



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0708383-1 A2**

(22) Data de Depósito: 28/02/2007
(43) Data da Publicação: 24/05/2011
(RPI 2107)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/10 2006.01

(54) Título: **ANTÍGENO VACINAL QUIMÉRICO CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIO E COMPOSIÇÃO DE VACINA CAPAZ DE PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA EM AVES E EM MAMÍFEROS**

(30) Prioridade Unionista: 28/02/2006 CU 2006-0051

(73) Titular(es): Centro de Ingenieria Genetica Y Biotecnologia

(72) Inventor(es): Carlos Guillermo Borroto Nordelo, Damarys Diaz Archer, Jorge Roberto Toledo Alonso, Maria Pilar Rodríguez Moltó, Nancy Elena Figueroa Baile, Oliberto Sánchez Ramos

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT CU2007000009 de 28/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/098718de
07/09/2007

(57) Resumo: ANTÍGENO VACINAL QUIMÉRICO CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA E COMPOSIÇÃO DE VACINA CAPAZ DE PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA EM AVES E EM MAMÍFEROS A presente invenção descreve antígenos vacinais quiméricos contra o vírus da influenza aviária (IA). Os referidos antígenos vacinais são baseados em subunidades virais que estão acopladas a moléculas protéicas estimuladoras do sistema imune, tanto celular como humoral. Os antígenos quiméricos podem ser produzidos em sistemas de expressão que garantem um correto dobramento tridimensional das moléculas quiméricas que constituem a base da presente invenção. As composições vacinais que contêm os referidos antígenos quiméricos induzem uma resposta imune potente e temporã tanto nas aves quanto nos mamíferos vacinados, estimulando altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação e uma potente resposta celular específica contra o antígeno viral. Os antígenos quiméricos, assim como as composições vacinais resultantes são aplicáveis à esfera da saúde humana e animal, como vacinas para uso preventivo.

“ANTÍGENO VACINAL QUIMÉRICO CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA E COMPOSIÇÃO DE VACINA CAPAZ DE PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA EM AVES E EM MAMÍFEROS”

5 **Campo da técnica**

A presente invenção se refere ao campo da medicina humana e veterinária, particularmente com novos antígenos quiméricos que compreendem subunidades virais do vírus da GA, acoplados a moléculas protéicas estimuladoras do sistema imune celular e humoral, e desenvolvem
10 tanto em aves quanto em mamíferos uma resposta imune potente e rápida contra o referido vírus.

Estado da técnica Anterior

A gripe aviária (GA) é uma doença respiratória distribuída mundialmente. Esta doença altamente contagiosa pode afetar frangos, perus,
15 patos, gansos, galinhas d'angola, bem como uma ampla variedade de pássaros ou aves silvestres. Existe a possibilidade de que todas as espécies aviárias sejam suscetíveis à infecção, sendo as espécies aquáticas migratórias, o principal reservatório natural do vírus que causa esta doença.

A infecção pelos vírus da gripe aviária nas aves de criação
20 domésticas provoca duas formas de doença que se distinguem segundo seu nível alto ou baixo de virulência. A forma “patogênica baixa” pode passar despercebida e em geral só produz sintomas leves (tais como penas arrepiadas e uma diminuição da produção de ovos). No entanto, a forma altamente patogênica se propaga mais rapidamente entre as aves de criação. Esta forma
25 pode causar doenças que atacam múltiplos órgãos internos e tem uma taxa de mortalidade que pode atingir até o 90-100% em um período de 48 horas.

O vírus responsável da GA pertence à família *Orthomyxoviridae*. Os vírus influenza são divididos nos tipos A, B e C com base em suas diferenças antigênicas. Seu material genético é ácido

ribonucléico (RNA) de polaridade negativa, segmentado. Os vírus influenza A e B têm 8 segmentos, enquanto o vírus influenza C só tem 7 segmentos. O fato de que o genoma viral seja segmentado favorece a recombinação genética, dando lugar a um vírus com características diferentes do original (Capua; Alexander (2004) Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol.* 33: 393-404).

O envoltório viral contém duas glicoproteínas, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA). A proteína HA é a proteína de união ao receptor celular, favorece a fusão do envoltório do vírus com a membrana celular, importante para a penetração do vírus na célula alvo. Esta proteína induz uma resposta de anticorpos neutralizantes. As mutações na proteína HA provocam variações antigênicas de maior ou menor grau. A proteína NA corta o ácido siálico das células do hospedeiro, favorecendo a liberação do vírus das células, degrada o muco e facilita o acesso do vírus ao tecido. A NA do vírus influenza A também experimenta mudanças antigênicas.

Normalmente, os vírus da gripe aviária não infectam a outras espécies fora as aves e os porcos. O primeiro caso de infecção humana por um vírus de gripe aviária foi documentado em Hong Kong, em 1997, quando a cepa H5N1 ocasionou uma doença respiratória severa em 18 indivíduos, dos quais seis faleceram. A infecção dos indivíduos coincidiu com uma epidemia de gripe aviária altamente patogênica na população avícola de Hong Kong, produzida pela mesma cepa. Em fevereiro de 2003 se produziu uma nova alerta em Hong Kong, quando um surto de gripe aviária H5N1 ocasionou uma morte entre membros de uma família que tinha viajado recentemente ao sul da China. Outro menor da família faleceu durante a dita visita, mas se desconhece a causa de sua morte.

Recentemente, outras duas cepas virais da GA causaram doença em humanos. Em Hong Kong, em 1999 produziram dois casos leves da H9N2 em meninos e em meados de dezembro de 2003 se reportou outro

caso. O subtipo H9N2 em aves comumente não é altamente patogênico. No entanto, um surto de vírus influenza aviária H9N2 altamente patogênico, que se iniciou na Holanda em fevereiro de 2003, causou dois meses depois, a morte de um veterinário e doença leve em outras 83 pessoas.

5 Desde 1997 até esta data, os surtos de gripe aviária capazes de infectar o ser humano foram mais freqüentes, e se disseminaram por um grande número de países de Ásia e Europa. Até o momento, a cepa H5N1 foi o principal causador de gripe em seres humanos. Até outubro do 2005 tinham se reportado ao torno de 200 pessoas infectadas pelo H5N1, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 55%. Treze países da Ásia e Europa foram
'0 afetados, e mais de 120 milhões de aves morreram ou colocadas em quarentena. Por regra geral, cada surto da GA, conduz ao sacrifício de centenas de milhares de aves e à adoção de medidas de controle sanitário, tudo o que se traduz em grandes perdas econômicas.

15 Durante um surto de gripe aviária entre aves de criação, existe o risco de que sejam contaminadas pessoas que têm contato com aves infectadas ou com superfícies que estão contaminadas com secreções e excreções das referidas aves. A disseminação da infecção entre as aves aumenta as oportunidades de infecção direta dos humanos. Se mais pessoas
20 adquirem a infecção, com o passar do tempo também aumenta o risco de que as pessoas, se estão infectadas conjuntamente por cepas de gripe aviária e de influenza humana, também poderiam servir de “recipientes de mistura” para o surgimento de um novo subtipo. Este novo subtipo, com suficientes genes do vírus influenza humana, poderia se transmitir facilmente de pessoa a pessoa, e
25 se transformaria assim em uma cepa pandêmica plenamente transmissível, como a variante de H1N1 que em 1918 gerou uma pandemia conhecida como “gripe espanhola”, na qual morreram entre 25 e 50 milhões de pessoas.

Uma prioridade imediata é deter a disseminação adicional de epidemias entre as populações de aves. Esta estratégia é efetiva para reduzir

as oportunidades de exposição humana ao vírus. A vacinação das pessoas com alto risco de exposição a aves infectadas, utilizando as vacinas efetivas contra as cepas de vírus da influenza atualmente em circulação, podem reduzir a probabilidade de co-infecção humana por cepas de gripe aviária e humana, e assim reduzir o risco de que se produza intercâmbio genético entre ambas cepas virais.

Na atualidade, tanto para a prevenção da doença em humanos quanto em aves, os processos para produzir vacinas contra a gripe se baseiam na propagação do vírus em embriões de frango. Posteriormente, os vírus produzidos por esta via são quimicamente inativados e semipurificados. No entanto, a referida tecnologia é incapaz de responder a uma possível crise pandêmica. Mediante este procedimento, o desenvolvimento e produção de uma vacina toma vários meses. Depois de identificar uma cepa potencial, requer sua reabsorção com uma cepa altamente produtora para obter as propriedades de crescimento adequadas. Mais importante ainda é que as cepas H5 responsáveis pelas recentes epizootias, encontram-se associadas a numerosos casos de infecção em humanos e resultam letais nos embriões de frango que são usados para a produção de vacinas. A produção destas vacinas implica, adicionalmente, a manipulação de cepas patogênicas. Por esta causa faz-se necessário o trabalho sob condições de contenção BL3 com o conseqüente encarecimento do processo e as dificuldades para produzir um **aumento** em caso de crise.

Demonstrou-se que pessoas com alergias severas ao ovo podem sofrer reações imediatas de hipersensibilidade, devido às proteínas de ovo residuais nas preparações vacinais contra a influenza. Em 1976 a vacina contra a influenza suína foi associada a um incremento na freqüência da síndrome de Guillain-Barre (Schonberger et al. (1979) Syndrome following vaccination in the national influenza immunization program, United States, 1976-1977. *Am. J. Epidemiol.* 110:105-23). Até o momento, não se observou

um incremento na ocorrência desta doença com os subseqüentes preparados vacinais a partir de outras cepas.

A produção de vírus baseada em cultivos celulares emergiu como uma alternativa atrativa para substituir os sistemas de produção em embriões de frango. A referida estratégia implica a produção do vírus influenza em cultivos celulares, seguida de um passo de inativação viral e purificação. Este procedimento tem como vantagens que: 1) os cultivos celulares são fáceis de manipular e podem ser **aumentados** em um curto período de tempo, 2) as vacinas de influenza produzidas nestes sistemas foram avaliadas em ensaios clínicos Fase I e Fase II, e demonstrou que são seguras e ao menos tão efetivas quanto as produzidas em embriões de frangos (Brands et al. (1999) Influvac: a safe Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cell culture based influenza vaccine. *Dev Biol Stand.* 98:93-100; Percheson et al. (1999) A Phase I, randomized controlled clinical trial to study the reactogenicity and immunogenicity of a new split influenza vaccine derived from a non-tumorigenic cell line. *Dev Biol Stand.* 98:127-32; Alymova et al. (1998) Immunogenicity and protective efficacy in mice of influenza B virus vaccines grown in mammalian cells or embryonated chicken eggs. *J Virol.* 72:4472-7). Esta estratégia no entanto, ainda tem como limitação requerem de vírus reabsorvidos que permitam altos rendimentos. O processo também poderia introduzir mutações específicas da linha celular nos genes virais, o que em princípio, poderia conduzir à seleção de variantes caracterizadas por mudanças antigênicas e estruturais na proteína HÁ, resultando potencialmente em vacinas menos eficazes (Meiklejohn et al. (1987) Antigen drift and efficacy of influenza virus vaccines. *J Infect Dis.* 138:618-24; Robertson et al. (1985) Alterations in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. *Virology* 143: 166-74; Schild et al. (1983). Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature* 303: 706- 9). Entre as limitações adicionais se incluem: 1) a produção

e manipulação de vírus patogênicos demandam instalações de alta contenção; 2) os sistemas de produção baseados em cultivos celulares geralmente são caros e tecnicamente exigentes.

A proteção contra o vírus influenza é o resultado da resposta imune contra a proteína HA, da qual existem 15 diferentes tipos, e em menor medida contra a proteína NA, da qual existem 9 subtipos reportados (Suarez; Schultz (2000) *Immunology of avian influenza virus: a review. Dev. Comp. Immunol.* 24: 269- 283; Swayne; Halvorson. (2003) *Influenza*. In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J. R., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (Eds.), *Diseases of Poultry*, 11^a ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 135-160). As respostas imunes contra as proteínas internas, tais como a nucleoproteína ou a proteína da matriz, são insuficientes para garantir proteção no terreno. Praticamente a proteção é prevista pelo subtipo específico de HA incluindo na vacina.

Produziram-se vacinas contra a GA, mediante a inserção do gene que codifica para a HA em vetores virais vivos, e o posterior uso destes vetores recombinantes para imunizar a massa aviária. O emprego da vacina baseada em vetores virais recombinantes vivos tem várias vantagens: 1) São vacinas vivas capazes de uma resposta tanto humoral quanto celular, 2) podem ser administrados em aves jovens e induzem uma proteção rápida. Por exemplo, uma vacina recombinante baseada no vírus de Fowlpox pode-se administrar em aves de 1 dia de idade e induzir proteção contra a doença de Marek uma semana depois (Arriola et al. (1999) *Experiencias de campo em el uso de vacunos contra influenza aviar*. In; *Proceedings Curso de Enfermedades Respiratorias de las Aves*, Asociación Nacional de Especialistas em Ciencias Avícolas: 3-13). Este tipo de vacina facilita a diferenciação entre aves vacinadas e infectadas, pois não induz anticorpos contra os antígenos como a nucleoproteína ou a matriz, que são comuns para os vírus de IA. No entanto, estas vacinas têm como limitante poderem

responder pobremente e induzir uma imunidade protetora parcial em aves que já possuem anticorpos contra o vetor viral recombinante, os que são capazes de neutralizar sua função vacinal (Lyschow et al. (2001) Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. *Vaccine* 19: 4249-4259; Swayne et al. (2000) Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Dis.* 44: 132-137).

10 Quando os vetores virais recombinantes são empregados em aves jovens, então o efeito dos anticorpos maternos pode variar, em dependência do tipo de vetor viral empregado, e dos níveis de anticorpos maternos transferidos. Outra limitação no emprego de vetores vivos recombinantes é que a casta de hospedeiros está restringido (por exemplo, o vírus da laringotraqueíte

15 infecciosa não responde em perus), e em consequência estas vacinas estão restringidas a espécies nas quais a eficácia foi demonstrada.

A geração de candidatos vacinais efetivos contra a influenza requer de mudanças significativas que garantam uma rápida resposta ante uma possível pandemia. O emprego de vacinas de subunidades, baseadas

20 fundamentalmente no emprego da HA recombinante, constitui uma alternativa muito atraente se for levado em conta que esta estratégia não envolve a manipulação do vírus patogênico, e em consequência, não requer trabalho em condições de contenção. Os anticorpos contra a HA são capazes de neutralizar o vírus e constituem a base da imunidade natural frente a

25 infecções com influenza (Clements (1992) "Influenza Vaccines", in *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*, ed. Ronald W. Ellis, pp. 129-150 (Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA). A HA está presente no envoltório do vírus em forma trimérica. Cada monômero existe como duas cadeias HA1 e HA2, unidas por uma simples ponte dissulfeto. HA é

produzida na célula hospedeira como um polipeptídeo precursor glicosilado, com uma massa molecular de aproximadamente 85 kDa, o qual é subseqüentemente dividido em HA1 e HA2. As variações antigênicas na molécula de HA são responsáveis pela ocorrência de surtos de influenza e do limitado controle da infecção pós-imunização. Até a presente data se descreveram métodos onde se empregam os sistemas de expressão baseados em baculovírus para a produção de HA recombinante, como potencial vacina de subunidades contra a gripe (Smith et al. US 5.858.368; Smith et al. US 6.245.532). A HA produzida em células de insetos foi avaliada, tanto em humanos (em ensaios clínicos Fase I e Fase II) quanto em aves de criação, demonstrando em ambos casos sua segurança. Este tipo de vacina, no entanto, não resultou em muito êxito, devido fundamentalmente aos baixos títulos de anticorpos neutralizantes que é capaz de induzir. A HA sozinha, como antígeno vacinal, possui uma antigenicidade muito baixa que se reflete em baixos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação e em uma resposta celular consideravelmente reduzida. Por causa de sua baixa antigenicidade, a indução de uma resposta imune eficaz com este antígeno requer a administração de altas doses, e freqüentemente, múltiplas re-administrações. Estes inconvenientes fazem com que, para suprir a demanda de uma vacina efetiva contra a GA, requeiram-se volumes de produção muito elevados com os conseqüentes custos associados a qualquer sistema de produção baseado em cultivos celulares. Em adição a estas limitações, é necessário levar em conta a complexidade técnica e os custos adicionais que derivam da necessidade de administrar múltiplas doses de uma vacina determinada na indústria avícola, onde o número de animais a imunizar em uma simples unidade pode atingir as dezenas de milhares.

Portanto, um importante problema na prevenção da GA é que não existem, até a data, vacinas por subunidades que sejam capazes de produzir uma resposta imune rápida e potente depois da vacinação, e que ao

mesmo tempo permitam uma relação custo/benefício favorável.

Explicação da invenção

A presente invenção resolve o problema antes mencionado, ao proporcionar antígenos quiméricos de interesse vacinal contra o vírus da GA, caracterizados por conter o segmento extracelular da HA do envoltório do vírus da GA e o segmento extracelular de molécula CD154, o que propicia o desenvolvimento de uma rápida resposta que protege mamíferos e aves da infecção pelo vírus da IA. A obtenção dos ditos antígenos vacinais não requer a propagação em ovos, o que dá como produto uma vacina mais pura, com menores reações imunes adversas. Além disso, não requer inativação viral ou extração dos componentes da membrana do vírus, evita a desnaturalização dos epitopos antigênicos e outras desvantagens relativas à segurança em humanos, pelos resíduos de reativos químicos na vacina. Além disso, uma vacina de influenza produzida em ausência de ovo evita a heterogeneidade que ocorre durante a adaptação e passe por ovos. Isto resulta em uma vacina que se ajusta melhor às cepas epidêmicas de influenza, o que implica uma maior eficácia.

Em uma materialização da invenção, emprega-se uma variante secretável da HA a qual lhe dividiu o domínio transmembranário e o domínio citoplasmático. A variante secretável da HA está preferivelmente unida a uma sequência estimuladora do sistema imune (adjuvante molecular) que garante a obtenção de altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus de influenza.

Em uma realização preferida o antígeno vacinal quimérico se caracteriza por conter, essencialmente, as sequências aminoácidas do segmento extracelular da molécula CD154 de origem aviária, suína ou humana, identificadas na Listagem de sequências com a identificação de sequência (Id. Sec.) Não. 6, Id. Sec. No. 8 e Id. Sec. No. 4, respectivamente.

Em uma materialização da invenção, o antígeno vacinal

quimérico se caracteriza por conter, essencialmente, as seqüências aminoácidas do segmento extracelular da HA dos subtipos virais H5 (Id. Sec. No. 2), H7 (Id. Sec. No. 9) e H9 (Id. Sec. No. 10).

5 No contexto desta invenção o termo “essencialmente” se refere a que a seqüência aminoácida que faz parte do antígeno quimérico tenha um elevado grau de homologia com as seqüências enumeradas, mas que, pela alta variabilidade deste antígeno, qualquer seqüência aminoácida proveniente da HA do vírus da GA possa fazer parte dos antígenos quiméricos objeto da presente invenção. Os ditos antígenos quiméricos incluem, mas não se
10 limitam ao subtipo A prevalente (H5N1), ao subtipo H9N1, a isolados do subtipo viral H7, ao tipo B que infeta humanos, assim como os vírus de influenza que infetam outras espécies de mamíferos e aves.

Para o propósito da presente invenção, os antígenos quiméricos se obtêm por via recombinante, sintética ou mediante conjugação
15 química. As seqüências codificantes para a HA poderão ser geradas mediante as técnicas convencionais de reverso-transcrição e subsequente reação em cadeia da polimerase (RCP). No entanto, em uma realização da presente invenção, as seqüências codificantes para a HA são totalmente sintéticas o que garante dispor da seqüência de interesse em um período de tempo
20 consideravelmente curto, sem necessidade de trabalhar sob as condições de contenção requeridas para o trabalho com o vírus patogênico. O emprego de seqüências sintéticas permite, além disso, a otimização do uso de códons, de acordo com o sistema de expressão que se deseja utilizar. De forma similar, o desenho de genes de HA sintéticos permite a incorporação de mutações
25 pontuais que se traduzam em mudanças na estrutura primária da proteína, com o fim de incrementar sua antigenicidade.

Em uma realização preferida, o antígeno quimérico é um heterodímero composto pelas subunidades HA1 e HA2, em cujo extremo C-terminal está fusionado um peptídeo de seis histidinas que facilita a

purificação da proteína recombinante com um nível de pureza superior ao 98%. A continuação, no extremo C-terminal da fila de histidina, funde-se um peptídeo espaçador composto por quatro unidades repetidas de Gly₄Ser (4G₄S). No extremo C-terminal do peptídeo espaçador estará fusionado o domino extracelular da molécula CD154 como adjuvante molecular. O peptídeo 4G₄S localizado entre as duas moléculas de HA e CD154, busca dar a liberdade estérica suficiente a ambas moléculas para atingir a correta conformação tridimensional.

A molécula quimérica HA-CD154 objeto desta invenção pode ser um trímero constituído pela união não covalente de três polipeptídeos HA-CD154. No entanto, em dependência do sistema de expressão empregado, cada um dos monômeros HA-CD154 poderá se dividir em duas moléculas (HA1 e HA2/CD154) gerando moléculas heterodiméricas, as quais se podem unir para conformar trímeros dos heterodímeros HA1-HA2/CD154. A trimerização nestas moléculas é determinada pela seqüência aminoácida correspondente ao domínio extracelular da molécula de CD 154. A estrutura trimérica do antígeno vacinal objeto desta invenção é de grande importância para a interação da molécula quimérica com o receptor CD40 na superfície das células apresentadoras de antígeno do sistema imune. Uma vez liberado na corrente sanguínea, o antígeno vacinal desta invenção interage especificamente com os receptores CD40 na superfície das células apresentadoras de antígeno do sistema imune. Depois da interação com os receptores CD40, a molécula quimérica HA-CD154 é internalizada pelas células dendríticas do sistema imune. A molécula quimérica é então processada e apresentada no contexto do sistema de sistema maior de histocompatibilidade (em inglês “Major Histocompatibility Complex”, abreviado MHC) classe I. De forma simultânea, ocorre uma indução dos sinais de estimulação secundários (CD80 e CD86) e do receptor de quimocina CCR-7 na célula dendrítica, o que conduz a sua migração aos nódulos

linfáticos regionais. Estes eventos induzem níveis incrementados de linfócitos T citotóxicos específicos contra a HA.

5 A proteína quimérica HA-CD154 é capaz também de interagir especificamente com as células B. A interação inicial da HA com a molécula de IgM na superfície da célula B facilita a interação da porção de CD 154 da molécula quimérica com os receptores CD40 na superfície da célula B antígeno-específica. Esta estimulação na célula B induz a internalização da molécula quimérica, seu processamento e sua exposição no contexto do MHC classe II. Estes eventos conduzem à ativação dos linfócitos T CD4+ e à
10 subsequente ativação de uma resposta T auxiliadora tipo dois que induz a mudança de classe das imunoglobulinas nas células B, sua maturação e proliferação.

Em uma realização preferida da invenção, o antígeno vacinal quimérico é obtido a partir do leite de mamíferos geneticamente modificados.
15 O antígeno vacinal objeto desta invenção será preferencialmente produzido no leite de mamíferos durante o processo de lactação. Com este fim, a produção pode se realizar no leite de animais transgênicos, nos quais a seqüência codificante para a proteína de interesse é inserida sob o controle de promotores específicos da glândula mamária, ou mediante a transformação direta do epitélio glandular mamário de animais não transgênicos mediante o
20 emprego de vetores adenovirais. Em outra realização preferida, os antígenos quiméricos baseados na HÁ fusionada no domínio extracelular da molécula CD154 se produzem no meio de cultivo de fermentos geneticamente modificados, ou em cultivos de células de mamíferos transduzidos com um
25 vetor adenoviral contendo o gene em questão.

São também objeto da presente invenção, as composições vacinais capazes de produzir uma resposta imune protetora contra o vírus da GA em aves e em mamíferos, que contêm os antígenos quiméricos anteriormente descritos. Em uma realização particular da invenção as ditas

composições vacinais produzem uma resposta imune protetora contra o vírus da GA em aves, em porcos e em humanos. A composição vacinal pode ser administrada nos animais incluindo no homem, de forma preventiva, por rota sistêmica ou mucosal. Mediante a vacinação com as ditas composições se evitam as grandes perdas humanas, materiais e econômicas que são produzidas depois da infecção pelo vírus da GA.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1. Expressão dos antígenos HA e HACDp no leite de cabras transduzidas com os vetores adenovirais AdHA e AdHACDp, respectivamente. As proteínas presentes nas amostras de soro de leite, correspondentes ao dia 5 pós-transdução adenoviral, se separaram mediante SDS-PAGE a 7,5% em condições redutoras (●) ou não redutoras (▲). A imunoidentificação dos antígenos HA e HACDp foi realizada mediante “Western-blot” com um soro de frango hiperimune contra uma cepa H5N3.

Figura 2. Análise de expressão de clones transformantes de *P. pastoris* que mostram um fenótipo Mut^s. “Western Blot” das proteínas de interesse presentes no sobrenadante de cultivo. Faixa 1: HA; Faixa 2: HACDh; Faixa 3: MP36 não transformada; Faixa 4: Padrão de peso molecular.

Figura 3. Comparação da resposta imune em frangos vacinados com as variantes HA e HACDp. (A) Tomaram-se 8 grupos experimentais com 10 frangos cada um, os grupos receberam uma única dose subcutânea de 1, 3, 6 ou 12 µg de HA ou HACDp. No dia 28 pós-vacinação determinou-se os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação. Os resultados são mostrados como a média aritmética +/- o desvio padrão em cada um dos grupos. (B) Cinética de anticorpos inibidores da hemaglutinação em frangos vacinados com 6 µg de HA e HACDp. Os dados são mostrados como a média aritmética de todos os animais do grupo em cada amostragem.

Figura 4. Cinética de anticorpos inibidores da hemaglutinação.

As vacinas foram administradas nas semanas indicadas pelas setas. A linha descontínua indica um título de 1:80.

Exposição detalhada de modos de realização / Exemplos

Exemplo 1: Obtenção dos segmentos genéticos que codificam para os domínios extracelulares da hemaglutinina do vírus A/Viet Nam/1203/2004 e do CD154 humano, suíno e de frango.

Sintetizou-se a seqüência nucleotídica codificante para a HA do vírus de GA altamente patogênico A/Viet Nam/1203/2004 do subtipo H5N1, tomada da base de dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia de Estados Unidos (em inglês “National Center for Biotechnology Information”, abreviado NCBI), número de acesso AY818135. A síntese foi realizada empregando um uso de códons otimizado para a expressão em *Capra hircus*, seqüência identificada na Listagem de Seqüências como Id. Sec. No. 1. O gene sintético codifica para a seqüência aminoácida da HA desde o aminoácido 1 até 537, eliminando assim a região transmembranária e a citoplasmática da proteína (Id. Sec. No. 2). O gene sintético foi construído incorporando sítios de restrição Kpn I e Xho I para o extremo 5’ da seqüência codificante. Com o objetivo de aumentar a eficiência na iniciação da tradução, justo antes do códon de início se incorporou uma seqüência consenso de Kozak. No extremo 3’ do fragmento codificante para HA se incluiu na seguinte ordem: um sítio Nhe I, o fragmento codificante para um segmento de 6 histidinas, um sítio de restrição EcoR I, o códon de parada e um sítio de restrição EcoR V.

Além disso, sintetizaram os genes codificantes para os domínios extracelulares das moléculas de CD154 humano, suíno e de frango. A síntese foi realizada de acordo com as referências AJ243435 (para *Gallus gallus*), AB040443 (para *Sus scrofa*) e X67878 (para *Homo sapiens*), da base de dados do NCBI. Para a síntese das seqüências de CD154 de *Gallus gallus* (Id. Sec. No. 5) e de *Sus scrofa* (Id. Sec. No. 7) empregou-se um uso de

códons otimizado para a expressão em *Capra hircus*. Na sequência codificante para o CD154 humano não se variou o uso de códons (Id. Sec. No. 3). Com o objetivo de conferir liberdade estérica, nas três moléculas de CD154, incluiu-se um segmento que codifica para um peptídeo composto por quatro unidades repetidas de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser no extremo amino-terminal das três moléculas. No extremo 5' do fragmento codificante para os domínios extracelulares das moléculas de CD154 se incluiu um sítio EcoR I no extremo 3' (justamente depois do códon de parada) incorporou-se um sítio de corte Sal I. Os polipeptídeos resultantes das seqüências nucleotídicas sintéticas aparecem identificados na Listagem de Seqüências como Id. Sec. No. 6 (para *Gallus gallus*), Id. Sec. No. 8 (para *Sus scrofa*) e Id. Sec. No. 4 (para *Homo sapiens*).

Exemplo 2: Construção do cassete de expressão da hemaglutinina.

O gene artificial da HA digeriu Kpn I / EcoR V e se inseriu no vetor de expressão pAEC-SPT (Herrera et al. (2000) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 279:548-551) previamente digerido com as mesmas enzimas. O vetor resultante foi denominado pHA. O vetor pHA foi digerido com as endonucleases de restrição EcoR I (que corta depois da fila de histidina justamente antes do códon de parada da HA) com a endonuclease Sal I (que corta no lugar múltiplo de clonagem do vetor pHA para o 3' da HA). Os genes de CD154 foram extraídos dos vetores plasmídicos supridos pela companhia GeneArt com as endonucleases Eco R I e Sal I e foram clonados no vetor pHA. Destas clonagens geraram três vetores de expressão em células de mamíferos: pHA-CDp (contém o domínio de CD154 de frango), pHA-CDh (contém o domínio de CD154 de humano), pHA-CDc (contém o domínio de CD154 de porco). Em todos os casos os genes quiméricos da HA ficaram sob o controle do promotor imediato rápido de citomegalovírus (pCMV).

Exemplo 3: Construção dos vetores adenovirais ($\Delta E1\Delta E3$) contendo o

gene da HA.

Os vetores adenovirais com replicação defectiva foram construídos baseados no sistema AdEasy (Tong-Chuan H et al. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *PNAS USA*, 95: 2509- 2514), como vetor de transferência se empregou o plasmídeo pAdTrack-CMV. O sistema baseado em AdEasy constitui uma alternativa rápida e simples de construção de adenovírus recombinantes. As seqüências codificantes tanto para a HA quanto a HÁ fusionada aos domínios extracelulares das variantes humana, suína e de frango da molécula CD154 foram extraídas com as endonucleases Xho I e Sal I e clonadas no sítio Xho I do vetor pAdTrack-CMV. Os vetores resultantes (ptrack-HA, ptrack-HACDp, ptrack-HACDh, ptrack-HACDc) foram linearizados com a endonuclease Pme I e co-eletroporados com o vetor pAdEasy na cepa bacteriana BJ5183. Os genomas virais recombinantes foram então digeridos com a endonuclease Pac I e transfectados na linha celular HEK-293 para a obtenção dos vírions infectivos. Geraram-se 4 vetores virais: Ad-HA, Ad-HACDp, Ad-HACDh e Ad- HACDc. Todos os vetores foram amplificados na linha celular HEK-293 até um título de 5×10^{12} unidades formadoras de colônias (UFC) /ml. O vírus produzido foi purificado empregando-se o conjunto de purificação mediante dupla centrifugação em CsCl, se dialisou contra buffer de armazenamento (10 mM Tris pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 4% sacarose) e se conservou a -70°C para seu uso posterior.

Exemplo 4: Transdução direta do epitélio glandular mamário de cabras: produção das variantes de hemaglutinina no leite.

Empregaram-se cabras que se encontravam no terceiro mês de lactação e estavam produzindo uma média de 1,3 litros de leite diário. No dia 0, os animais receberam uma dose de 10 mg de Diazepan, por via intramuscular, para diminuir o estresse durante o tratamento. Os animais foram ordenhados extensivamente para eliminar a maior quantidade possível

de leite nas cisternas, as glândulas mamárias foram enxugadas duas vezes mediante a infusão de solução salina a 37°C e posterior ordenha. Todas as infusões foram realizadas diretamente através do canal da mama para a qual se empregou um cateter acoplado a bomba peristáltica. As infusões foram realizadas lentamente enquanto de forma simultânea se lhes deram massagens nos úberes infundidos.

Em cabras, o úbere pode se separar em duas metades independentes. A cada glândula mamária foi infundida uma solução de PBS suplementada com 30 mM de EGTA, contendo uma carga viral de 10^9 UFC/ml. O volume infundido em cada metade de úbere foi variável dependendo da capacidade do úbere (como média, 600 ml por meio úbere). Depois da infusão massagearam o úbere para facilitar que a solução se distribuisse homogeneamente e atingisse a totalidade de dutos e alvéolos. A solução infundida foi removida no dia seguinte mediante ordenha. As glândulas mamárias foram enxugadas novamente mediante a infusão PBS com o objetivo de eliminar a maior quantidade possível de vetores adenovirais remanescentes na cisterna e nos dutos mamários.

Começou-se a coletar o leite a partir dos animais infundidos por ordenha manual a partir das 48 horas pós-infusão. Realizaram-se duas ordenhas diárias, uma na manhã e outra ao final da tarde. A maior parte do leite coletado foi armazenado a -70°C para a posterior purificação da proteína, enquanto pequenas amostras foram usadas para detectar e quantificar o conteúdo das variantes de HA em cada um dos lotes.

A detecção das variantes de HA no leite foi levada a cabo como segue. Às amostras de 150 µl de leite foram adicionados quatro volumes de buffer de separação (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2), depois de incubar 30 minutos no gelo, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 30 minutos a 15 000g. A fração do soro foi recobrada e as proteínas contidas em 10 µl foram separadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida (em

inglês “Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Eletrophoresis”, abreviado SDS-PAGE) a 7%. As proteínas foram transferidas para um filtro de nitrocelulose e a presença de HA foi detectada mediante o emprego de um soro hiperimune de frango. Como anticorpo secundário foi empregado um anticorpo anti-frango em rato conjugado com peroxidase de rabanete (em inglês “Horseradish peroxidase”, abreviado HRP). As bandas imunorreativas foram visualizadas mediante o sistema quimioluminescente (em inglês “Enhanced Chemiluminescence”, abreviado ECL) de Amersham Pharmacia Biotech (Fig. 1). As variantes de HA foram produzidas majoritariamente em forma de uma cadeia polipeptídica (HA0 e HA0-CD154), embora também se pôde observar a presença do domínio HA1 em ambas moléculas.

A quantificação das variantes de HA foi realizada mediante um ELISA contra a H5 desenvolvido no CIGB. Nos animais infundidos com vetores adenovirais do tipo $\Delta E1\Delta E3$, as variantes de HA foram detectadas até o dia 11 pós-infusão com uma média de expressão de 0.94 g/L, 0.86 g/L, 0.78 g/L, 0.87 g/L das proteínas HA, HACDp, HACDh e HACDc, respectivamente, durante os primeiros 7 dias de coleta.

Exemplo 5: Construção dos vetores de expressão em *Pichia pastoris*.

O vetor de expressão em *P. pastoris* pPS10 foi digerido enzimaticamente com a endonuclease de restrição Nae I, e submetido a um tratamento com fosfatase alcalina para a desfosforilação dos extremos e a inserção dos genes que codificam para HA, HACDp, HACDh e HACDc.

As seqüências codificantes para as proteínas HA, HACDp, HACDh e HACDc, foram extraídas mediante digestão com as endonuclease Bcl I (cujo lugar de corte se encontra imediatamente depois do peptídeo de secreção da HA) e Sma I (cujo lugar de corte se encontra no extremo 3' da seqüência de interesse). As bandas resultantes foram tratadas com a polimerase Klenow, para obter extremos cegos unidos ao vetor pPS10. Das clonagens resultantes foram obtidos os vetores pPS-HA, pPS-HACDp, pPS-

HACDh e pPS-HACDc. Em todos os casos, as seqüências codificantes para as diferentes variantes de HA ficaram sob o controle de um promotor de álcool oxidase (AOX1) e fusionadas a um peptídeo de secreção de Suc2 de *Saccharomyces cerevisiae*.

5 Previamente à transformação, os plasmídeos foram linearizados com a enzima de restrição Sph I. A cepa MP36 de *P. pastoris* foi transformada mediante eletroporação com os vetores de expressão pPS-HA, pPS-HACDp, pPS-HACDh e pPS-HACDc. A referida cepa é um mutante auxotrófico his3, o qual depois da transformação adquire um fenótipo His⁺.

10 Os clones transformantes identificados mediante Dot Blot foram analisados por Southern Blot para determinar em quais tinha ocorrido a integração mediante substituição do gene *AOX1* de *P. pastoris* pelo cassete de expressão do plasmídeo recombinante, o qual corresponde com um fenótipo Mut^s (baixa utilização do metanol) e His⁺. A substituição genética de *AOX1* ocorre por entrecruzamentos das regiões do promotor de *AOX1* e 3'*AOX1* entre o vetor e o genoma. Como resultado destes entrecruzamentos ocorre a deleção da região codificadora do gene *AOX1*. As cepas recombinantes com fenótipo Mut^s baseiam a produção do álcool oxidase (AOX) no gene *AOX2* e sua taxa de crescimento em metanol é baixa.

20 Os genes que codificam para as diferentes variantes de HA estão sob a regulação do promotor AOX1, o qual é indutível por metanol. *P. pastoris* secreta somente baixos níveis de proteínas próprias e seu meio de cultivo não precisa de suplementos protéicos, portanto, pode-se esperar que uma proteína heteróloga que é secretada, constitua a maioria do total de
25 proteínas no meio (até mais de 80%). A produção dos antígenos recombinantes foi realizada em fermentadores de 5L mediante a adição de metanol ao cultivo e mantendo o pH do cultivo em 8.0. Como se mostra na Figura 2, a maior parte da HA produzida em *P. pastoris* foi glicosilada, e foi secretada ao meio de cultivo.

Exemplo 6: Purificação dos antígenos HA, HACDp, HACDh e HACDc.

Para a purificação dos antígenos HA, HACDp, HACDh e HACDc, a partir do leite de cabras, realizou-se uma operação de desengorduramento mediante centrifugação do leite a 10 000 rpm a 4°C durante 30 minutos. O leite livre de gordura foi diluído 1:5 (v/v) em Buffer Tris-HCl pH 8.0, CaCl₂ 10 mM. Depois de 1 hora a 4°C, precipitaram-se as caseínas mediante centrifugação a 10 000 rpm durante 30 minutos. Os soros do leite contendo cada um dos antígenos foram clarificados mediante filtragem seriada em filtros de 5 µM, 0.8 µM e 0.2 µM. Os soros clarificados foram diafiltrados contra Buffer Fosfato (50 MM NaH₂PO₄ pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 MM imidazol) e foram aplicados em uma coluna de Ni-NTA Sefarose. Realizou-se uma operação de lavagem a 50 MM de imidazol e as proteínas recombinantes foram eluídas a 200 mM de imidazol em Buffer Fosfato.

Para a purificação dos antígenos HA, HACDp, HACDh e HACDc, produzidos em *P. pastoris*, uma vez concluída a fermentação, as células foram separadas do meio de cultivo mediante centrifugação. O meio contendo os antígenos recombinantes foi clarificado mediante filtragem seriada em filtros de 5 µM, 0,8 µM e 0,2 µM. O resto da purificação foi realizada de forma similar ao procedimento seguido para purificar a partir do leite.

Exemplo 7: Ensaio de imunogenicidade em frangos das composições vacinais baseadas nos antígenos vacinais HA e HACDp.

Imunização: Os antígenos HA e HACDp usados neste ensaio foram purificados mediante métodos não desnaturizantes até mais de 98% de pureza, como se pôde determinar mediante análise por densitometria de uma SDS-PAGE. A identidade das proteínas foi confirmada mediante análises de aminoácidos por espectrometria de massa, e por “Western blot” usando um soro hiperimune contra H5. Ambos antígenos foram formulados em adjuvante

oleoso Montanide ISA 720. Para a imunização, empregaram-se frangos de 3 semanas de idade. De acordo com a dose empregada, foram feitos 8 grupos, de 10 frangos cada um. Quatro dos grupos receberam a formulação baseada no antígeno HA, enquanto os outros quatro grupos receberam a formulação baseada em HACDp. Os animais foram imunizados mediante a administração por via subcutânea de 1 µg, 3 µg, 6 µg, ou 12 µg de antígeno, de acordo com o grupo, em 200 µl da formulação final. Para a imunização foi empregada uma agulha 18G acoplada a uma seringa de 1 ml. A este ensaio foi incorporado um grupo placebo que não recebeu antígeno. As amostras de sangue para a análise de resposta sorológica foram tomadas no dia 28 depois da vacinação.

Inibição da hemaglutinação e ELISA: Para os ensaios de inibição da hemaglutinação, os soros foram serialmente diluídos (diluição inicial 1:2) em placas de microtitulação de fundo em U. A cada um dos poços foram adicionados 4 unidades hemaglutinadoras do antígeno viral A/Viet Nam/1203/2004 (como foi determinado previamente mediante titulação contra uma suspensão em Buffer Fosfato Salino (em inglês “Phosphate Buffer Saline”, abreviado PBS) de eritrócitos de frango a 0,5%). A mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 1 hora e, passado este tempo, a cada um dos poços foi adicionado um volume similar de eritrócitos de frango a 0,5% em PBS. Os títulos de inibição da hemaglutinação foram lidos depois de 30 minutos. Os anticorpos específicos contra a H5 foram determinados mediante ELISA. As placas foram recobertas com 0,5 µg/poço da proteína HA, produzida e purificada a partir de cultivos celulares infectados com o vetor AdHA. Os títulos obtidos por ELISA foram expressos como a mais alta diluição que rendeu uma densidade óptica superior ao dobro da média, mais o desvio padrão, das amostras negativas diluídas de forma similar.

Ensaio de expressão de citocinas: Coletou-se de forma asséptica o baço de frangos imunizados com 6 µg de HA ou HACDp que se encontravam no dia 30 pós-vacinação. Os baços foram cortados em pequenos

fragmentos e passados através de um filtro de aço com tamanho de poro de 120 μ M, para obter uma suspensão celular homogênea. As células foram coletadas mediante centrifugação a 1000 rpm durante 10 minutos e recolocadas em suspensão em PBS. A suspensão celular foi aplicada lentamente sobre uma coluna de Histopaque 1083 (Sigma) em uma relação 1:1 (v/v) e foi realizada uma centrifugação a 1000 rpm durante 30 minutos. Coletaram-se as células mononucleares no anel da interfase, foram lavadas 3 vezes com PBS e foram ajustadas a uma concentração de 1×10^7 células por mililitro de meio RPMI 1640. As células foram semeadas em placas de 24 poços a razão de 5×10^6 células por poço. Para levar a cabo o ensaio de linfoproliferação, as células foram estimuladas mediante a adição da proteína HA até uma concentração de 1 μ g/ml durante 18 horas a 41°C em 5% de CO₂. Como controle negativo foram empregadas células do baço de frangos injetados com placebo. Como controle positivo foram empregadas células do baço incubadas com Concanavalina A (Con A). Os cultivos foram coletados 18 horas depois e o ácido ribonucléico (RNA) total foi extraído para avaliar a indução dos genes de citoquinas. O RNA total foi extraído empregando Tri-Reagent (Sigma). As mostras de RNA foram recolocadas em suspensão na água e foram quantificadas mediante espectrometria a 260 nm.

Com o objetivo de determinar os níveis relativos de RNA mensageiro de interleucina 12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ) e gliceraldeído-fosfodesidrogenase (GAPDH), realizou-se uma ensaio de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (TR-RCP) triplicado, como descreveu Svetic e colaboradores no 1991 (Svetic, A. et al. (1991). Cytokine gene expression after *in vivo* primary immunization with goat antibody to mouse IgD antibody. *J. Immunol.* 147:2391-2397). O RNA foi retrotranscrito triplicado empregando o jogo de reativos Reverse Transcription System (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. Em um estudo prévio se realizou um perfil da quantidade de DNA

amplificado em cada ciclo da RCP para cada um dos três genes a analisar. O número de ciclos a usar foram selecionados dentro da região exponencial da curva de amplificação. O número ótimo de ciclos foi 35 para a IL-12 e para o IFN- γ , enquanto para GAPDH foi de 28. Tanto as células controle positivo (incubadas com Con A) quanto as células controle negativo (derivadas de um grupo placebo e não estimuladas) foram incluídas em cada ensaio. O gene constitutivo GAPDH foi amplificado em cada reação da RCP e empregado para garantir quantidades similares de DNA complementar inicial em cada reação antes de avaliar os genes de interesse.

Depois da RCP 15 μ l da mistura final foram analisadas mediante eletroforese em gel de agarose a 2% e checados mediante análise de densitometria. A intensidade das bandas foi determinada empregando o programa computacional de análise de imagens Kodak 1D. Os resultados são reportados como a média do valor de intensidade de pixéis por banda de interesse, e como a expressão relativa do gene calculada como a porcentagem desse valor com respeito à intensidade obtida para o gene constitutivo GAPDH.

Os resultados obtidos em frangos indicam que a formulação oleosa contendo os antígenos vacinais HA e HACDp induzem uma resposta, tanto humoral quanto celular, nos animais vacinados. Em ambos casos a resposta imune foi dependente da dose empregada (Fig. 3A). A cinética de desenvolvimento de anticorpos inibidores da hemaglutinação nos animais vacinados com 6 μ g de HA ou HACDp mostrou que na semana 4 pós-vacinação, o antígeno quimérico é capaz de induzir uma resposta de anticorpos inibidores da hemaglutinação aproximadamente 10 vezes maior à desenvolvida nos animais vacinados com o antígeno HA (Fig 3B). Também nos animais vacinados com o antígeno quimérico HACDp se observou uma expressão marcadamente superior de IFN- γ e IL-12, quando as células mononucleares de sangue periférico foram expostas ao antígeno HA (Tabela

1). Este resultado demonstra que a fusão de CD154 ao HA também é capaz de induzir uma resposta potente a nível celular, específica contra a molécula de HA.

Tabela 1: Resposta imune mediada por células

Dose (µg)	GAPDH	IFN-γ			IL-12		
		HA	HACDp	HACD/HA	HA	HACDp	Relação HACD/HA
1	19850	3156	17015	5,39	2780	9232	3,32
3	22735	3828	19210	5,02	2505	11420	4,55
6	20173	5985	26525	4,43	3423	13395	3,91
12	21871	6215	28905	4,65	3928	16683	4,24

5 Os níveis relativos de produção *in vitro* de IFN-γ e IL-12 são mostrados como a média aritmética de todos os animais do grupo.

Exemplo 8: Ensaio de imunogenicidade em humanos das composições vacinais baseadas nos antígenos HA e HACDh.

10 A segurança, reatogenicidade e imunogenicidade das composições vacinais que contêm as proteínas HA e HACDh foram avaliadas em ensaios clínicos em humanos. Ambas proteínas foram obtidas com um grau de pureza superior a 98,5 % e foram formuladas absorvidas ao hidróxido de alumínio. Como critério de seleção, empregaram-se pessoas sãs do sexo masculino, entre 25 e 40 anos de idade, que não tivessem recebido nenhuma
15 vacinação nos últimos 6 meses e que não mostrassem nenhum sintoma de gripe. Formaram-se 6 grupos experimentais de 8 pessoas cada um com base à dose (25 µg, 50 µg ou 100 µg) e ao tipo de antígeno a receber (HA ou HACDh). Cada voluntário foi imunizado na semana 0 e recebeu uma segunda imunização na semana 4. A administração foi realizada mediante a injeção
20 intramuscular de 0,5 ml da composição.

Foram tomadas amostras de sangue no momento da vacinação e durante os três meses seguintes com intervalos de duas semanas. Para a determinação dos níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação, as mostras de soro foram tratadas com a enzima de destruição de receptores de
25 *Vibrio cholera*, e posteriormente foram aquecidas a 65°C para inativar os

inibidores não específicos. Os anticorpos inibidores da hemaglutinação do antígeno viral A/Viet Nam/1203/2004 foram determinados mediante o ensaio padrão de microtitulação empregando eritrócitos de frango a 0,5%.

Os níveis de imunoglobulinas IgG específicas contra a
5 proteína H5 do vírus A/Viet Nam/1203/2004 foram avaliados mediante ELISA. As placas foram recobertas com a proteína HA produzida em cultivos celulares. À seguir realizou-se diluições seriadas de cada um dos soros. Depois de lavar extensivamente, a cada poço foi adicionado um anticorpo anti-IgG humano produzido em coelho e conjugado com HRP. O revelado foi
10 realizado com o substrato 3,3', 5,5'-Tetrametilo benzidina. O título do ELISA foi expresso como a mais alta diluição a qual a densidade ótica do poço contendo antígeno foi ao menos o dobro do poço correspondente sem antígeno.

A células mononucleares de sangue periférico (em inglês
15 “Peripheral Blood Mononuclear Cells”, abreviado PBMC) foram isoladas mediante separação em um gradiente de Ficoll Isopaque (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) e foram criopreservadas para os ensaios imunológicos. Depois de descongeladas, as PBMC foram submetidas a um ensaio tipo ELISPOT de IFN- γ (Ebioscience) de acordo com às instruções do fabricante.
20 Rapidamente, as placas foram recobertas durante toda a noite com o anticorpo de captura. Depois de duas operações de lavagem, as placas foram bloqueadas com RPMI-1640 durante uma hora. Em cada um dos poços foi adicionado o antígeno HA e foram semeadas 5×10^5 células. O cultivo foi incubado a 37°C e 5% de CO₂ durante 48 horas. As células decantaram e as placas foram
25 incubadas com um anticorpo anti-interferón conjugado com biotina durante 2 horas. Depois de duas operações de lavagens, foi adicionado a cada poço avidina conjugada com HRP. O revelado foi realizado empregando uma solução de 3-amino-9-etil como substrato. Os resultados mostraram que as vacinas contendo os antígenos recombinantes HA e HACDh não produziram

reações locais adversas.

A resposta imune humoral e celular aumentou proporcionalmente com a dose de proteína administrada, tanto nos voluntários imunizados com HA quanto nos imunizados com a proteína quimérica HACDh. No entanto, a comparação entre as variantes HA e HACDh demonstrou, que a proteína quimérica é capaz de induzir uma resposta humoral 4,2 vezes superior à dose equivalente de HA (Fig. 4), e uma resposta celular 5,2 vezes maior que a resposta produzida pela dose equivalente de HA.

10 **Exemplo 9: Ensaio de imunogenicidade em porcos das composições vacinais baseadas nos antígenos HA e HACDc.**

Empregaram-se porcos da raça Landrace entre 18 e 20 kg de peso. Os animais foram distribuídos em 6 grupos experimentais, de acordo com o antígeno e a dose a avaliar. Empregaram-se 8 porcos por cada grupo experimental, e se criou um grupo placebo. Tanto para HA quanto para HACDc foram avaliados dose de 20 µg, 40 µg e 80 µg. Ambos antígenos vacinais foram formulados em uma emulsão de adjuvante oleoso e foram inoculados mediante injeção de 2 mL por via intramuscular (IM) na **linha** do pescoço. O placebo constituído por adjuvante e solução salina fosfatada (v/v), foram inoculados de forma similar.

Tomaram-se amostras de sangue no momento da vacinação e a cada 7 dias durante os três meses seguintes. Os anticorpos inibidores da hemaglutinação foram determinados mediante o tratamento prévio das amostras de soro com a enzima de destruição de receptores de *V. cholera* para inativar os inibidores não específicos. Os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação foram determinados mediante o ensaio regular de microtitulação empregando eritrócitos de frango a 0,5%. A resposta imune ao nível celular foi avaliada mediante a estimação relativa dos níveis de RNA do IFN-γ e IL-12, em PBMC estimuladas com o antígeno HA.

Nenhuma das duas composições vacinais provocou respostas adversas, já que não se observou alteração dos parâmetros clínicos normais. Os resultados mostraram que as vacinas contendo os antígenos recombinantes HA e HACDc produziram muito poucas reações adversas, de caráter local.

- 5 Em ambos grupos, observou-se uma dependência da dose, tanto nos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação, quanto a resposta celular expressa como a capacidade das células para proliferar e produzir citocinas em presença do antígeno HA. Observou-se uma marcada potenciação da resposta imune, tanto a nível humoral quanto celular, nos grupos imunizados com o
- 10 antígeno quimérico HACDc. A referida proteína foi capaz de induzir títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação 2,5 vezes superiores aos desenvolvidos frente à dose correspondente de HA. A capacidade de resposta celular, a nível de expressão de IFN- γ e IL-12, também foi de 4,5 e 6 vezes maior, respectivamente, nos animais imunizados com o antígeno quimérico
- 15 HACDc, em comparação com aqueles porcos imunizados com uma dose equivalentes de HA.

Exemplo 10: Expressão de antígenos quiméricos baseados na hemaglutinina a partir de subtipos diferentes do vírus de gripe aviária.

- Sintetizaram-se as seqüências nucleotídicas codificantes para
- 20 os domínios extracelulares das HA dos vírus de gripe aviária A/Netherlands/33/03(H7N7) (Seqüência IDE No. 9) e A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) (Seqüência IDE No. 10). Ambos genes foram desenhados com um uso de códons otimizados para a expressão em *Capra hircus* e flanqueado pelos lugares de restrição Xho I (no 5') e EcoR I (no 3')- Ambos genes foram
- 25 clonados diretamente no vetor de transferência adenoviral pAdtrack contendo o domínio extracelular da molécula de CD 154 suína. Os clones recombinantes resultantes foram transfectados na linha celular HEK-293T e passadas 72 horas pôde-se detectar a expressão das moléculas quiméricas no meio de cultivo. Ambas proteínas de fusão foram expressas majoritariamente

em forma trimérica e puderam purificar a partir do meio de cultivo mediante uma simples operação de cromatografia de afinidade a íons metálicos.

Os vetores de transferência adenoviral contendo as variantes quiméricas das HA dos vírus A/Netherlands/33/03 (H7N7) e A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) foram integrados mediante recombinação homóloga com o genoma adenoviral contido no vetor plasmídico pAdEasy a partir dos quais foram gerados e amplificados vetores adenovirais contendo ambas proteínas de interesse.

As HA dos isolados anteriormente mencionados, fusionadas ao domínio extracelular de CD154, foram produzidas a altas concentrações no leite de cabras. Esta estratégia permitiu dispor de várias gramas das variantes quiméricas de HA em um prazo inferior a 55 dias a partir do momento em que se dispôs dos genes sintéticos. Depois de purificar ambos antígenos quiméricos, realizou-se um ensaio de imunogenicidade em porcos empregando uma dose fixa de 20 µg por animal, em uma formulação oleosa administrada por via intramuscular no músculo do pescoço. Em nenhum dos animais vacinados se observaram reações adversas. A análise sorológica demonstrou que ambas proteínas foram capazes de induzir uma forte resposta imune humoral, atingindo títulos de anticorpos inibidores das hemaglutinação superiores a 1:800 dentro dos primeiros 28 dias pós-vacinação.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

```

<110> CENTER FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY
<120> ANTÍGENO VACINAL QUIMÉRICO CONTRA O VÍRUS DA IA E SUA COMPOSIÇÃO
<130> Influenza aviária
<140>
<141>
<150> CU 2006- 0051
<151> 2006-02-28
<160> 10
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 1670
<212> DNA
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da sequência Artificial: Sequência sintética que codifica
a hemaglutinina do vírus Viet Nam/1203;2004 fundida a uma extremidade de
6 histidinas e flanqueada por vários sítios de restrição.
<400> 1
ggtaccctcg agccaccatg gagaagatcg tgctgctggt cgccatcggtg tccctgggtga 60
agagtgatca gatctgtatc ggctaccacg ccaacaactc caccgagcag gtggacacca 120
tcatggaaaa gaacgtgacc gtgaccacg cccaggacat cctggagaag aagcacaacg 180
gcaagctgtg tgacctggac ggcgtgaagc ccctgatcct gagggactgc tccgtggccg 240
gctggctgct gggcaacccc atgtgtgacg agttcatcaa cgtgcccagag tggctctaca 300
tcgtggagaa ggccaacccc gtgaacgacc tgtgctaccc cggcgacttc aacgactacg 360
aggagctgaa gcacctgctg tccaggatca accacttcga gaagatccag atcatcccca 420
agtccagctg gtcctcccac gaggcctccc tgggcgtgtc ctccgcctgc ccctaccagg 480
gcaagtcttc cttcttcaga aacgttgtgt ggctgattaa gaagaacagc acctaccca 540
ccatcaagag gtcctacaac aacaccaacc aggaggacct gctggttctg tggggcatcc 600
accaccccaa cgacgccgac gagcagacca agctgtacca gaaccccacc acctacatct 660
ctgtgggcac ctccaccctg aaccagaggc tgggtcccag gatcgccacg cgttccaagg 720
tgaacggcca gagcggccga atggagtttt tctggaccat cctgaagcca aacgacgcca 780
tcaacttcga gtccaacggc aacttcacatg ccccgagta cgcctacaag atcgtgaaga 840
aggcgactc caccatcatg aagtccgagc tggagtacgg caactgtaac accaagtgcc 900
agaccccaat gggcgccatc aacagctcca tgcccttcca caacatccac cccctgacca 960
tcggcgagtg ccccaagtac gtgaagtcca acaggctggt gctggccacc ggcctgagga 1020
actccccca gagggagagg aggaggaaga agaggggctt gttcggcgcc atcgccggct 1080
tcatcgaggg cggctggcag ggcattggtg acggctggtg cggctaccac cacagcaacg 1140
agcagggctc cggctacgcc gccgacaagg agtccacca gaaggccatc gacggcgtca 1200
ccaacaaggt gaactccatc atcgacaaga tgaacacca gttcgaggct gtgggcaggg 1260
agttcaacaa cctggagagg agaatcgaga acctgaacaa gaagatggag gacggcttcc 1320
tggatgtgtg gacctacaac gccgagctgc tgggtgctgat ggagaacgag aggaccctgg 1380
acttcacga ctccaacgtg aagaacctgt acgacaaggc gaggctgcag ctgagggaca 1440
acgccaagga gctgggcaac ggctgcttcg agttctacca caagtgtgac aacgagtgtg 1500
tggagtctgt gaggaacggc acctacgact acccccagta ctccgaggag gccaggctga 1560
agagggagga gatctctggc gtgaagctgg agtccatcgg catctaccag atcctgtcca 1620
tctactccgc tagccatcac catcaccacc atatgaattc ttgagatatc 1670
<210> 2
<211> 548
<212> PRT
<213> Vírus de Influenza A
<220>
<221> PEPTÍDEO
<222> (1)..(548)
<223> Sequência de aminoácidos (iniciando pelo códon de partida "ATG"
[nucleotídeo 18] de Seq ID. No 1).
<400> 2
Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15
Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

```

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45
 Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60
 Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80
 Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95
 Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
 100 105 110
 Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125
 Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
 130 135 140
 Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190
 Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
 195 200 205
 Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220
 Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240
 Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510
 Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525
 Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Ala Ser His His His His His

Leu

225
 <210> 5
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição da Sequência Artificial: Sequência sintética que codifica o domínio extracelular da molécula CD154 de Gallus gallus contendo o PEPTÍDEO espaçador em sua extremidade N-terminal.
 <400> 5
 gaattcttggc ggcggctccg gagggggagg gagcggcgga gggggctcca agatggagga 60
 ggtgctgtcc ctgaacgagg actacatctt cctgaggaag gtgcagaagt gccagaccgg 120
 cgaggaccag aagagcaccc tgctggactg tgagaagggtg ctcaagggtt tccaggacct 180
 gcagtgcgaag gacaggaccg ccagcgagga gctgcccaag ttcgagatgc acaggggcca 240
 cgagcacccc cacctgaaga gcaggaacga gaccagcgtc gccgaggaga agaggcagcc 300
 catcgccacc cacctggccg gcgtgaagag caacaccact gtgagggtgc tgaagtggat 360
 gaccacctcc tacgccccca cctccagctt catcagctac cagcagggca agctgaaggt 420
 ggagaaggcc ggcctgtact acatctacag ccagggtgtc ttctgtacca aggccgtgc 480
 cagcgccccc ttcaccctgt acatctacct gtacctgccc atggaggagg acaggctgct 540
 gatgaagggc ctggacaccc acagcaccag caccgccctg tgtgagctgc agagcatcat 600
 ggagggcggc gtgttcgagc tgaggcaggg cgacatggtg ttcgtgaacg tgaccgacag 660
 caccgccgtg aacgtgaacc ccggcaacac ctacttcggc atgttcaagc tgtgaccggg 720
 gtcgac 726
 <210> 6
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <220>
 <221> PEPTÍDEO
 <222> (1)..(236)
 <223> Sequência de aminoácidos(iniciando pelo códon "TCT" [nucleotídeo 5] de Seq ID. No 5).
 <400> 6
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys
 1 5 10 15
 Met Glu Glu Val Leu Ser Leu Asn Glu Asp Tyr Ile Phe Leu Arg Lys
 20 25 30
 Val Gln Lys Cys Gln Thr Gly Glu Asp Gln Lys Ser Thr Leu Leu Asp
 35 40 45
 Cys Glu Lys Val Leu Lys Gly Phe Gln Asp Leu Gln Cys Lys Asp Arg
 50 55 60
 Thr Ala Ser Glu Glu Leu Pro Lys Phe Glu Met His Arg Gly His Glu
 65 70 75 80
 His Pro His Leu Lys Ser Arg Asn Glu Thr Ser Val Ala Glu Glu Lys
 85 90 95
 Arg Gln Pro Ile Ala Thr His Leu Ala Gly Val Lys Ser Asn Thr Thr
 100 105 110
 Val Arg Val Leu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser
 115 120 125
 Phe Ile Ser Tyr His Glu Gly Lys Leu Lys Val Glu Lys Ala Gly Leu
 130 135 140
 Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Val Ser Phe Cys Thr Lys Ala Ala Ala Ser
 145 150 155 160
 Ala Pro Phe Thr Leu Tyr Ile Tyr Leu Tyr Leu Pro Met Glu Glu Asp
 165 170 175
 Arg Leu Leu Met Lys Gly Leu Asp Thr His Ser Thr Ser Thr Ala Leu
 180 185 190
 Cys Glu Leu Gln Ser Ile Arg Glu Gly Gly Val Phe Glu Leu Arg Gln
 195 200 205
 Gly Asp Met Val Phe Val Asn Val Thr Asp Ser Thr Ala Val Asn Val
 210 215 220
 Asn Pro Gly Asn Thr Tyr Phe Gly Met Phe Lys Leu
 225 230 235

```

<210> 7
<211> 693
<212> DNA
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Sequência sintética que codifica
o domínio extracelular de CD154 de Sus scrofa contendo o PEPTÍDEO
espaçador em sua extremidade N-terminal.
<400> 7
gaattctggc ggcggctccg gagggggagg gagcggcgga gggggctcca agatcgagga 60
cgagaggaac ctgcacgagg acttcgtgtt catcaagacc atccagaggt gtaagcaggg 120
cgagggcgagc ctgagcctcc tgaactgtga ggagatcagg agccagttcg aggacctggt 180
gaagggcatc atgcagagca aggaggtgaa gaagaaggaa aaaagcttcg agatgcacaa 240
gggcgaccag gacccccaga tcgccgccca cgtgattagc gaggccagca gcaagaccgc 300
cagcgtgctg cagtgggccc ccaagggcta ctacaccctg agcaccaacc tggtgaccct 360
ggagaacggc aggcagctgg ccgtgaagag gcagggcatc tactacatct acgccaggt 420
gaccttctgc tccaacaggg acgccgctgg ccaggcccct ttcacgccca gcctgtgcct 480
gaggagcccc agcggcagcg agcgcacct gctgagggcc gccaacaccc acagcagcag 540
caagccctgt ggccagcaga gcatccacct gggcggcgtg ttcgagctgc agcctggcgc 600
cagcgtgttc gtgaacgtga ccgacccag ccaggtgtcc cacggcaccg gcttcaccag 660
cttcggcctg ctgaagctgt gaccggggtc gac                                     693
<210> 8
<211> 225
<212> PRT
<213> Sus scrofa
<220>
<221> PEPTÍDEO
<222> (1)..(225)
<223> Sequência de aminoácidos(iniciando pelo códon "TCT" [nucleotídeo 5]
de Seq ID. No 7).
<400> 8
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys
 1          5          10          15
Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val Phe Ile Lys Thr
 20          25          30
Ile Gln Arg Cys Lys Gln Gly Glu Gly Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys
 35          40          45
Glu Glu Ile Arg Ser Gln Phe Glu Asp Leu Val Lys Gly Ile Met Gln
 50          55          60
Ser Lys Glu Val Lys Lys Lys Glu Lys Ser Phe Glu Met His Lys Gly
 65          70          75          80
Asp Gln Asp Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
 85          90          95
Lys Thr Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu
100          105          110
Ser Thr Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Arg Gln Leu Ala Val Lys
115          120          125
Arg Gln Gly Ile Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
130          135          140
Arg Asp Ala Ala Gly Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Arg
145          150          155          160
Ser Pro Ser Gly Ser Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
165          170          175
Ser Ser Ser Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val
180          185          190
Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
195          200          205
Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
210          215          220
Leu
225
<210> 9

```

<211> 536
 <212> PRT
 <213> Vírus de Influenza A
 <220>
 <221> PEPTÍDEO
 <222> (1)..(536)
 <223> Sequência dos domínios extracelulares de hemaglutinina do vírus de
 influenza aviária A/Netherlands/33/03(H7N7).
 <400> 9

Met	Asn	Thr	Gln	Ile	Leu	Val	Phe	Ala	Leu	Val	Ala	Ile	Ile	Pro	Thr	1	5	10	15
Asn	Ala	Asp	Lys	Ile	Cys	Leu	Gly	His	His	Ala	Val	Ser	Asn	Gly	Thr	20	25	30	
Lys	Val	Asn	Thr	Leu	Thr	Glu	Arg	Gly	Val	Glu	Val	Val	Asn	Ala	Thr	35	40	45	
Glu	Thr	Val	Glu	Arg	Thr	Asn	Val	Pro	Arg	Ile	Cys	Ser	Lys	Gly	Lys	50	55	60	
Arg	Thr	Val	Asp	Leu	Gly	Gln	Cys	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Ile	Thr	Gly	65	70	75	80
Pro	Pro	Gln	Cys	Asp	Gln	Phe	Leu	Glu	Phe	Ser	Ala	Asp	Leu	Ile	Ile	85	90	95	
Glu	Arg	Arg	Glu	Gly	Ser	Asp	Val	Cys	Tyr	Pro	Gly	Lys	Phe	Val	Asn	100	105	110	
Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Gln	Ile	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Gly	Ile	Asp	Lys	115	120	125	
Glu	Thr	Met	Gly	Phe	Thr	Tyr	Ser	Gly	Ile	Arg	Thr	Asn	Gly	Ala	Thr	130	135	140	
Ser	Ala	Cys	Arg	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ala	Glu	Met	Lys	Trp	145	150	155	160
Leu	Leu	Ser	Asn	Thr	Asp	Asn	Ala	Ala	Phe	Pro	Gln	Met	Thr	Lys	Ser	165	170	175	
Tyr	Lys	Asn	Thr	Arg	Lys	Asp	Pro	Ala	Leu	Ile	Ile	Trp	Gly	Ile	His	180	185	190	
His	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Glu	Gln	Thr	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn	195	200	205	
Lys	Leu	Ile	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Asn	Tyr	Gln	Gln	Ser	Phe	Val	Pro	210	215	220	
Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Asp	225	230	235	240
Phe	His	Trp	Leu	Ile	Leu	Asn	Pro	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe	Ser	Phe	245	250	255	
Asn	Gly	Ala	Phe	Ile	Ala	Pro	Asp	Arg	Ala	Ser	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys	260	265	270	
Ser	Met	Gly	Ile	Gln	Ser	Glu	Val	Gln	Val	Asp	Ala	Asn	Cys	Glu	Gly	275	280	285	
Asp	Cys	Tyr	His	Ser	Gly	Gly	Thr	Ile	Ile	Ser	Asn	Leu	Pro	Phe	Gln	290	295	300	
Asn	Ile	Asn	Ser	Arg	Ala	Val	Gly	Lys	Cys	Pro	Arg	Tyr	Val	Lys	Gln	305	310	315	320
Glu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Lys	Asn	Val	Pro	Glu	Ile	Pro	325	330	335	
Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	340	345	350	
Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Leu	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	355	360	365	
Asn	Ala	Gln	Gly	Glu	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Thr	Gln	Ser	370	375	380	
Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Thr	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	385	390	395	400
Asn	Gln	Gln	Phe	Glu	Leu	Ile	Asp	Asn	Glu	Phe	Thr	Glu	Val	Glu	Lys	405	410	415	
Gln	Ile	Gly	Asn	Val	Ile	Asn	Trp	Thr	Arg	Asp	Ser	Met	Thr	Glu	Val				

420 425 430
 Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr
 435 440 445
 Ile Asp Leu Ala Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Tyr Glu Arg Val Lys
 450 455 460
 Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu
 465 470 475 480
 Ile Phe His Lys Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn
 485 490 495
 Thr Tyr Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Ile Gln Asn Arg Ile
 500 505 510
 Gln Ile Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Ala Ser His
 515 520 525
 His His His His Met Asn Ser
 530 535
 <210> 10
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> Vírus de Influenza A
 <220>
 <221> PEPTÍDEO
 <222> (1)..(537)
 <223> Sequência dos domínios extracelulares de hemaglutinina do vírus de
 influenza aviária A/Hong Kong/1073/99 (H9N2).
 <400> 10
 Met Glu Thr Ile Ser Leu Ile Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Ser
 1 5 10 15
 Asn Ala Asp Lys Ile Cys Ile Gly His Gln Ser Thr Asn Ser Thr Glu
 20 25 30
 Thr Val Asp Thr Leu Thr Glu Thr Asn Val Pro Val Thr His Ala Lys
 35 40 45
 Glu Leu Leu His Thr Glu His Asn Gly Met Leu Cys Ala Thr Ser Leu
 50 55 60
 Gly His Pro Leu Ile Leu Asp Thr Cys Thr Ile Glu Gly Leu Val Tyr
 65 70 75 80
 Gly Asn Pro Ser Cys Asp Leu Leu Leu Gly Gly Arg Glu Trp Ser Tyr
 85 90 95
 Ile Val Glu Arg Ser Ser Ala Val Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asn
 100 105 110
 Val Glu Asn Leu Glu Glu Leu Arg Thr Leu Phe Ser Ser Ala Ser Ser
 115 120 125
 Tyr Gln Arg Ile Gln Ile Phe Pro Asp Thr Thr Trp Asn Val Thr Tyr
 130 135 140
 Thr Gly Thr Ser Arg Ala Cys Ser Gly Ser Phe Tyr Arg Ser Met Arg
 145 150 155 160
 Trp Leu Thr Gln Lys Ser Gly Phe Tyr Pro Val Gln Asp Ala Gln Tyr
 165 170 175
 Thr Asn Asn Arg Gly Lys Ser Ile Leu Phe Val Trp Gly Ile His His
 180 185 190
 Pro Pro Thr Tyr Thr Glu Gln Thr Asn Leu Tyr Ile Arg Asn Asp Thr
 195 200 205
 Thr Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Leu Asn Arg Thr Phe Lys Pro Val
 210 215 220
 Ile Gly Pro Arg Pro Leu Val Asn Gly Leu Gln Gly Arg Ile Asp Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Trp Ser Val Leu Lys Pro Gly Gln Thr Leu Arg Val Arg Ser Asn
 245 250 255
 Gly Asn Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Gly His Val Leu Ser Gly Gly Ser
 260 265 270
 His Gly Arg Ile Leu Lys Thr Asp Leu Lys Gly Gly Asn Cys Val Val
 275 280 285
 Gln Cys Gln Thr Glu Lys Gly Gly Leu Asn Ser Thr Leu Pro Phe His
 290 295 300

Asn	Ile	Ser	Lys	Tyr	Ala	Phe	Gly	Thr	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Arg	Val	305	310	315	320
Asn	Ser	Leu	Lys	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Arg	Asn	Val	Pro	Ala	Arg	Ser	325	330	335	
Ser	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	340	345	350	
Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Gln	His	Ser	Asn	Asp	Gln	355	360	365	
Gly	Val	Gly	Met	Ala	Ala	Asp	Arg	Asp	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	370	375	380	
Lys	Ile	Thr	Ser	Lys	Val	Asn	Asn	Ile	Val	Asp	Lys	Met	Asn	Lys	Gln	385	390	395	400
Tyr	Glu	Ile	Ile	Asp	His	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Thr	Arg	Leu	Asn	405	410	415	
Met	Ile	Asn	Asn	Lys	Ile	Asp	Asp	Gln	Ile	Gln	Asp	Val	Trp	Ala	Tyr	420	425	430	
Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Glu	Asn	Gln	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	435	440	445	
His	Asp	Ala	Asn	Val	Asn	Asn	Leu	Tyr	Asn	Lys	Val	Lys	Arg	Ala	Leu	450	455	460	
Gly	Ser	Asn	Ala	Met	Glu	Asp	Gly	Lys	Gly	Cys	Phe	Glu	Leu	Tyr	His	465	470	475	480
Lys	Cys	Asp	Asp	Gln	Cys	Met	Glu	Thr	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asn	485	490	495	
Arg	Arg	Lys	Tyr	Arg	Glu	Glu	Ser	Arg	Leu	Glu	Arg	Gln	Lys	Ile	Glu	500	505	510	
Gly	Val	Lys	Leu	Glu	Ser	Glu	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ile	Leu	Thr	Ala	Ser	515	520	525	
His	His	His	His	His	His	Met	Asn	Ser								530	535		

REIVINDICAÇÕES

1. Antígeno vacinal quimérico contra o vírus da influenza aviária (IA), caracterizado pelo fato de que contém o segmento extracelular da HA da envoltura do vírus da IA e o segmento extracelular da molécula
5 CD154.

2. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que contém essencialmente as seqüências aminoácidas do segmento extracelular da molécula CD154 de origem aviar (Id. Sec. No. 6), suíno (Id. Sec. No. 8) ou humano (Id. Sec. No. 4).

10 3. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que contém essencialmente as seqüências aminoácidas do segmento extracelular da HA dos subtipos virais H5 (Id. Sec. No. 2), H7 (Id. Sec. No. 9) e H9 (Id. Sec. No. 10).

15 4. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é obtido por via recombinante, sintética ou mediante conjugação química.

5. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é obtido a partir do leite de mamíferos geneticamente modificados.

20 6. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que é obtido a partir do leite de mamíferos não transgênicos mediante a transformação genética direta da glândula mamária.

25 7. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a transformação genética direta da glândula mamária se realiza mediante o emprego de vetores adenovirais.

8. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que é obtido a partir do leite de mamíferos transgênicos.

9. Antígeno vacinal quimérico de acordo com a reivindicação

4, caracterizado pelo fato de que é obtido a partir de fermentos modificados geneticamente.

5 10. Composição de vacina capaz de produzir uma resposta imune protetora contra o vírus da influenza aviária (IA) em aves e em mamíferos, caracterizada pelo fato de que contém os antígenos quiméricos descritos nas reivindicações 1 a 9.

 11. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que é capaz de produzir uma resposta imune protetora contra o vírus da IA em aves, em porcos e em humanos.

10 12. Composição de vacina de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que pode ser administrada aos animais, de forma preventiva, por rota sistêmica ou mucosal.

FIGURA 1

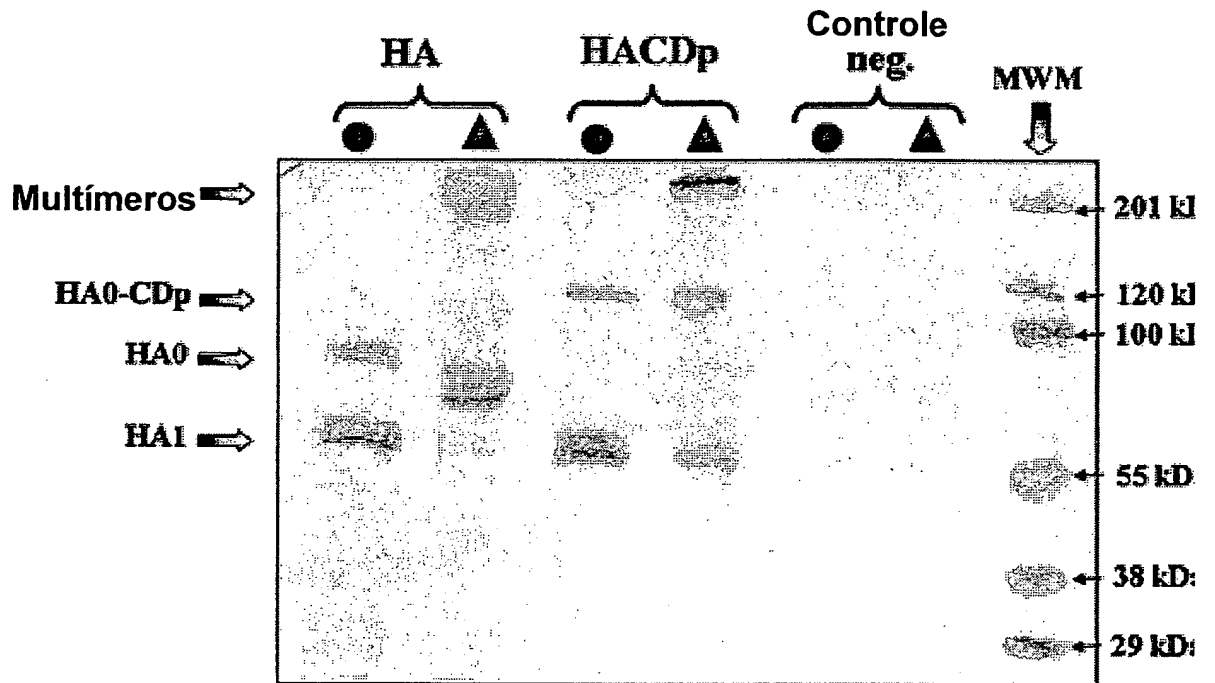


FIGURA 2

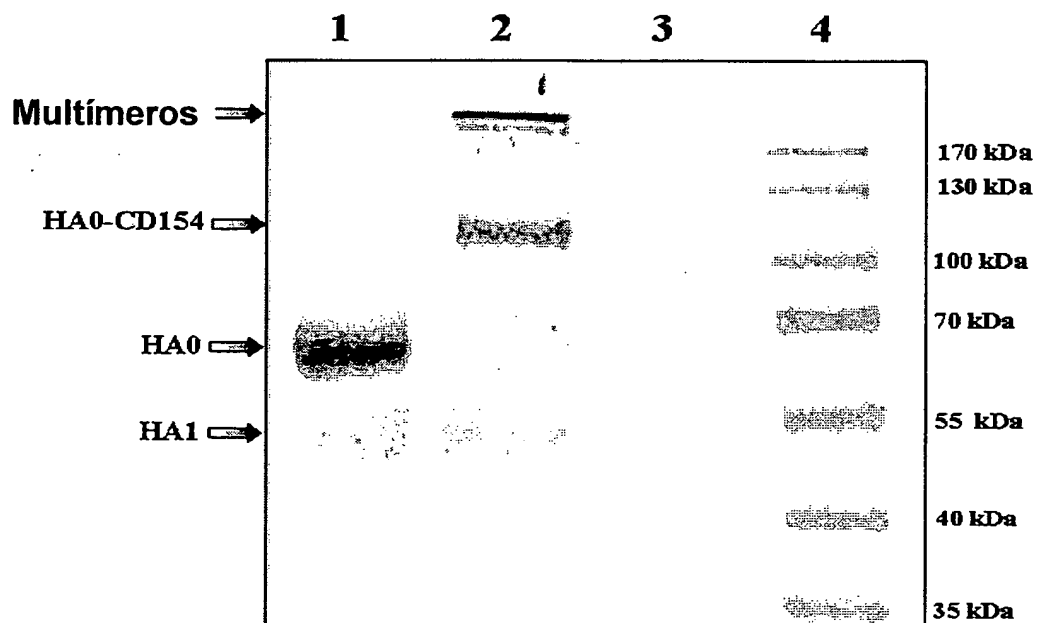


FIGURA 3

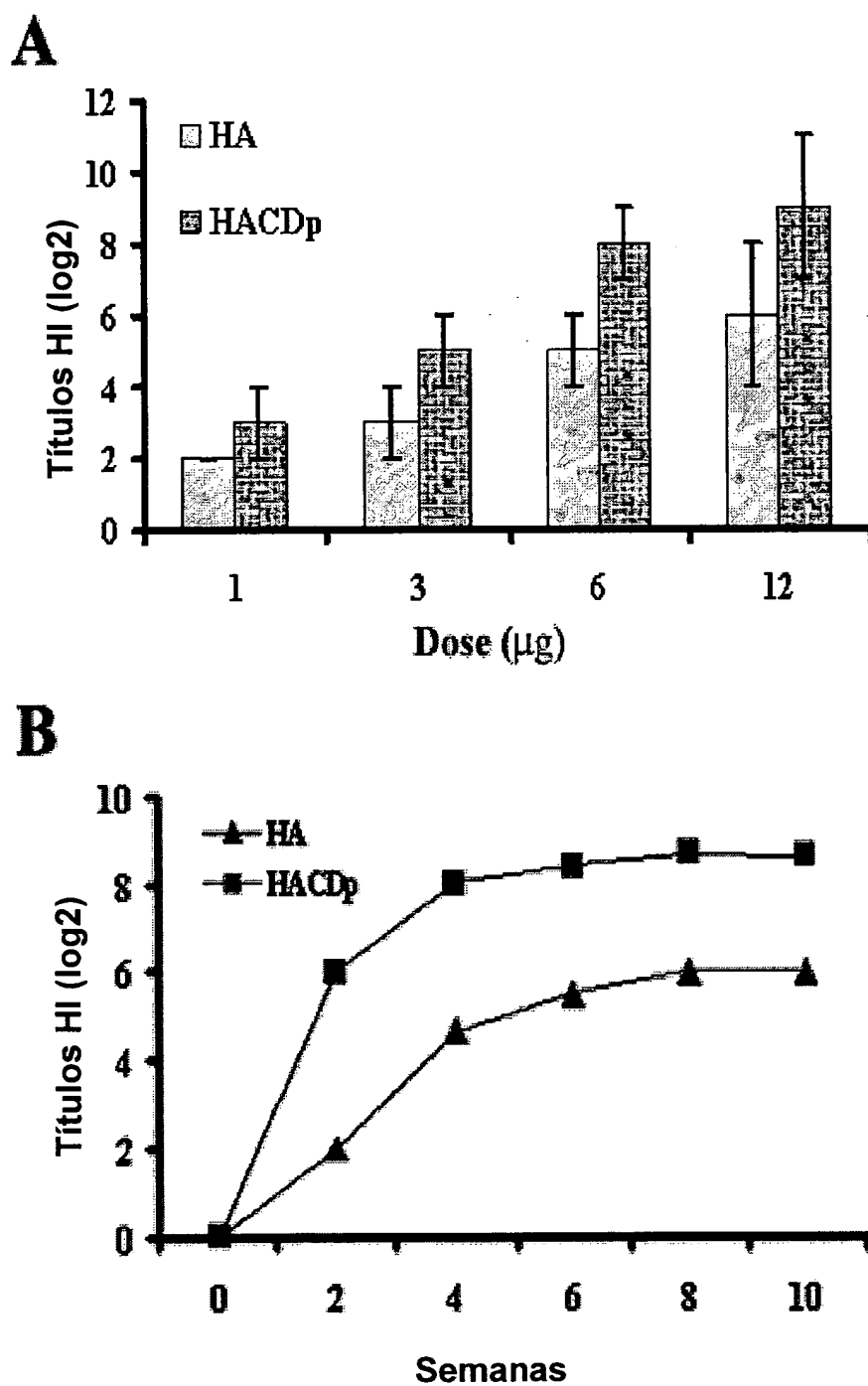
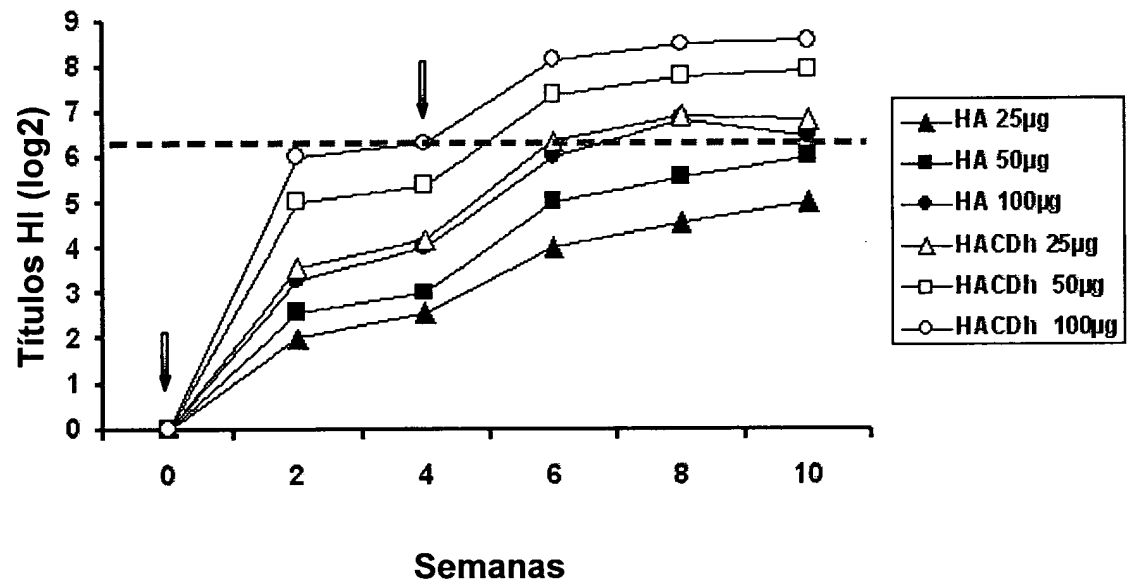


FIGURA 4



RESUMO

“ANTÍGENO VACINAL QUIMÉRICO CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA E COMPOSIÇÃO DE VACINA CAPAZ DE PRODUZIR UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA O VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA EM AVES E EM MAMÍFEROS”

A presente invenção descreve antígenos vacinais quiméricos contra o vírus da influenza aviária (IA). Os referidos antígenos vacinais são baseados em subunidades virais que estão acopladas a moléculas protéicas estimuladoras do sistema imune, tanto celular como humoral. Os antígenos quiméricos podem ser produzidos em sistemas de expressão que garantem um correto dobramento tridimensional das moléculas quiméricas que constituem a base da presente invenção. As composições vacinais que contêm os referidos antígenos quiméricos induzem uma resposta imune potente e temporã tanto nas aves quanto nos mamíferos vacinados, estimulando altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação e uma potente resposta celular específica contra o antígeno viral. Os antígenos quiméricos, assim como as composições vacinais resultantes são aplicáveis à esfera da saúde humana e animal, como vacinas para uso preventivo.