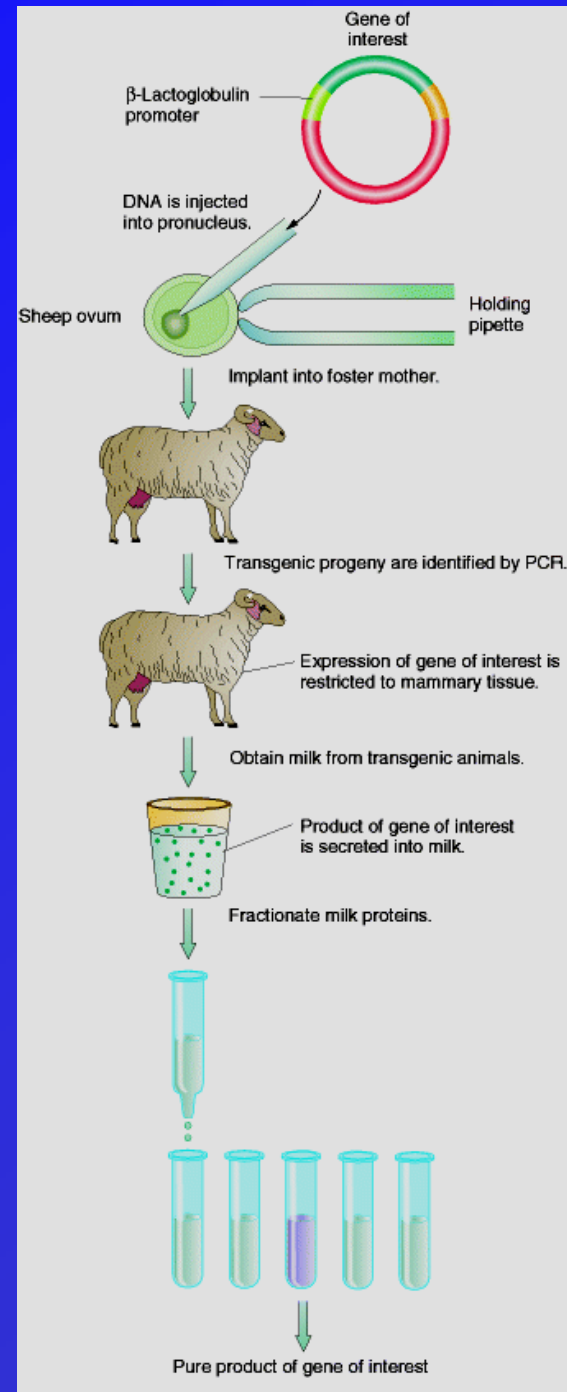
CLONAGENS (produção no leite)

Vantagens:

- . Modificações pós-tradução
- . Produção diária e purificação simples

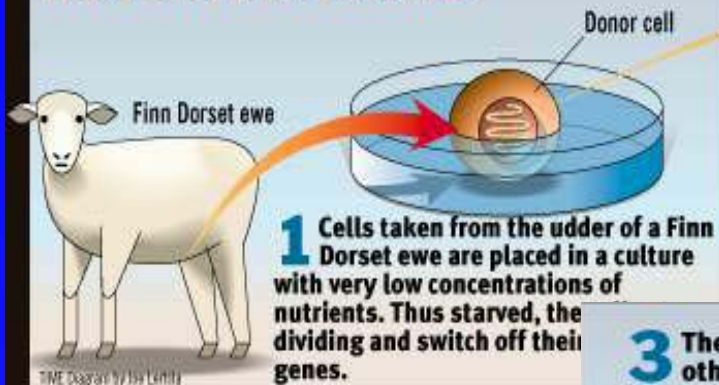
Desvantagens:

- . Pesquisas de custo muito elevado

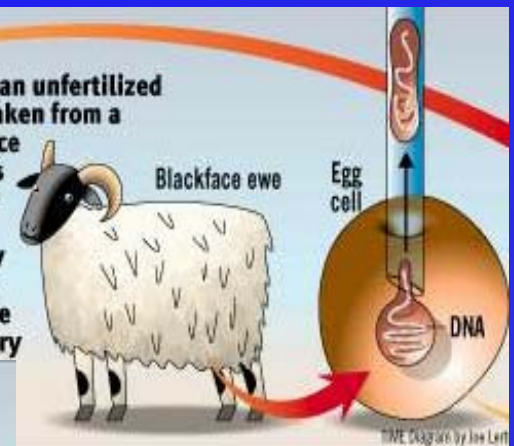


CLONAGEM DE ANIMAIS

HOW DOLLY WAS CREATED



2 Meanwhile, an unfertilized egg cell is taken from a Scottish Blackface ewe. The nucleus (with its DNA) is sucked out, leaving an empty egg cell containing all the cellular machinery



3 The two cells are placed next to each other and an electric pulse causes them to fuse together like soap bubbles. A second pulse mimics the burst of energy at natural fertilization, jump-starting cell division.

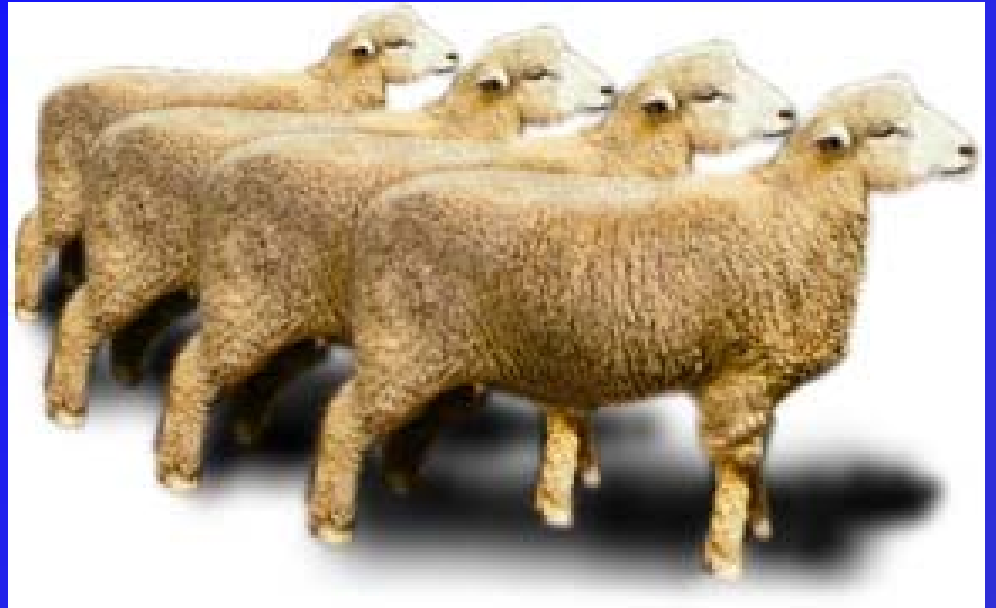


4 After about six days, the resulting embryo is implanted in the uterus of another Blackface ewe.



5 After a gestation period, the pregnant Blackface ewe gives birth to a baby Finn Dorset lamb, named Dolly, that is, genetically, identical to the original donor.





TRACY → alfa-I-antitripsina (fibrose cística e efizema)

POLLY → fator IX (cascata de coagulação)

APLICAÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

- Até o início do século XX:

- Vacinas bacterianas:

- Exemplos: febre tifoide (*Salmonella typhi*)

- tuberculose (BCG - *Mycobacterium bovis*)

- coqueluche (*Bordetella pertussis*)

- Vacinas virais:

- (células de embrião de galinha e cultura de tecidos)

- Exemplos: febre amarela

- poliomelite

- sarampo

VACINAS DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE ATÉ HOJE

(A maioria obtida empiricamente)

- Microorganismos inativados ou mortos**
- Microorganismos vivos atenuados**
- Vacinas de subunidades**

VACINAS INATIVADAS

- Tratamento por calor ou químico
- Maior custo e com riscos de efeitos adversos
- Resposta imune humoral

VACINAS ATENUADAS

- Passagens consecutivas *in vitro* do tipo selvagem
- Custo menor
- Risco de reversão para a forma patogênica
- Resposta imune humoral e celular

VACINAS DE SUBUNIDADES

- Frações acelulares purificadas do patógeno
 - Proteínas (toxinas detoxificadas quimicamente)
 - Polissacarídeos (cápsula de *Neisseria meningitidis*)
- Sem riscos de patogenicidade
- Custo mais elevado
- Resposta imune humoral

AVANÇOS DA BIOLOGIA MOLECULAR, BIOLOGIA CELULAR E IMUNOLOGIA

(Abordagens mais racionais)

- **Processo de interação patógeno-hospedeiro**
- **Tecnologia do DNA recombinante
(clonagem, PCR, mutagênese sítio dirigida e seqüenciamento)**
- **Genoma e Proteoma**

VACINAS DE SUBUNIDADES

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

Otimização da expressão:

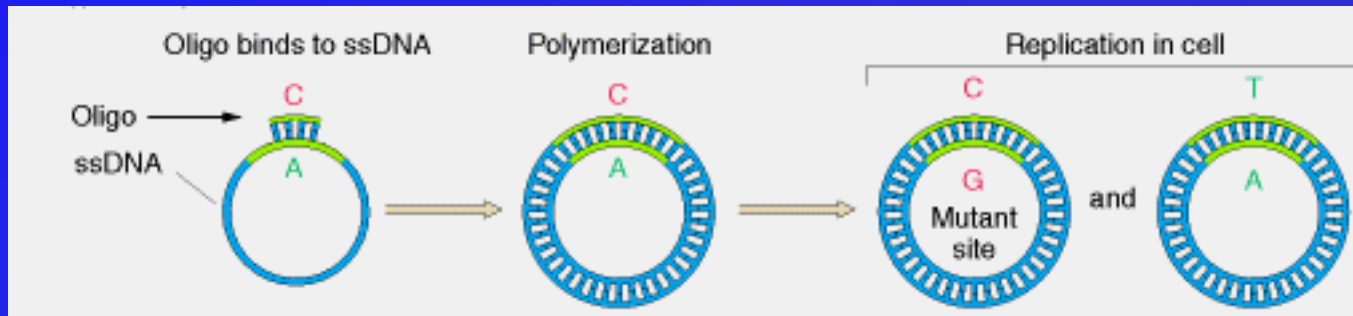
- Promotores
- Proteínas de fusão
- Preferência de codons (gene sintético)

Hepatite B

- Antígeno HBs purificado a partir de plasma humano (alto risco)
- Gene foi clonado em um plasmídeo e expresso em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Sem riscos e eficiente
- Importância: Primeira vacina de subunidade (1981)
Primeira vacina recombinante (1986)
Primeira vacina de prevenção ao câncer (carcinoma hepatocelular)

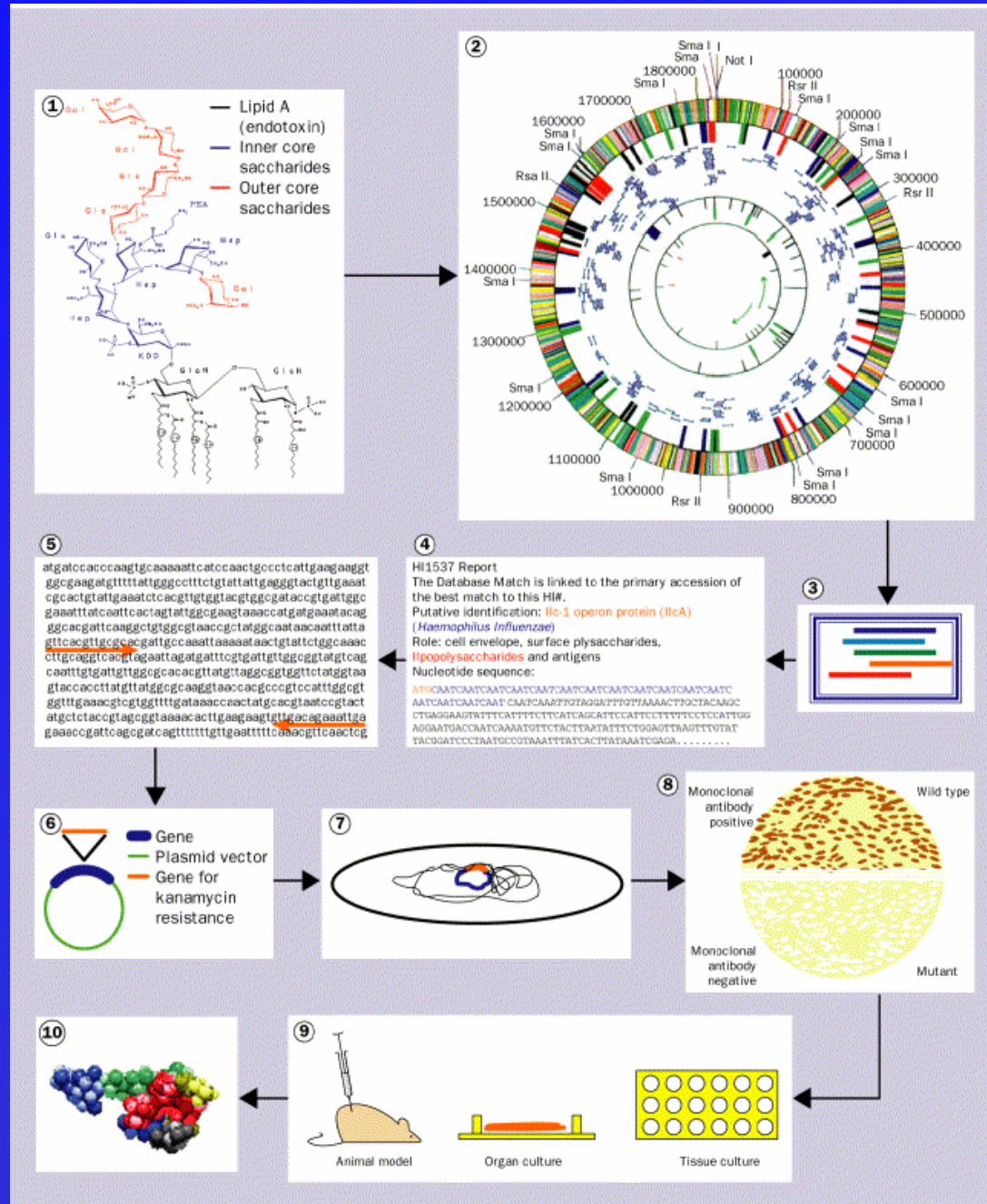
Coqueluche (*B. pertussis*)

- Vacina inativada: muitos efeitos adversos (febre, convulsões prolongadas)
- Vacina acelular: toxina PT, fímbrias e hemaglutinina filamentosa
 - . **Toxina PT**: detoxificada por mutagênese sítio dirigida (sítio ativo da enzima)



Helicobacter pylori:

- Identificação do patógeno - 1984
- Seqüenciamento do genoma completo - 1997
- Diversos antígenos já estão sendo testados em várias abordagens vacinais (ensaio clínico)
- Vacinas baseadas no patógeno inteiro - alto risco de desenvolvimento de carcinoma



PLANTAS TRANSGÊNICAS

Vantagens:

- . Modificações pós- tradução
- . Produção barata
- . Administração oral

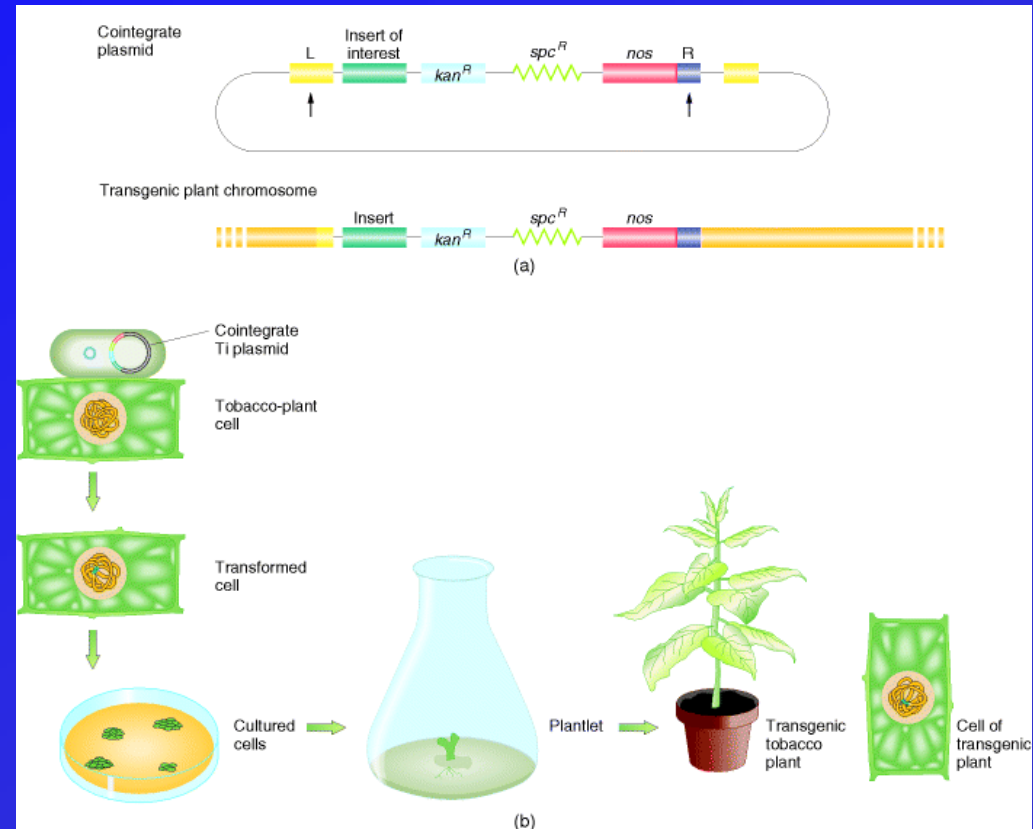
Desvantagens:

- . Dose inexata

Exemplos:

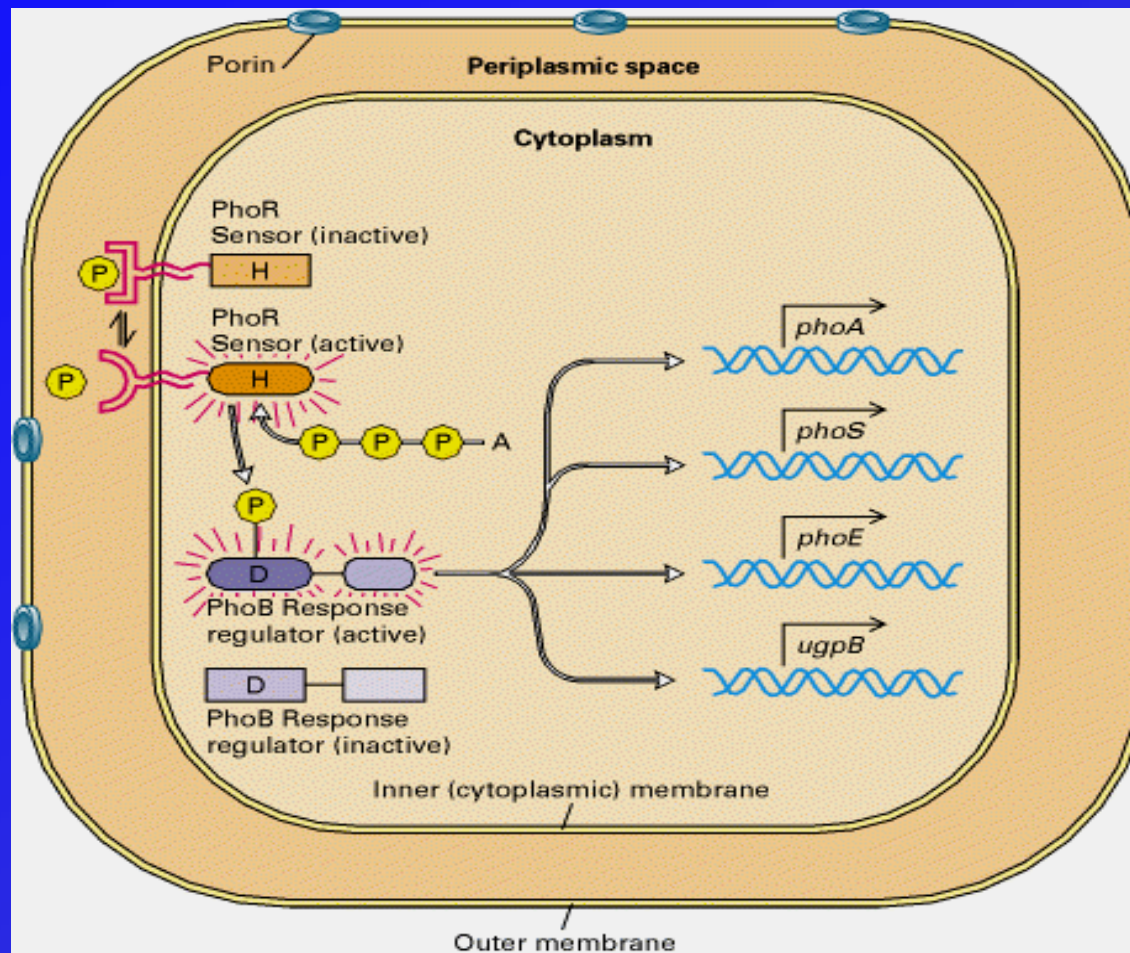
- . Subunidade toxinas (CTB ou LTB)
- . HbsAg

Batata, banana, feijão, etc



VACINAS VIVAS

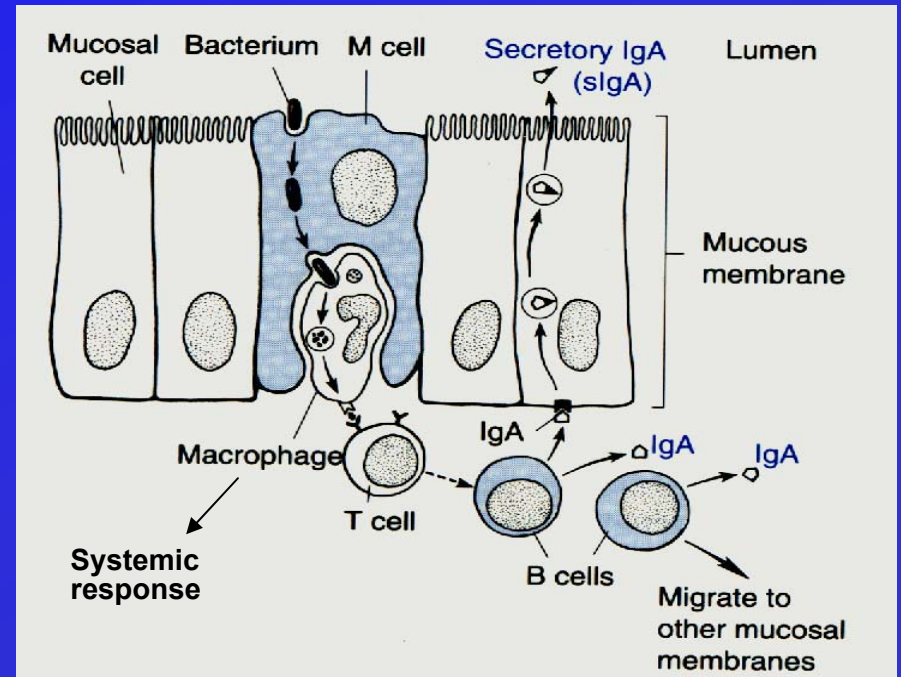
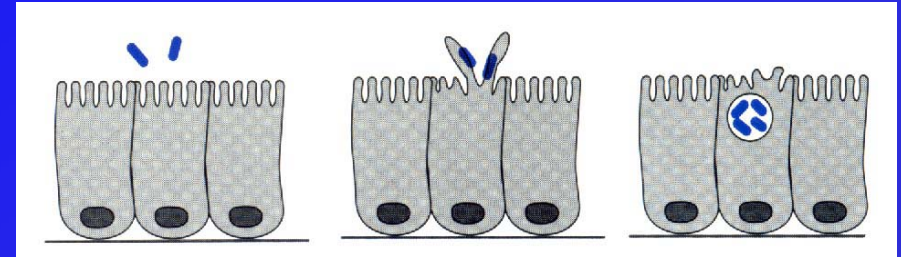
INATIVAÇÃO DE GENES REGULADORES (Exemplo: Sistema de dois componentes)



MICROORGANISMOS ATENUADOS CARREADORES DE ANTÍGENOS HETERÓLOGOS

BACTÉRIAS - *Salmonella*:

- Resposta imune sistêmica e de mucosa
- *S. typhi* e *S. typhimurium*
- Expressão de diversos antígenos de bactérias, vírus e parasitas



VÍRUS

- Retrovírus

(céls em divisão, integrado)

- Adenovírus

(céls não em divisão,
não integrado)

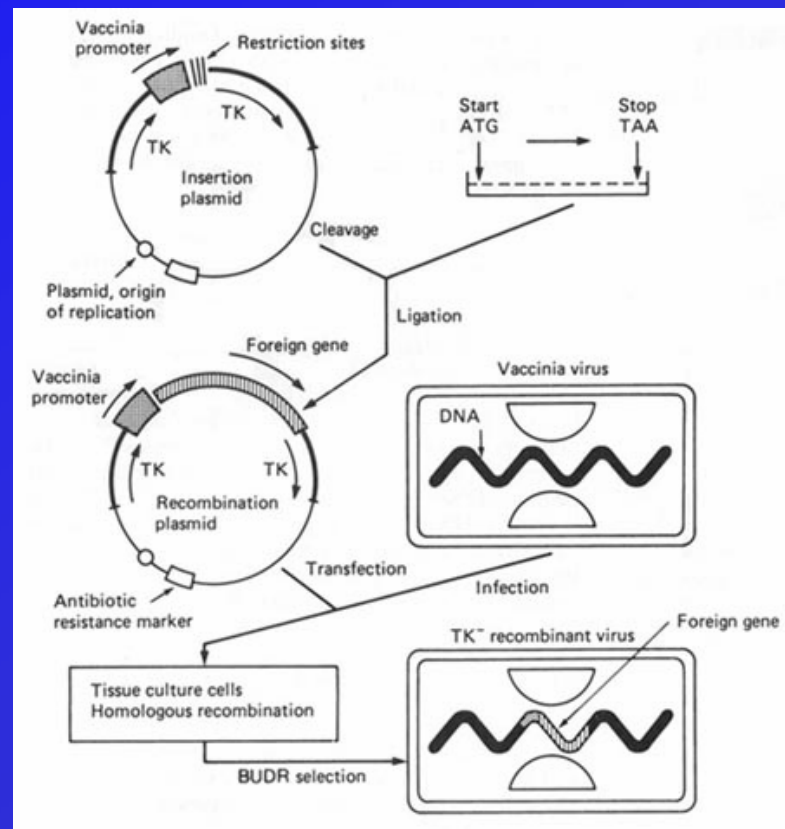
- Poxvírus

- Flavivirus

Vaccinia

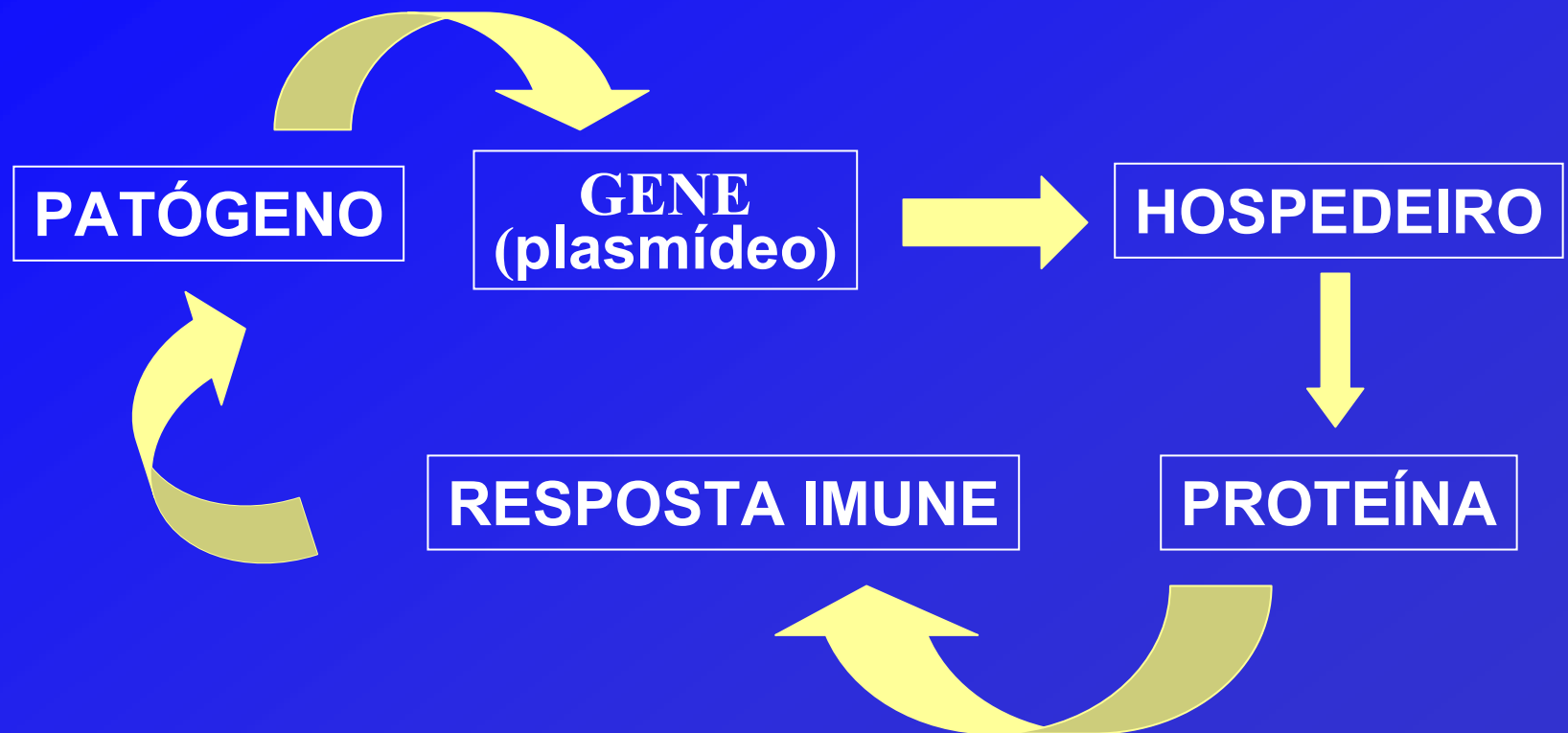
- Vírus de DNA

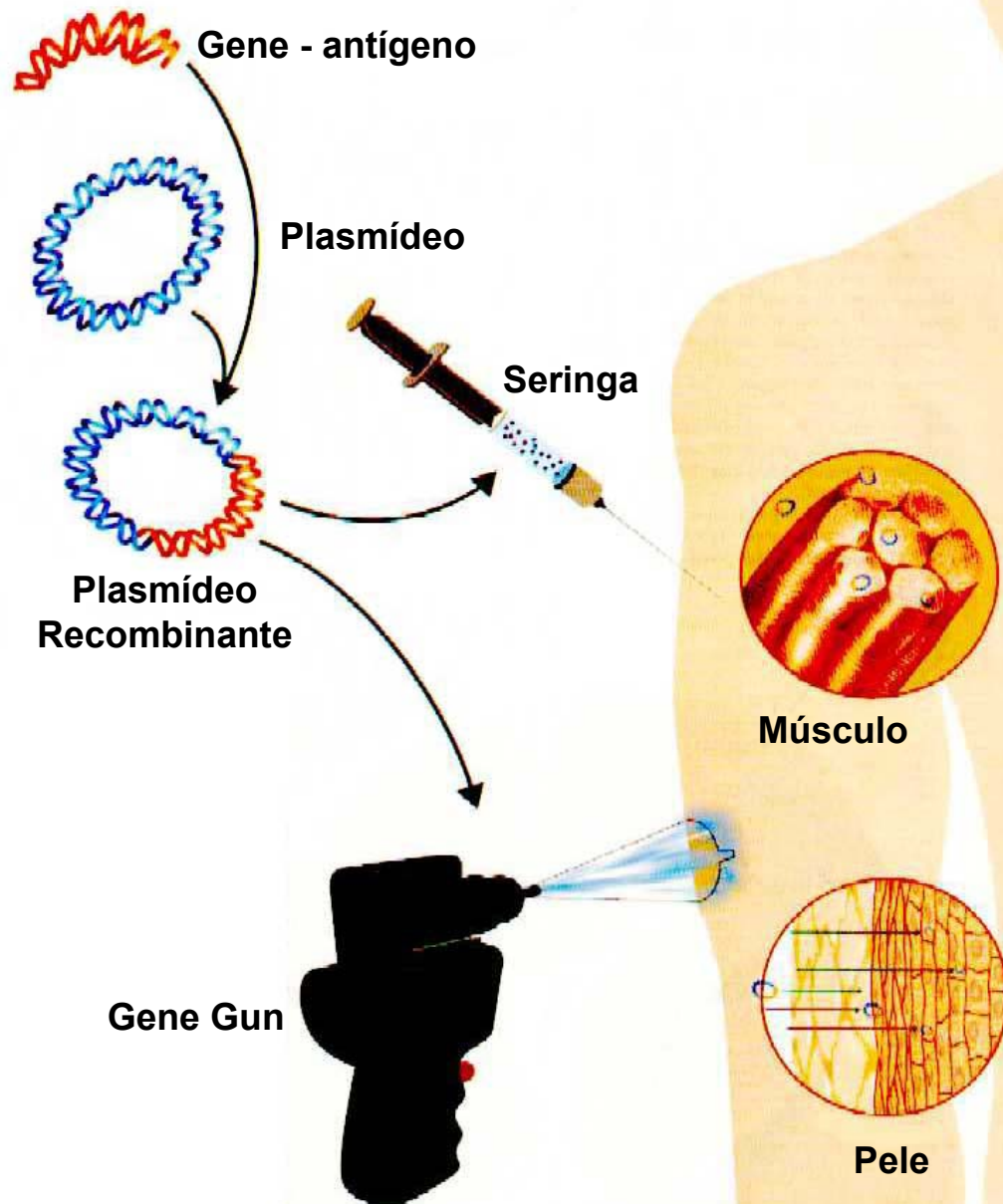
- Diversos antígenos de vírus,
parasitas e bactérias

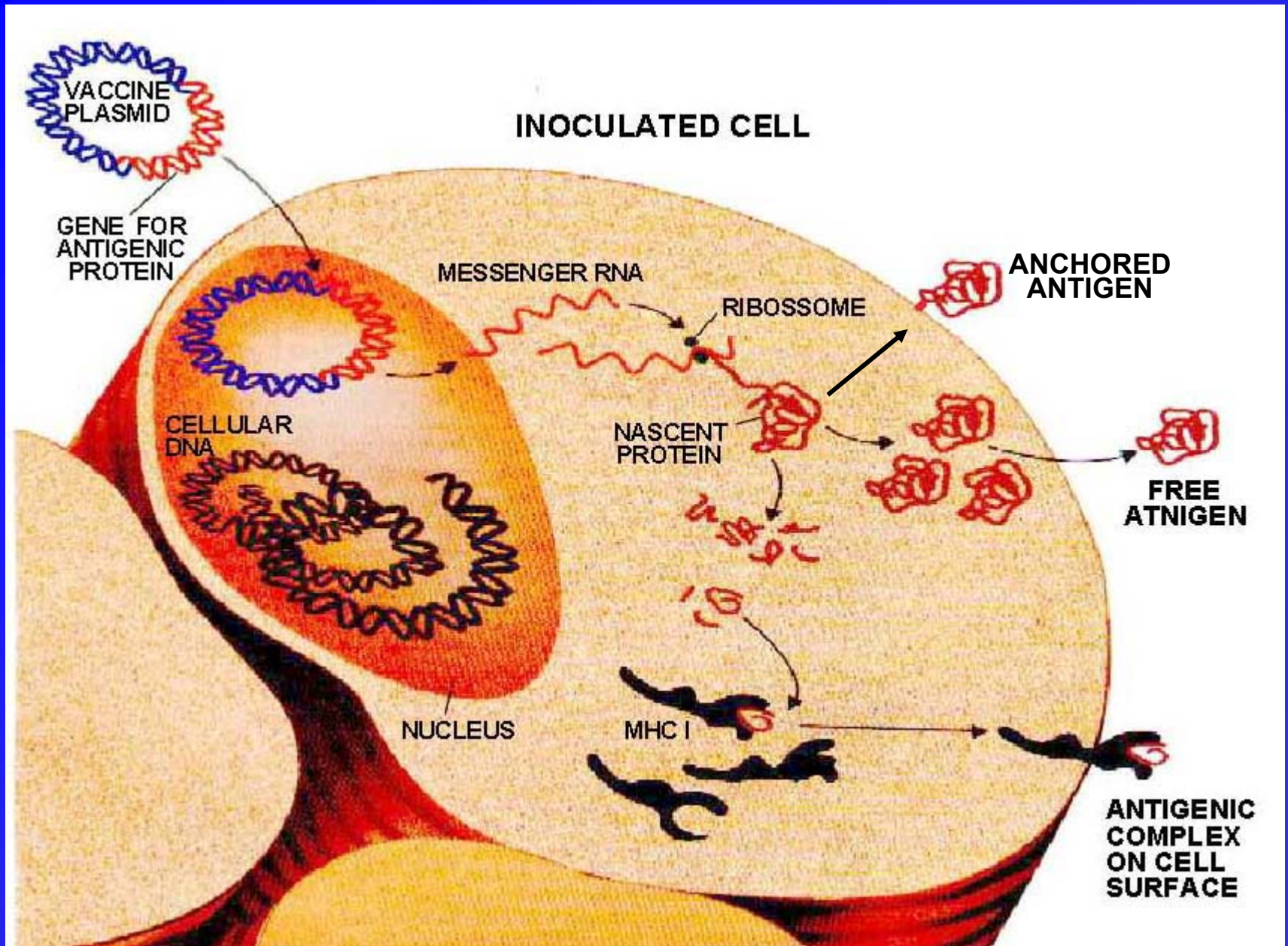


VACINAS DE DNA

(1992 - 1993)





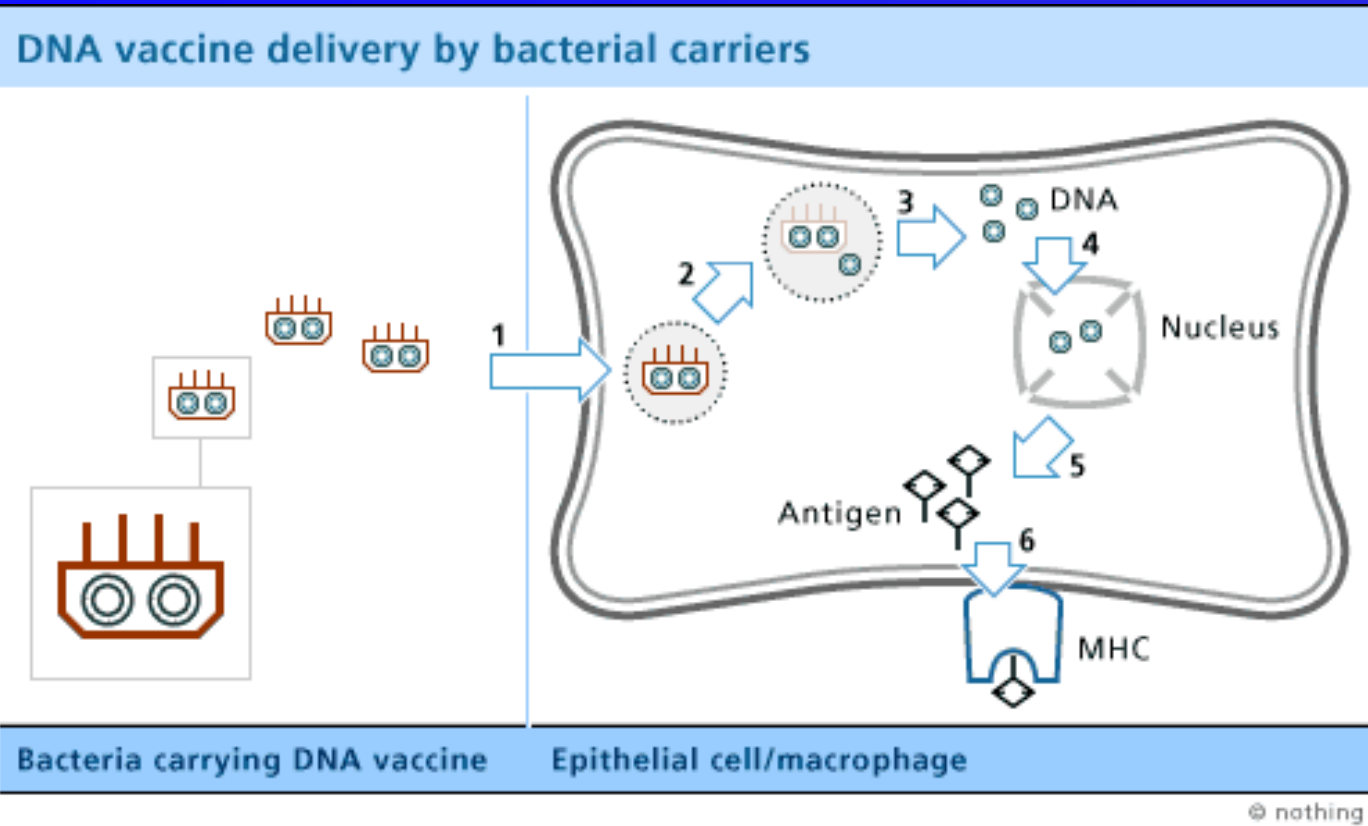


VACINAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

DNA:

- Estabilidade
- Resposta imune de amplo espectro (humoral e celular)
- Resposta imune de longa duração
- Possibilidade de utilização de vários genes simultaneamente
- Busca de candidatos a vacinas (rapidez)
- Efeito adjuvante (motivos CpG)
- Sem risco infeccioso
- Fácil preparo, menor custo

BACTÉRIAS CARREADORAS DE VACINAS DE DNA



ENSAIOS CLÍNICOS

Vaccine Objective	Proteins Encoded by Vaccine Genes	Immune Results So Far
Hepatitis B prevention	Hepatitis B surface antigen	Humoral and cellular responses
Herpes simplex prevention	Herpes glycoprotein	Immune analyses in progress
HIV prevention	Envelope and regulatory proteins; or core proteins and enzymes involved in HIV replication	Cellular responses (ultimately, all the genes will probably be tested in one vaccine)
Influenza prevention	Hemagglutinin	Immune analyses in progress (trial has ended)
Malaria prevention	Circumsporozoite protein	Cellular responses
HIV therapy	Envelope and regulatory proteins; or tat, nef and regulatory proteins	Humoral responses in first trial in list (which has ended); cellular responses in other trial
HIV therapy	Envelope, regulatory and core proteins and enzymes involved in HIV replication	Vaccine was combined with aggressive drug therapy (HAART); immune analyses in progress
Therapy for adenocarcinomas of the breast and colon	Carcinoembryonic antigen (CEA)	Cellular responses
Therapy for B cell lymphoma	Immunoglobulin	Humoral responses
Therapy for cutaneous T cell lymphoma (CTCL)	T cell receptor	Immune analyses in progress (trial has ended)
Therapy for prostate cancer	Prostate-specific membrane antigen	Immune analyses in progress

TERAPIA GÊNICA

Plasmídeos e Vírus

Exemplos:

- Cancer
- Fibrose cística
- Distrofia Muscular de Duchenne

In vivo e Ex vivo

