

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Priscila Isabel Vicente

Avanços nas vacinas terapêuticas para doenças associadas ao HPV

São Paulo

2022

Priscila Isabel Vicente

Avanços nas vacinas terapêuticas para doenças associadas ao HPV

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos.

Orientadora: Dra. Aurora Marques Cianciarullo

São Paulo

2022

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Vicente, Priscila Isabel

Avanços nas vacinas terapêuticas para doenças associadas ao HPV / Priscila Isabel Vicente ; orientador(a) Aurora Marques Cianciarullo - São Paulo, 2022.
37 p. : il.

Monografia (Especialização) da Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Guilherme de Souza" - Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Cânceres associados ao HPV 2. Papilomavírus humano. 3. Vacina terapêutica. 4. Saúde pública I. Cianciarullo, Aurora Marques. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

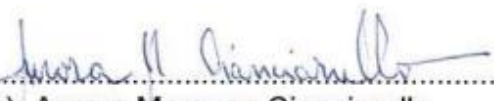
Eu, Priscila Isabel Vicente, aluno(a) do curso Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 28 de fevereiro de 2022.


.....
aluno(a): Priscila Isabel Vicente

De acordo: 
.....
Orientador(a): Aurora Marques Cianciarullo

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Butantan e Escola Superior do Instituto Butantan pela oportunidade de me especializar em um centro de referência e pelo ensino de qualidade.

À Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo por toda a orientação, paciência e conhecimento compartilhado. Agradeço por me incentivar quando precisei e me aconselhar em momentos de tensão.

À Dra. Monamaris M. Borges por concordar gentilmente em avaliar e revisar meu trabalho.

À Dra. Thaissa Bernardino por me acompanhar durante todos os experimentos práticos e ensinar as técnicas de laboratório que necessitei para realizar meu aperfeiçoamento profissional. Obrigada por todas as risadas, ensinamentos e broncas necessárias.

À Dra. Soraia Calil Jorge que acompanhou meu trabalho mesmo à distância e sempre se prontificou a ajudar. Por todo o acolhimento que fez eu me sentir bem-vinda no laboratório.

A toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia Viral, Leme, Gisele, Silvana e Carlos, e aos demais colegas, Giovani, Paulo e Amanda, que não hesitaram em me auxiliar em nenhum momento e fizeram meu dia a dia no laboratório ser mais leve.

À Juliana por sempre oferecer ajuda, me acompanhar nos experimentos e ouvir minhas angústias.

Aos meus amigos e companheiros de especialização Bruna, Lais, Lucas e Natália pelos cafés da manhã, pelas conquistas celebradas, pelas tristezas compartilhadas e por serem minha base para sempre seguir em frente.

Às minhas queridas amigas Eletra, Iriana, Julie, Luiza e Michele que mesmo longe sempre me incentivam e cuidam de mim.

Aos meus pais, Silvana e Aldemar, e meus irmãos, Tiago e Leticia, que sempre estão ao meu lado e são o maior bem que eu possuo.

Ao Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pelo suporte financeiro.

RESUMO

VICENTE, Priscila. **Avanços nas vacinas terapêuticas para doenças associadas ao HPV**. 2022 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus muito comum não envelopado de DNA dupla fita, de abrangência mundial com mais de 200 tipos descritos. As doenças associadas ao HPV, principalmente o câncer de colo do útero, têm um grande impacto na saúde pública mundial e requerem medidas estratégicas para seu combate. As vacinas profiláticas disponíveis atualmente desempenham um papel fundamental na prevenção de infecções dos tipos carcinogênicos mais prevalentes na população. A vacinação aliada aos exames preventivos configura a base do combate ao avanço do vírus e têm sido as medidas principais adotadas pelos órgãos de saúde pública. Entretanto, somente medidas de prevenção não são suficientes para amenizar ou diminuir o número cada vez mais crescente de casos. É necessária também a elaboração de novas abordagens terapêuticas concomitantes, de modo a abranger pacientes que já desenvolveram a doença. Nesse sentido, as vacinas terapêuticas têm sido amplamente estudadas e suas aplicações individuais ou associadas com outros medicamentos têm demonstrado resultados promissores e novas possibilidades de tratamentos.

Palavras-chave: HPV. Câncer cervical. Cânceres associados ao HPV. Papilomavírus humano. Vacina terapêutica. Saúde Pública.

ABSTRACT

VICENTE, Priscila. **Advances in therapeutic vaccines for HPV-associated diseases**. 2022 37 p. Monograph (Specialization in Biotechnology for Health: Vaccines and Biopharmaceuticals) – Human Resources Training Center for SUS/SP; Butantan Institute, São Paulo, 2022

Human Papillomavirus (HPV) is a very common non-enveloped double-stranded DNA virus, with worldwide coverage and more than 200 types described. The diseases associated with HPV, especially cervical cancer, have a major impact on global public health and require strategic measures to fight them. Currently available prophylactic vaccines play a key role in preventing infections of the most prevalent carcinogenic types in the population. Vaccination combined with preventive exams forms the basis for combating the spread of the virus and have been the main measures adopted by public health agencies. However, prevention measures alone are not enough to mitigate or reduce the increasing number of cases. It is also necessary to develop new concomitant therapeutic approaches, in order to cover patients who have already developed the disease. In this sense, therapeutic vaccines have been widely studied and their individual applications or associated with other drugs have shown promising results and new treatment possibilities.

Keywords: HPV. Cervical Cancer. HPV-associated Cancers. Human Papillomavirus. Therapeutic Vaccine. Public Health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa genético do HPV	13
Figura 2 - Imagem computadorizada do interior do capsídeo viral com apenas a proteína L1.	13
Figura 3 - Imagem computadorizada mostrando proteínas L2 em vermelho e L1 em azul.....	14
Figura 4 - Ação da E6 e E7 na transformação celular.....	15
Figura 5 - Fluxograma de pesquisa.....	19
Figura 6 - Crescimento bacteriano após transformação.....	34
Figura 7 - Fotodocumentação do gel de agarose submetido a eletroforese para confirmação de DNA plasmideal	35
Figura 8 - Células HEK 293T cultivadas no laboratório.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vacinas profiláticas disponíveis para HPV	16
Tabela 2 – Pesquisa avançada na Plataforma Clinical Trials	17
Tabela 3 – Estudos clínicos selecionados para terapia de cânceres HPV+	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DST – Doença Sexualmente Transmissível

EUA – Estados Unidos da América

HPV – Human Papilloma Virus (Papilomavírus humano)

IL – Interleucina

IST – Infecção Sexualmente Transmissível

kDA – Quilodalton

nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

PF – Peptídeo de fusão

PF – Peptídeo de fusão

pRb – Proteína retinoblastoma

SUS – Sistema Único de Saúde

VLPs – Virus Like Particles (Partículas Semelhantes a Vírus)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Impacto na população humana.....	11
1.2 Características do vírus.....	12
1.3 Vacinas profiláticas.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 METODOLOGIA	17
4 RESULTADOS.....	18
5 DISCUSSÃO	23
5.1 Vacinas de bactéria atenuada	23
5.2 Vacinas de DNA.....	24
5.3 Vacinas de RNA.....	25
5.4 Vacinas de peptídeos/proteínas.....	26
6 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS.....	29
APÊNDICE A - TREINAMENTO TÉCNICO.....	33

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano (HPV, Human Papillomavirus) é o agente causal da infecção viral mais comum no trato anogenital, sendo considerada uma DST (Doença Sexualmente Transmissível) de grande impacto em saúde pública e pode ser desde assintomática até levar ao desenvolvimento de um câncer. É encontrado em todo o mundo, com maior prevalência em regiões mais subdesenvolvidas como África subsaariana, América latina e Caribe, Europa oriental e sudeste da Ásia (STATES et al., 2017).

Existem mais de 200 tipos de HPV descritos de acordo com a sequência genética da L1, principal proteína do capsídeo do vírus. Podem ser classificados também de acordo com a área da infecção (mucosa ou cutânea) e probabilidade de induzir a um câncer (alto risco e baixo risco) (DOORBAR et al., 2012). São considerados HPV de alto risco (hrHPV, high risk HPV) os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59. Os tipos 68, 26, 53, 66, 67, 67, 70, 82 e 73 têm evidência limitada quanto à sua carcinogenicidade (BOUVARD et al., 2009). Os tipos oncogênicos mais frequentes encontrados são o HPV-16 e HPV-18, sendo o 16 o mais comum em todas as regiões do mundo (STATES et al., 2017). Os tipos HPV-6 e HPV-11 estão ligados a 90% dos casos de verrugas anogenitais (DE OLIVEIRA; FREGNANI; VILLA, 2019).

1.1 Impacto na população humana

As infecções por HPV são, em sua maioria, assintomáticas e são resolvidas sem necessidade de intervenção em até um ou dois anos. O problema ocorre quando infecções persistentes de hrHPV não são detectadas e tratadas apropriadamente evoluindo para casos de carcinoma, principalmente no trato genital. De 5 a 10% das mulheres infectadas desenvolvem uma infecção persistente. Além do tipo de HPV, outros fatores como HIV-positivo, sistema imune debilitado, coinfeções com outras ISTs (Infecções Sexualmente Transmissíveis) e consumo de tabaco podem contribuir para desencadear um quadro tumoral (STATES et al., 2017).

Além de uma embasada relação com câncer cervical, estudos têm demonstrado a associação de infecções por hrHPV com cânceres em outras regiões

anogenitais como vagina, vulva, pênis e ânus, além de casos na região orofaríngea e cabeça e pescoço (TOMMASINO, 2014).

A cada ano, 630.000 novos casos de câncer registrados ao redor do mundo são relacionados ao HPV. Só o câncer cervical é responsável por 530.000 novos casos e mais 250.000 mortes anualmente. Desses casos, mais de 70% estão associados aos tipos 16 e 18. Aproximadamente 8.500 casos de carcinoma na vulva, 12.000 de câncer vaginal, 35.000 de câncer anal e 13.000 câncer peniano estão associados ao HPV (DE MARTEL et al., 2017).

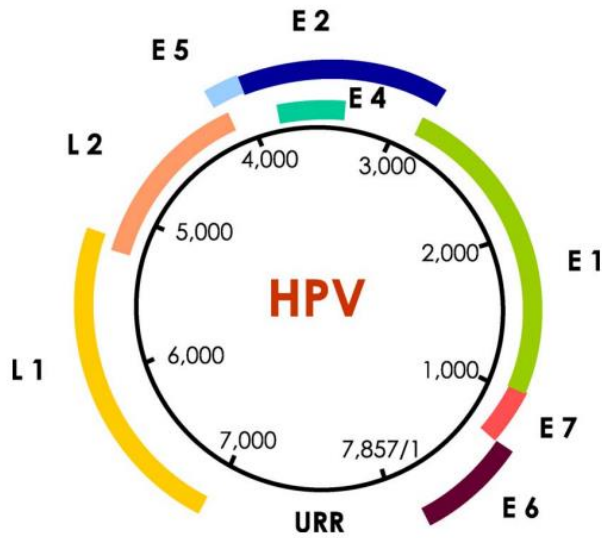
No Brasil, o câncer de colo do útero é o terceiro mais frequente em mulheres, com uma estimativa de 16.710 novos casos no ano de 2020. Em 2019, foi o quarto em número de óbitos, com mais de 6.000 registrados (INCA, 2021).

A Papilomatose Respiratória Recorrente é uma condição rara em que lesões no trato respiratório podem obstruir a passagem de ar. É causada pelos tipos HPV-6 e HPV-11 e tem uma alta morbidade com a necessidade de diversas intervenções cirúrgicas, podendo ser fatal (STATES et al., 2017).

1.2 Características do vírus

O HPV pertence à família Papillomaviridae e é um vírus não envelopado com aproximadamente 55 nanômetros (nm) de diâmetro. O capsídeo icosaédrico circunda o DNA composto por aproximadamente 8.000 pares de base. A Figura 1 apresenta um esquema do mapa genômico do HPV com regiões iniciais responsáveis por codificar as proteínas reguladoras E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e regiões tardias, L1 e L2, que codificam as proteínas estruturais do capsídeo e a região de origem da replicação e transcrição (URR) (MUÑOZ et al., 2006; YAZDANI et al., 2020).

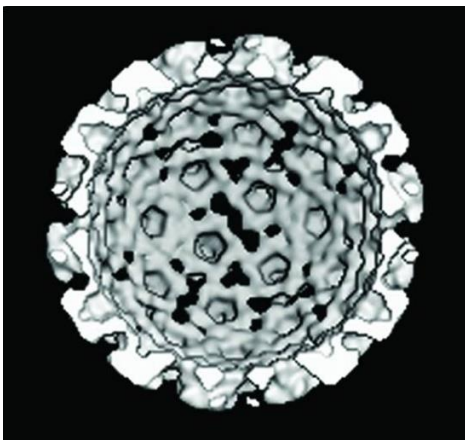
Figura 1 - Mapa genético do HPV



Fonte: MUÑOZ et al., 2006

A principal proteína do capsídeo é a L1 com aproximadamente 55 kDa (quilodalton), que forma toda a superfície exterior mediando a interação do vírus com a célula (Figura 2). Ela possui a capacidade de formar VLPs (Virus-like Particles) espontaneamente sem a presença de chaperonas, que são proteínas que auxiliam no enovelamento (AIRES et al., 2006; BAZAN et al., 2009; ; BUCK; DAY; TRUS, 2013).

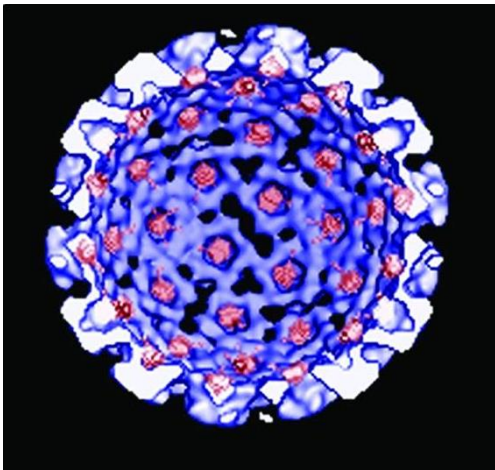
Figura 2 - Imagem computadorizada do interior do capsídeo viral com apenas a proteína L1.



Fonte: BUCK et al., 2008.

A L2, apesar de ser um componente menor do capsídeo, desempenha funções cruciais na estrutura do vírion e no processo infeccioso (Figura 3). Sua sequência é mais conservada que a de L1 e ela apresenta uma oportunidade como alvo de estudo para o desenvolvimento de vacinas, com a possibilidade de uma cobertura vacinal maior contra diversos tipos de HPV que vacinas baseadas somente em VLPs de L1 (CIANCIARULLO et al., 2010; CIANCIARULLO e SASAKI, 2019; SAKAUCHI et al., 2021; WANG, 2013).

Figura 3 - Imagem computadorizada mostrando proteínas L2 em vermelho e L1 em azul.



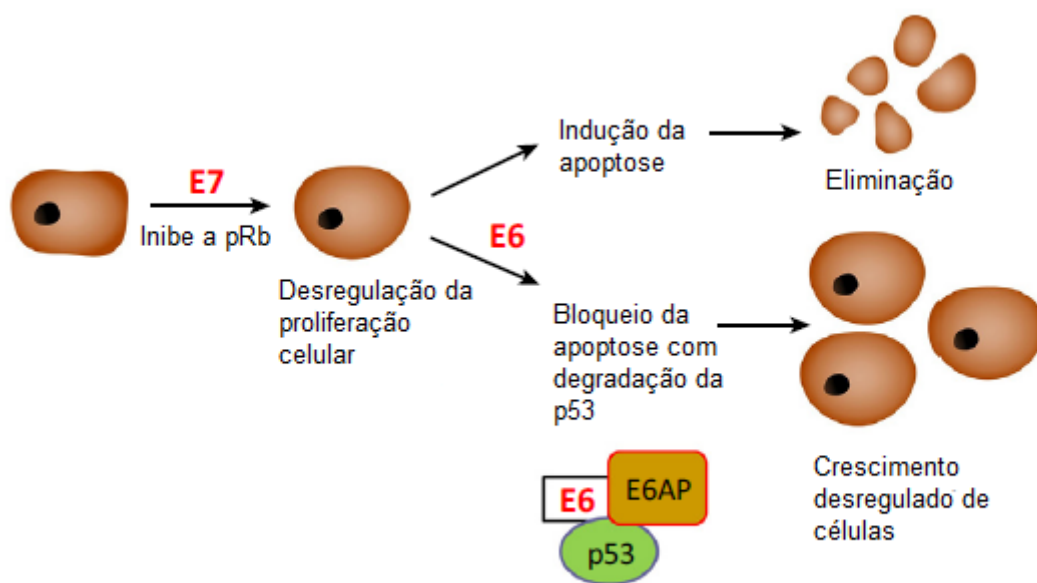
Fonte: BUCK et al., 2008.

A proteína E1 está envolvida com a regulação e transcrição dos vírus. A proteína E2 atua na replicação do DNA viral, apoptose e como inibidora da transcrição de E6/E7. A proteína E4 encontra-se dentro da região maior de E2 e contribui para a produção de vírions. A proteína E5, como a E6 e E7, é uma oncoproteína que pode interferir no ciclo regular da célula (DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018; DOORBAR et al., 2012; WANG; RODEN, 2013).

As oncoproteínas E6 e E7 desempenham uma função central tanto na indução da carcinogênese, quanto no crescimento das células tumorais. Elas interferem com a regulação do ciclo celular e inibem o processo de apoptose. A E6 se liga e degrada a p53 impedindo a ativação de fatores proapoptóticos, enquanto que a E7 inativa a proteína retinoblastoma (pRb) que controla o crescimento celular excessivo (DOORBAR et al., 2012).

Quando a E7 inibe a pRb e, conseqüentemente, induz a uma proliferação celular anormal, um processo de apoptose seria iniciado conduzindo à uma eliminação das células atípicas. No entanto, a degradação da p53 pela E6 associada a E6AP, proteína celular associada a E6 (E6AP), impede a apoptose e, com isso, possibilita o crescimento das células tumorais. O esquema da ação conjunta das proteínas é demonstrado na Figura 4 (HOPPE-SEYLER et al., 2018).

Figura 4 - Ação da E6 e E7 na transformação celular



Fonte: Adaptado de HOPPE-SEYLER et al., 2018

Para garantir que uma terapia seja eficiente, é necessário que exista uma correlação específica entre o antígeno escolhido e a resposta imune. Nesse sentido, as oncoproteínas E6 e E7 do HPV são alvos promissores (CIANCIARULLO e SASAKI, 2019). Além disso, o estudo dessas proteínas pode elucidar diversos processos de transformação celular (CLARK; TRIMBLE, 2020; HOPPE-SEYLER et al., 2018).

1.3 Vacinas profiláticas

A OMS (Organização Mundial da Saúde) indica uma abordagem multidisciplinar para conter a disseminação do vírus na população mundial. Uma educação sexual de

qualidade, mobilização social, vacinação, exames preventivos, tratamento quando possível e cuidados paliativos para assegurar qualidade de vida (OPAS, 2020).

Atualmente existem três vacinas profiláticas elaboradas a partir de VLPs da proteína L1 purificada disponíveis (Tabela 1). A administração da vacina é indicada preferencialmente antes da primeira relação sexual. Diversos estudos demonstraram o potencial imunogênico, eficácia e segurança dessas vacinas (DE OLIVEIRA; FREGNANI; VILLA, 2019). Estima-se que 70% a 90% dos casos de câncer relacionados ao HPV possam ser prevenidos com uma ampla cobertura vacinal (DE MARTEL et al., 2017).

No Brasil, a vacina Gardasil é disponibilizada gratuitamente através do SUS (Sistema Único de Saúde) para meninas de 9 a 14 anos e meninos de 11 a 14 anos. Para pacientes imunossuprimidos a faixa etária é maior, sendo até 45 anos para mulheres e 26 anos para os homens (Ministério da Saúde, 2021).

Tabela 1 - Vacinas disponíveis.

Vacina	Fabricante	Tipos de HPV
Cervarix	GlaxoSmithKline	16 e 18
Gardasil	Merck Sharp & Dohme	6, 11, 16 e 18
Gardasil 9	Merck Sharp & Dohme	6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58

Fonte: próprio autor, 2022.

O esquema vacinal adotado pela OMS, embora eficiente e necessário, é uma solução a longo prazo focada principalmente na erradicação do câncer de colo do útero. Entretanto, há uma tendência de aumento no número de casos das demais patologias associadas ao HPV, o que torna o vírus um problema de saúde pública mundial de difícil eliminação, incentivando que mais pesquisas referentes a tratamentos e prevenção sejam realizadas (CUBIE, 2013; CIANCIARULLO e SASAKI, 2019).

2 OBJETIVOS

Realizar um levantamento da produção de vacinas terapêuticas para o combate de infecções por HPV atualmente em desenvolvimento, demonstrando as possibilidades nesse campo e as perspectivas de avanço.

3 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada entre os meses de agosto e dezembro de 2021 seguindo a pergunta norteadora: “Quais vacinas terapêuticas estão em desenvolvimento atualmente em nível mundial?”.

Inicialmente foi realizada uma busca na plataforma Clinical Trials, que abriga informações de mais de 400 mil estudos. Para localizar os estudos pertinentes ao trabalho foram utilizados os filtros de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Pesquisa avançada no Clinical Trials.

Filtro utilizado	Opção/Termo selecionado
Condition or disease	HPV
Study type	Interventional Studies (Clinical Trials)
Intervention/treatment	Vaccine
Status	Not yet recruiting Recruiting Enrolling by invitation Active, not recruiting Completed

Fonte: próprio autor, 2022.

Os critérios de elegibilidade foram: estudos ainda em andamento ou que apresentaram resultados promissores com possibilidade de continuação e que apresentavam soluções terapêuticas novas. Foram eliminados os que utilizavam as vacinas já disponibilizadas ou que empregavam VLPs de L1 dos mesmos tipos de HPV.

Uma pesquisa também foi realizada no PubMed utilizando os termos: “*vaccine*”, “*therapeutic vaccine*”, “*HPV*”, “*development*” e “*human papillomavirus*”. Os termos foram utilizados de seis maneiras diferentes, resultando nas combinações: “*vaccine AND HPV AND development*”, “*vaccine AND development AND human papillomavirus*”, “*therapeutic vaccine AND HPV AND development*”, “*therapeutic vaccine AND human papillomavirus AND development*”, “*therapeutic vaccine AND HPV*” e “*therapeutic vaccine AND human papillomavirus*”

Foram selecionados os artigos que descreviam vacinas encontradas nos estudos clínicos resultantes da pesquisa no Clinical Trials, citavam o número do estudo clínico e foram publicados entre os anos de 2019 e 2021.

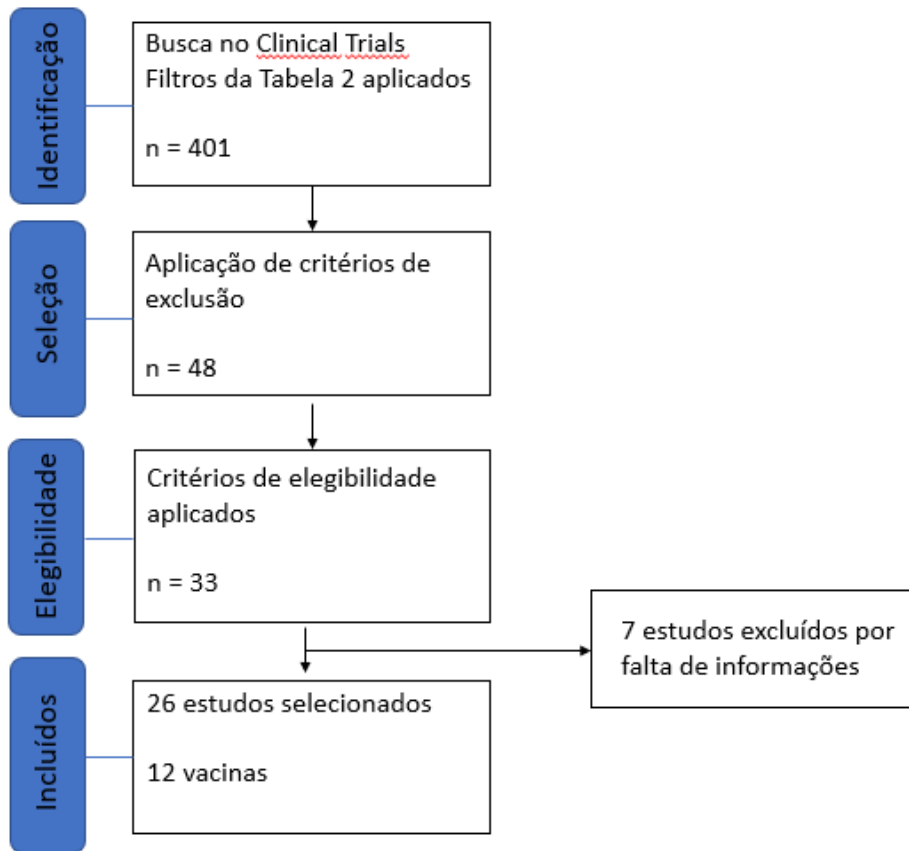
Os artigos foram primeiramente analisados pelo título e resumo. Caso respondessem à pergunta norteadora, eram filtrados pelos critérios de seleção e lidos integralmente. Os resultados mais relevantes foram utilizados para embasar a discussão.

O gerenciador de referências Mendeley foi utilizado para armazenar os artigos e evitar duplicatas.

4 RESULTADOS

A busca no Clinical Trials seguiu o fluxograma da Figura 5 e resultou em 26 estudos contemplando 12 vacinas. Os estudos e vacinas selecionados estão descritos na Tabela 3.

Figura 5 - Fluxograma de pesquisa



Fonte: próprio autor, 2022.

Tabela 3 – Estudos clínicos selecionados.

Número do estudo	Vacina	Associações	Fase do estudo	País
NCT0229105 5	ADXS11-001	Medi4736	Fase 1/2	EUA
NCT0126646 0	ADXS11-001		Fase 2	EUA
NCT0200218 2	ADXS11-001		Fase 2	EUA
NCT0285360 4	ADXS11-001		Fase 3	EUA, Brasil, Argentina, Canadá, Chile,

				Coréia do Sul, Malásia, México, Polônia, Rússia, Sérvia, Espanha, Taiwan e Ucrânia
NCT0360380 8	VGX-3100		Fase 2	EUA e Porto Rico
NCT0130452 4	VGX 3100		Fase 2	EUA, Austrália, Canadá, Estônia, Geórgia, Índia, Coréia do Sul, Porto Rico e África do Sul
NCT0318501 3	VGX-3100		Fase 3	EUA, Argentina, Bélgica, Estônia, Finlândia, Alemanha, Itália, Lituânia, México, Peru,

				Filipinas, Polônia, Portugal, Porto Rico, Eslováquia , África do Sul, Espanha, Tailândia e Reino Unido
NCT0343908 5	MEDI-0457 (INO 3112)	Durvalumab	Fase 2	EUA
NCT0213926 7	GX-188E		Fase 2	Coréia do Sul
NCT0344437 6	GX-188E	Keytruda	Fase 1/2	Coréia do Sul
NCT0078816 4	pNGVL4a- Sig/E7(detox)/HSP 70	TA – HPV imiquimod	Fase 1	EUA
NCT0012117 3	pNGVL4a- Sig/E7(detox)/HSP 70		Fase 1/2	EUA
NCT0391107 6	pNGVL4a Sig/E7(detox)/HSP 70	TA-CIN	Fase 2	EUA
NCT0418021 5	HB-201 HB - 202	nivolumab	Fase 1/2	EUA
NCT0341848 0	HPV16 RNA-LPX		Fase 1/2	Reino Unido
NCT0428786 8	PDS0101	M7824 e NHS- IL12	Fase 1/2	EUA

NCT0206597 3	PDS0101		Fase 1	EUA
NCT0426012 6	PDS0101	Pembrolizuma b	Fase 2	EUA
NCT0212812 6	ISA101/ISA101b		Fase 1/2	Bélgica, Alemanha e Países Baixos
NCT0242689 2	ISA 101	Nivolumab	Fase 2	EUA
NCT0464600 5	ISA101b	Cemiplimab	Fase 2	EUA, Bélgica, Brasil, Itália, Coréia do Sul, Países Baixos, Rússia e Espanha
NCT0325800 8	ISA101b	Utomilumab	Fase 2	EUA
NCT0439852 4	ISA101b	Cemiplimab	Fase 2	EUA, Bélgica, República Tcheca, França, Alemanha, Israel, Itália, Espanha e Reino Unido

NCT0286513 5	DPX-E7		Fase 1/2	EUA
NCT0382127 2	PepCan		Fase 1/2	EUA
NCT0513280 3	TA- CIN		Fase 1	EUA
NCT0240522 1	TA-CIN		Fase 1	EUA

Fonte: próprio autor, 2022.

5 DISCUSSÃO

5.1 Vacinas de bactéria atenuada

A utilização de bactérias como vetores vacinais, embora tenha sua segurança e eficácia discutida, é uma alternativa barata e de fácil produção em larga escala, que tem sido cada vez mais estudada por promover resposta imune inata e adaptativa (WANG et al., 2020).

Axalimogene filolisbac (ADXS11-001) utiliza a bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* recombinante como vetor. Ela foi modificada para secretar uma proteína com fragmentos de listeriolisina O (uma toxina produzida naturalmente pela bactéria, responsável por sua virulência) e um peptídeo E7 de HPV 16 (HUH et al., 2020). Além de estimular uma resposta inflamatória local, o vetor também é capaz de expressar antígenos tanto via MHC Classe I quanto MHC Classe II. Uma vantagem é que uma pré-exposição à bactéria não compromete de forma significativa a resposta imune do organismo (CLARK; TRIMBLE, 2020).

Diversos estudos utilizando esse fármaco estão em andamento. Em Fase 1/2 para pacientes com câncer cervical ou de cabeça e pescoço, a vacina está sendo estudada em associação com MEDI4736, um anticorpo monoclonal (NCT02291055). Em Fase 2 como tratamento prévio em pacientes com câncer orofaríngeo que irão realizar cirurgia para retirada do tumor (NCT02002182). Também em Fase 2 para casos de câncer cervical que não apresentam remissão após tratamento convencional ou relataram reincidências (NCT01266460) e em Fase 3 para mulheres com câncer cervical avançado e de alto risco como terapia complementar a

radioterapia/quimioterapia objetivando analisar a sobrevida (NCT02853604) (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

5.2 Vacinas de DNA

As vacinas de DNA podem induzir uma resposta imune semelhante às vacinas de vírus atenuados, levando a uma resposta celular e humoral. Com isso, tornam-se importantes para o controle de infecções estabelecidas e de regressão tumoral, sendo uma alternativa viável como vacinas terapêuticas (CORDEIRO et al., 2018; CIANCIARULLO e SASAKI, 2019).

A VGX-3100 é composta por plasmídeos que expressam as oncoproteínas E6 e E7 dos sorotipos HPV16 e HPV18. Foi desenvolvida como alternativa a procedimentos invasivos, como cirurgia e cauterização (BHUYAN et al., 2021). Ela utiliza um sistema de eletroporação, que consiste na aplicação de pulsos elétricos para aumentar a permeabilidade da membrana celular a fim de facilitar a entrada do DNA plasmídeo na célula (BRODERICK; HUMEAU, 2015). Um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego controlado por placebo de Fase 3 está sendo conduzido para determinar eficácia, segurança e tolerabilidade da vacina em mulheres adultas com neoplasia intra-epitelial cervical de grau 2 e 3 (NIC2 e NIC3) causada por HPV 16 e/ou 18 (NCT03185013). Os resultados da Fase 2 (NCT03603808 e NCT01304524) demonstraram imunogenicidade suficiente para efeito terapêutico, com resposta imune local robusta (CLARK; TRIMBLE, 2020).

MEDI-0457 (INO 3112) é uma vacina desenvolvida a partir da combinação de VGX-31000 com INO-9012, um adjuvante molecular e aplicada por eletroporação. Esse adjuvante é um plasmídeo promotor de expressão dos genes p35 e p40 que codificam a Interleucina-12 (IL-12), uma citocina que induz a maturação e função de células T (AGGARWAL et al., 2020). Um estudo em fase 1/2 (NCT03439085) foi conduzido para analisar a segurança, tolerância e imunogenicidade da vacina em combinação com o anticorpo monoclonal Durvalumab. O grupo alvo foi constituído por pacientes com câncer de cabeça e pescoço recorrente ou metastático (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

A vacina de DNA GX-188E foi desenvolvida para expressar as proteínas E6 e E7 do HPV16 e HPV18. Adicionalmente, o domínio Flt3L, uma citocina, e um ativador do plasminogênio tecidual foram incluídos com o objetivo de aumentar a apresentação

de antígeno e facilitar a entrada da proteína (KIM et al., 2014). Um estudo de Fase 2 com a vacina (NCT02139267) buscou encontrar a dosagem adequada para ser aplicada em Fase 3, além de avaliar eficácia e segurança. Observou-se ser uma vacina eficiente em pacientes com câncer cervical (CHOI et al., 2020). Outro estudo está sendo realizado com a vacina em associação com Keytruda (Pembrolizumab, um anticorpo monoclonal) (NCT03444376). A Fase 1/2 está avaliando a segurança e eficácia em pacientes com câncer cervical avançado e sem opção de cirurgia (YOUNG et al., 2020).

A pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70 (pBI-1) consiste em um vetor pNGVL4a e um peptídeo sinal (Sig) que facilita a liberação da proteína E7/HSP70. A E7(detox) é uma E7 modificada para impedir a ligação com pRb e eliminar a capacidade de transformação celular. HSP70 é uma proteína de *Mycobacterium tuberculosis* que aumenta a indução celular da resposta imune (TRIMBLE et al., 2003). Estudo de Fase I (NCT00121173) demonstrou a segurança e tolerância da vacina com um potencial terapêutico, entretanto os resultados para atestar imunogenicidade foram abaixo do esperado (TRIMBLE et al., 2009). Em associação com TA-HPV, uma vacina de vírus recombinante de Vaccinia com proteína E6 e E7 de HPV16/18, houve um aumento de células total e TCD8 E7 específicas (SUN et al., 2016). Um estudo de Fase 1 está em andamento com o objetivo de analisar os efeitos colaterais e dosagem para pacientes com câncer cervical, da combinação das vacinas pNGVL4a-Sig/E7 e TA-HPV, além do quimioterápico Imiquimod (NCT00788164). Um estudo em Fase 2 está avaliando a segurança e eficácia da vacina em conjunto com a TA-CIN em pacientes com câncer cervical (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

5.3 Vacinas de RNA

Diversos estudos têm demonstrado cada vez mais a viabilidade de vacinas baseadas em RNA. Vetores de RNA virais podem gerar expressão de antígenos recombinantes e resposta imune, possibilitando seu uso contra agentes infecciosos e células tumorais. Como o RNA mensageiro não entra no núcleo da célula e é rapidamente degradado (3 a 5 dias), acredita-se que exista uma segurança mínima. Suas vantagens também incluem uma construção rápida e processo de manufatura genérico que não requer células ou substratos de origem animal obrigatoriamente. Um ponto a ser ressaltado é que um conhecimento refinado de quais antígenos utilizar e

quais respostas imunes eles ativam é crucial para a eficiência desse tipo de vacina (LIU, 2019; WANG et al., 2020).

Um estudo de Fase 1/2 (NCT04180215) está testando a vacina HB-201/202 sem e com Nivolumab, um anticorpo anti-PD1, em pacientes HPV16+, independente da região do tumor, com preferência para aqueles que já passaram por algum tipo de tratamento. A HB-201 é baseada em um vetor de Arenavírus. Testes pré-clínicos foram promissores com aumento de linfócitos T citotóxicos específicos para HPV e diminuição de tumores (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

HPV16 RNA-LPX consiste em encapsular o RNA mensageiro em lipossomos selecionados (RNA-LPX) que são diretamente direcionados para as células dendríticas. Estudos mostraram que essa tecnologia é capaz de aumentar a resposta e induzir memória em células (GRUNWITZ et al., 2019; KRANZ et al., 2016). Um estudo de Fase 1/2 (NCT03418480) está sendo conduzido para analisar a vacina específica para HPV em pacientes HPV16+ com cânceres de cabeça e pescoço, cervical e peniano em estágio avançado (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

5.4 Vacinas de peptídeos/proteínas

Vacinas que utilizam peptídeos como base são vantajosas por terem baixo custo, serem de fácil produção e normalmente seguras e toleráveis para a maior parte da população. Para essas vacinas deve-se atentar à construção dos peptídeos de modo a determinar a melhor morfologia, para que seja induzida uma resposta imune eficiente (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

PDS0101 é uma vacina que consiste em peptídeos E6 e E7 do HPV16 e R-DOTAP, um lipídio catiônico que estimula resposta imune de CD4 e CD8. Estudos de Fase 1 (NCT02065973) demonstraram sua segurança. Atualmente, dois estudos estão sendo realizados em conjunto com outras terapias, objetivando aumentar a eficácia do tratamento e avaliar sua segurança. Um estudo em Fase 2 para casos de câncer de cabeça e pescoço e orofaríngeo em associação com Pembrolizumab (NCT04260126) e um Fase 1/2 em associação com NHS-IL12 e M7824, dois medicamentos imunoterapêuticos, para pacientes com câncer cervical, anal, orofaríngeo, vulvar ou peniano (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

A vacina ISA101/ISA101b é composta por peptídeos sintéticos, sendo 9 de E6 e 4 de E7, completando a sequência das oncoproteínas. Esses longos peptídeos são

capazes de apresentar antígenos para as células dendríticas e assim induzir respostas de CD4 e CD8 (MASSARELLI et al., 2019). Atualmente, cinco estudos estão em Fase 2. O estudo NCT02128126 analisou a vacina em conjunto com terapias convencionais em mulheres com câncer cervical avançado ou recorrente. A vacina também foi estudada em combinação com Nivolumab em pacientes com tumores sólidos HPV16+ (NCT02426892). Em associação com Cemiplimab, um anticorpo monoclonal, busca-se estimar o benefício clínico do tratamento em pacientes com câncer cervical (NCT04646005) e câncer orofaríngeo (NCT04398524). Em pacientes com câncer orofaríngeo não-tratáveis, uma associação da vacina com Utomilumab, um anticorpo monoclonal, está sendo analisada para avaliação de eficácia na diminuição do tamanho ou desaceleração do crescimento do tumor (NCT03258008) (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

A DPX-E7 é uma vacina de peptídeos curtos que utiliza um peptídeo de fusão (PF). O PF é feito a partir da fusão de um peptídeo de HPV16 E7 contendo epítipo de Linfócito T Citotóxico com um epítipo de Linfócito TCD4 auxiliar. O PF é então utilizado junto a um adjuvante (KARKADA et al., 2013). A vacina está sendo testada como um possível tratamento para câncer de cabeça e pescoço, cervical e anal em um estudo de Fase 1/2 (NCT02865135) (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

A PepCan utiliza quatro peptídeos sintéticos de HPV16 E6 juntamente com um adjuvante Candin®, um reagente com antígeno de *Candida albicans*. Um estudo em Fase 1/2 está determinando a segurança e eficácia em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (NCT03821272) (SMALLEY RUMFIELD et al., 2020).

Vacinas que utilizam como base proteínas do HPV são geralmente seguras e toleráveis com resposta imune ampla. TA-CIN utiliza uma proteína híbrida L2, E6 e E7 de HPV16. Estudos em camundongos e pessoas saudáveis demonstraram segurança e imunogenicidade (DE JONG et al., 2002). Está em Fase 1 para determinar a dose que é segura e eficaz em pacientes com câncer cervical (NCT02405221) e outro estudo de Fase 1 começará em breve para avaliar segurança e tolerância da vacina em associação com anticorpos monoclonais anti-PD-1 em pacientes com câncer HPV16+ recorrente (NCT05132803) (OLCZAK; RODEN, 2020).

6 CONCLUSÕES

As vacinas profiláticas em circulação hoje em dia têm sua segurança e eficácia amplamente comprovadas e têm desenvolvido um papel fundamental na diminuição de casos mundialmente. Porém apresentam um alcance limitado e não são capazes de gerar uma resposta imune quando a doença já está instalada, restringindo o número de pessoas beneficiadas por esses fármacos. As vacinas terapêuticas podem ser uma alternativa viável para preencher essa lacuna nos tratamentos disponíveis atualmente.

Estudos têm demonstrado resultados promissores a respeito de diversas vacinas terapêuticas. Grande parte das vacinas está associada a outros fármacos e está sendo aplicada em pacientes com poucas ou nenhuma opção de tratamento. Vacinas multiplataformas e tratamentos combinados parecem ser as opções mais viáveis no momento e um possível direcionamento para estudos futuros. Além disso, necessita-se de uma base de conhecimento mais extensa a respeito das respostas do sistema imune e dos antígenos a serem selecionados, para que o tratamento seja mais certo e personalizado a cada tipo de doença e paciente.

Ajustes ainda precisam ser feitos, mas não há dúvidas de que há um caminho a ser explorado e com pesquisas e avanços na área, pode-se ampliar as possibilidades de tratamentos mais eficazes com menos efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS¹

- AGGARWAL, C. et al. Immunotherapy targeting HPV 16/18 generates potent immune responses in HPV-Associated Head and Neck Cancer. **Clin Cancer Res**, v.25, n.1, p. 110-124, 2019. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-18-1763.
- AIRES, K.A.; CIANCIARULLO, A.M.; CARNEIRO, S.M.; VILLA, L.L.; BOCCARDO E, PÉREZ-MARTINEZ, G.; PÉREZ-ARELLANO, I.; OLIVEIRA, M.L.S.; HO, P.L. Production of HPV-16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei*. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 745-752, 2006. DOI 10.1128/AEM.72.1.745-752.2006.
- BHUYAN, P. K. et al. Durability of response to VGX-3100 treatment of HPV16/18 positive cervical HSIL. **Hum Vaccin Immunother**, v. 17, n. 5, p. 1288–1293, 2021. DOI 10.1080/21645515.2020.1823778.
- BAZAN, S.B.; CHAVES A.A.M.; AIRES, K.A.; CIANCIARULLO, A.M.; GARCEA, R.L.; HO, P.L. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Arch Virol**, v. 154, p. 1609-1617, 2009. DOI 10.1007/s00705-009-0484-8.
- BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 4, p. 321–322, 2009. DOI 10.1016/s1470-2045(09)70096-8.
- BRODERICK, K. E.; HUMEAU, L. M. Electroporation-enhanced delivery of nucleic acid vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v.14, n.2, p. 195-204, 2015. DOI 10.1586/14760584.2015.990890.
- BUCK, C. B.; DAY, P. M.; TRUS, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 169–174, 2013. DOI 10.1016/j.virol.2013.05.038.
- CHOI, Y. J. et al. A phase II, prospective, randomized, multicenter, open-label study of GX-188E, an HPV DNA vaccine, in patients with cervical intraepithelial neoplasia 3. **Clin Cancer Res**, v. 26, n. 7, p. 1616–1623, 2020. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-19-1513.
- CLARK, K. T.; TRIMBLE, C. L. Current status of therapeutic HPV vaccines. **Gynecol Oncol**, v. 156, n. 2, p. 503-510, 2020. DOI: 10.1016/j.ygyno.2019.12.017.
- CIANCIARULLO, A. M.; SZULCZEWSKI, V.; CHAVES, A. A. M.; BAZAN, S. B.; AIRES, K. A.; MÜLLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E. Production of HPV16 L1L2 VLPs in cultures of human epithelial cells. *In*: MÉNDEZ-VILAS, A.; DIAZ, J. (Eds.). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. Badajóz, Espanha: Formatex Research Center, 2010. v. 2, p 1073-1082.
- CIANCIARULLO, A.M., SASAKI, E.A.K. Processo de produção de uma composição imunológica de DNA profilática e terapêutica contra HPV e cânceres associados ao vírus, proteína híbrida, vetor de expressão, composição imunológica e seus usos. Depósito de Patente do Instituto Butantan Proc no BR 10 2019 025802-0. Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI. Rev Propr Ind 17/12/2019. <https://www.gov.br/inpi/pt-br/> / <http://revistas.inpi.gov.br/rpi/>
- CORDEIRO, M. N. et al. Current research into novel therapeutic vaccines against cervical

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

cancer. **Expert Rev Anticancer**, v.18, n.4, p. 365-376, 2018. DOI 10.1080/14737140.2018.1445527.

CUBIE, H. A. Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 21–34, 2013. DOI 10.1016/j.virol.2013.06.007.

DE JONG, A. et al. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. **Vaccine**, v.20, n. 29-30, p. 3456-64, 2002. DOI 10.1016/s0264-410x(02)00350-x.

DE MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **Int J Cancer**, v. 141, n. 4, p. 664–670, 2017. DOI 10.1002/ijc.30716.

DE OLIVEIRA, C. M.; FREGNANI, J. H. T. G.; VILLA, L. L. HPV Vaccine: Updates and Highlights. **Acta Cytol**, v. 63, n. 2, p. 159–168, 2019. DOI 10.1159/000497617.

DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human papillomavirus infection. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 47, p. 2–13, 2018. DOI 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, n.5, p. 55–70, 2012. DOI 10.1016/j.vaccine.2012.06.083.

GRUNWITZ, C. et al. HPV16 RNA-LPX vaccine mediates complete regression of aggressively growing HPV-positive mouse tumors and establishes protective T cell memory. **Oncol Immunology**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2019. DOI 10.1080/2162402X.2019.1629259.

HOPPE-SEYLER, K. et al. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. **Trends Microbiol**, v. 26, n. 2, p. 158–168, 2018. DOI 10.1016/j.tim.2017.07.007.

HUH, W. K. et al. Phase II study of axalimogene filolisbac (ADXS-HPV) for platinum-refractory cervical carcinoma: An NRG oncology/gynecologic oncology group study. **Gynecol Oncol**, v. 158, n. 3, p. 562–569, 2020. DOI 10.1016/j.ygyno.2020.06.493.

INCA – Instituto Nacional de Câncer, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 15 out. 2021.

KARKADA, M. et al. Tumor Inhibition by DepoVax-Based Cancer Vaccine Is Accompanied by Reduced Regulatory/Suppressor Cell Proliferation and Tumor Infiltration. **ISRN Oncol**, v. 2013, p. 1–13, 2013. DOI 10.1155/2013/753427.

KIM, T. J. et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. **Nat Commun**, v. 5, n. May, p. 1–14, 2014. DOI 10.1038/ncomms6317.

KRANZ, L. M. et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. **Nature**, v. 534, n. 7607, p. 396–401, 2016. DOI 10.1038/nature18300.

LIU, M. A. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. **Vaccines (Basel)**, v. 7, n.2, p.37, 2019. DOI 10.3390/vaccines7020037.

MASSARELLI, E. et al. Combining Immune Checkpoint Blockade and Tumor-Specific

Vaccine for Patients with Incurable Human Papillomavirus 16-Related Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. **JAMA Oncol**, v. 5, n. 1, p. 67–73, 2019. DOI 10.1001/jamaoncol.2018.4051.

Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hpv>. Acesso em: 03 jan. 2022.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. 3, p. 1–10, 2006. DOI 10.1016/j.vaccine.2006.05.115.

OLCZAK, P.; RODEN, R. B. S. Progress in I2-based prophylactic vaccine development for protection against diverse human papillomavirus genotypes and associated diseases. **Vaccines**, v. 8, n. 4, p. 1–22, 2020. DOI 10.3390/vaccines8040568.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/hpv-e-cancer-do-colo-do-uterio#:~:text=A%20OMS%20recomenda%20vacinar%20contra,de%209%20a%2026%20anos>. Acesso em: 15 nov. 2021.

SAKAUCHI D, SASAKI EAK, BOU ANNI FO, CIANCIARULLO AM. Production of HPV16 capsid proteins in suspension cultures of human epithelial cells. **World J Adv Res Rev**, v.9, p.258–268, 2021. DOI 10.1101/2020.10.28.359273.

SMALLEY RUMFIELD, C. et al. Therapeutic Vaccines for HPV-Associated Malignancies. **Immunotargets Ther**, v.9, p. 167–200, 2020. DOI 10.2147/ITT.S273327.

STATES, M. et al. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 92, n. 19, p. 241–268, 2017.

SUN, Y. Y. et al. Local HPV Recombinant Vaccinia Boost Following Priming with an HPV DNA Vaccine Enhances Local HPV-Specific CD8+ T-cell-Mediated Tumor Control in the Genital Tract. **Clin Cancer Res**, v. 22, n. 3, p. 657–669, 2016. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-15-0234.

TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Semin Cancer Biol**, v. 26, p. 13–21, 2014. DOI 10.1016/j.semcancer.2013.11.002.

TRIMBLE, C. et al. Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. **Vaccine**, v. 21, n. 25–26, 2003. DOI 10.1016/s0264-410x(03)00275-5.

TRIMBLE, C. L. et al. A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+Cervical intraepithelial neoplasia 2/3. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 1, p. 361–367, 2009. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-08-1725.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 175–186, 2013. DOI 10.1016/j.virol.2013.04.017.

WANG, R. et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. **Cancer Lett**, v.471, p.88-102, 2020. DOI 10.1016/j.canlet.2019.11.039.

YAZDANI, Z. et al. Designing a potent L1 protein-based HPV peptide vaccine: A bioinformatics approach. **Comput Biol Chem**, v. 85, n. January, 2020. DOI 10.1016/j.compbiolchem.2020.107209.

YOUN, J. W. et al. Pembrolizumab plus GX-188E therapeutic DNA vaccine in patients with

HPV-16-positive or HPV-18-positive advanced cervical cancer: interim results of a single-arm, phase 2 trial. **Lancet Oncol**, v. 21, n. 12, p. 1653–1660, 2020. DOI 10.1016/S1470-2045(20)30486-1.

APÊNDICE A – TREINAMENTO TÉCNICO

Além do trabalho de pesquisa bibliográfica, foi realizado um treinamento técnico no Laboratório de Biotecnologia Viral do Instituto Butantan durante os meses de julho a dezembro de 2021. O treinamento consistiu no aprendizado de técnicas que visavam avaliar a expressão das proteínas L2 e E6 de HPV16 em células HEK 293T modificadas, através da transfecção celular com vetor plasmideal construído com sequências gênicas selecionadas de ambas as proteínas fusionadas (CIANCIARULLO e SASAKI, 2019).

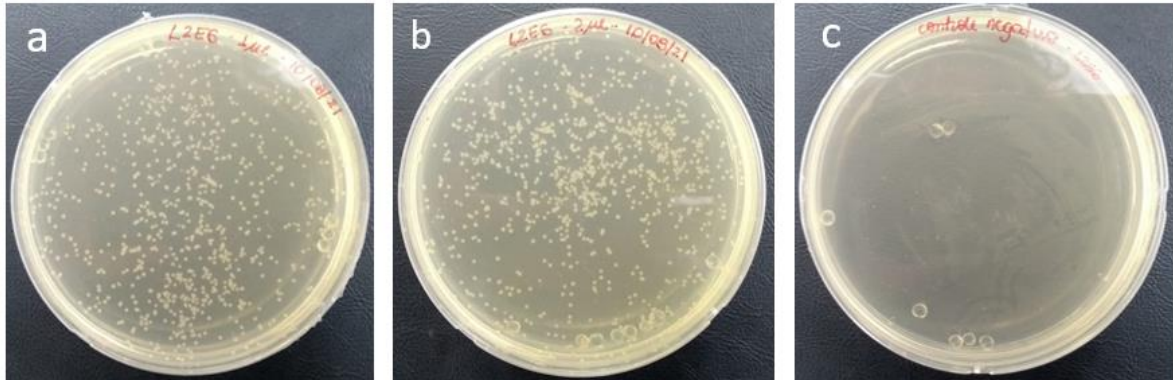
Transformação bacteriana

O vetor de DNA plasmideal com a sequência escolhida foi construído com sítios de restrição HINDIII e NheI flanqueando a sequência de L2E6. O plasmídeo também continha gene de resistência a Ampicilina.

Para a transformação bacteriana foram utilizadas cepas de *E. coli* DH5-alfa quimiocompetentes. Três placas de Petri foram montadas com meio LB + ágar + Ampicilina (100µg/ml). A Ampicilina é adicionada ao meio para impedir o crescimento de bactérias que não incorporaram o vetor, favorecendo o crescimento das bactérias transformadas. A placa 1 utilizou 1µl do vetor para 50µl de bactéria, a placa 2 utilizou 2µl do vetor para 50µl de bactéria e a placa 3 foi o controle negativo com apenas 30µl de bactéria, sem o vetor.

O procedimento foi feito através de *heat shock* para facilitar a entrada do plasmídeo na bactéria. A bactéria com o DNA adicionado foi colocada por 30 minutos no gelo, depois 1 minuto em banho-maria a 42°C e 2 minutos no gelo novamente. Ela foi então estriada nas placas e incubada em estufa a 37°C overnight. Ambas as concentrações do vetor utilizadas possibilitaram o crescimento das bactérias transformadas como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Crescimento bacteriano após transformação



Fonte: próprio autor, 2021. a) placa 1; b) placa 2; c) placa 3

Extração de DNA plasmideal

Dois clones foram selecionados aleatoriamente e denominados C1 e C2. Para cada um foi realizado um inóculo em 100ml de LB + 100µl de Ampicilina em um Erlenmeyer de 500ml. Os dois Erlenmeyers foram colocados sob agitação a 250rpm e temperatura de 37°C overnight. No dia seguinte, 5ml de cada foram separados e armazenados em geladeira para serem utilizados na Maxiprep e o restante foi utilizado para a Midiprep. Foi realizado o protocolo do kit Plasmid DNA Midiprep (ThermoFisher) para os dois clones. A quantificação foi realizada por aparelho de Qubit utilizando o kit Qubit™ dsDNA BR Assay (ThermoFisher) e o clone com maior rendimento foi selecionado para a realização da Maxiprep.

O inóculo para a Maxiprep foi preparado vertendo os 5ml separados do C2 em um Erlenmeyer contendo 300ml de LB + 300µl de Ampicilina. A solução foi colocada sob agitação a 250 rpm e 37°C overnight. No dia seguinte, foi realizado o protocolo de Maxiprep do kit Plasmid Maxi (QIAGEN). A quantificação foi realizada por aparelho de Qubit utilizando o kit Qubit™ dsDNA BR Assay (ThermoFisher). O resultado da Maxiprep foi satisfatório com um rendimento acima do esperado de DNA.

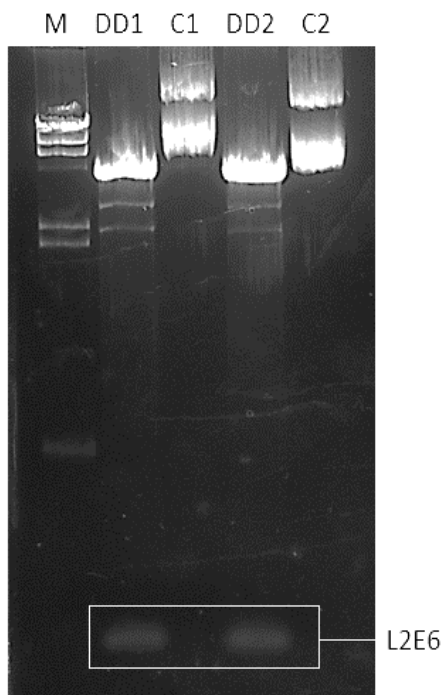
Confirmação do DNA

Para a confirmação do DNA, após a Midiprep (Figura 7) e Maxiprep foram realizados PCR e dupla digestão. A PCR foi realizada utilizando as amostras e um controle negativo da reação (apenas a amostra não era adicionada).

A dupla digestão utilizou as enzimas HINDIII e NheI e o buffer Tango. Foram utilizados 10µl de DNA, 1µl de cada enzima, 1,5µl de buffer Tango e 1,5µl de água Miliq. A mistura ficou em banho maria por 4 horas.

Um gel de agarose a 0,8% foi utilizado para aplicação das amostras de PCR e dupla digestão. O gel foi colocado em cuba preenchida com TAE 1x a 75v por 4 horas. As bandas no gel indicaram que o DNA era do plasmídeo de interesse.

Figura 7 - Fotodocumentação do gel de agarose submetido a eletroforese para confirmação de DNA plasmideal



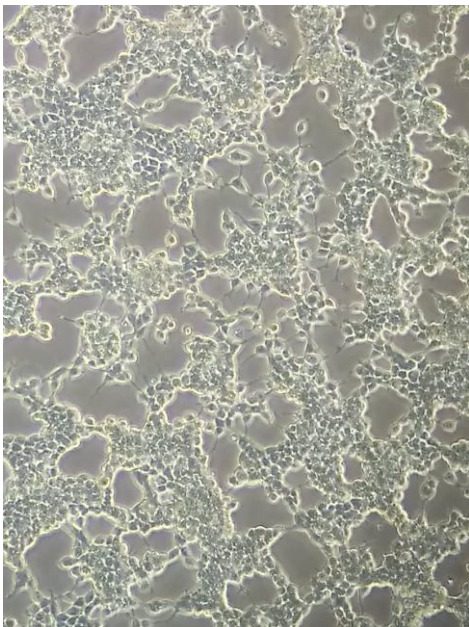
Fonte: próprio autor, 2021. Fotodocumentação (Uvitec Cambridge) realizada após dupla digestão do DNA obtido da Midiprep. Onde (M) representa o marcador Lambda DNA/HindIII, (DD1) o resultado da dupla digestão do clone 1, (C1) o DNA do clone 1 íntegro, (DD2) o resultado da dupla digestão do clone 2 e (C2) o DNA do clone 2 íntegro. As bandas destacadas representam o fragmento de interesse L2E6.

Linhagem celular

Células HEK 293T do banco disponível no laboratório foram descongeladas em garrafas T25 contendo 4ml de meio DMEM + 10% Soro Fetal Bovino e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Como as células não tiveram uma boa aderência no dia seguinte, elas foram centrifugadas a 2.500rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido com 1ml de meio e então adicionado a uma garrafa T25 nova com 4ml de meio.

As células foram repicadas a cada dois dias, quando a confluência atingia 90%. Após um repique, as células foram passadas para garrafa T75 (Figura 8). A contagem foi realizada a cada repique. O meio foi retirado e descartado. Duas lavagens com PBS a 1x foram feitas e Tripsina 1x foi adicionada para desprender as células da parede da garrafa. Após 4 minutos foi adicionado meio para neutralizar o efeito da Tripsina. A contagem foi então realizada com 30µl de células + 260µl de PBS 1x + 10µl de Trypan Blue, em câmara de Neubauer. O inóculo foi realizado de acordo com o objetivo.

Figura 8 - Células HEK 293T cultivadas no laboratório



Fonte: próprio autor, 2021. Células HEK 293T cultivadas em laboratório fotografadas em microscópio (Olympus CK2) com aumento de 100x.

Transfecção celular

O DNA extraído da Maxiprep foi esterilizado com clorofórmio em proporção 1:1. O ensaio de transfecção foi realizado seguindo o protocolo da Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) com o DNA esterilizado e as células HEK 293T cultivadas. As células foram contadas e coletadas nos períodos de 24h e 48h. As amostras foram armazenadas a -80°C.

As células foram lisadas utilizando tampão T4. Dot blot e gel SDS foram realizados, porém os resultados não foram conclusivos para gerar uma discussão. Não houve tempo hábil para a repetição desses últimos experimentos, entretanto os resultados que foram obtidos anteriormente ressaltam a importância da continuidade do trabalho. Para tanto, são necessários novos experimentos para o aprofundamento das pesquisas sobre o desenvolvimento de um protótipo vacinal de ação profilática e terapêutica, para combater eficazmente os cânceres associados ao HPV.