



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

(21) PI 0710689-0 A2



(22) Data de Depósito: 20/04/2007  
(43) Data da Publicação: 22/02/2012  
(RPI 2146)

(51) Int.Cl.:

A61K 39/145  
A61K 39/12  
A61K 49/00  
A01N 63/00  
A01N 65/00  
A61B 5/055

(54) Título: MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UMA VACINA DE AIV FEITA DE PLANTA E A REFERIDA VACINA

(30) Prioridade Unionista: 21/04/2006 US 60/793,804

(73) Titular(es): Dow Agrosciences LLC

(72) Inventor(es): Matthew J. Henry, Steven Robert Webb

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007067069 de 20/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/060669de 22/05/2008

(57) Resumo: MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UMA VACINA DE AIV FEITA DE PLANTA E A REFERIDA VACINA. A presente invenção refere-se a vacinas para influenza e particularmente vacinas para influenza da ave (AIV). A invenção inclui métodos para preparação de células de planta transgênica para expressar polipeptídeos de HA1 conhecidos tendo homologias especificadas que são usados para preparar composições de vacina e métodos para indução de imunidade protetora em um indivíduo, animal, mamífero ou ser humano.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "VACINA PARA INFLUENZA DA AVE E MÉTODOS DE USO".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório 5 U.S. Nº de Série 60/793.804 depositado em 21 de abril de 2006, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras, tabelas e seqüências de aminoácido ou ácido nucléico.

Antecedentes da Invenção

Exames recentes de seqüências publicadas para hemaglutinina 10 (HA) de cepas H5N1 Vietnam indicam que essas cepas altamente patogênicas são mais variáveis do que previamente observado. Seria então inesperado que vacinas com menos do que 90% de homologia com cepas de provação fossem eficazes no controle de sintomas ou reduzissem espalhamento.

15 Foi avaliado pela requerente o registro público de seqüências de aminoácido completas e verificado que a homologia de seqüência do fragmento HA1 da proteína viral hemaglutinina (HA) em sorotipo H5 seja 100 a 83% homóloga à Cepa Turkey Wiscosin 68 no nível de aminoácido. Publicações recentes de Swayne e outros (*Vet. Micro*, 2000, 74:165-172) mostraram 20 que uma vacina para AIV baseada em HA veteirizada com *fowl pox* era capaz de prevenir infecção em um experimento de provação heterotípico com cepas de AIV que continham HA1 com 87% ou mais de homologia de aminoácido conforme comparado com a vacina de imunização. Os autores concluem "Que vacinas com menos do que 90% de homologia para o pató- 25 geno HA1 vão mais provavelmente resultar em redução inconsistente em provação por AI ou espalhamento do vírus no campo a partir do trato respiratório".

Breve Sumário da Invenção

A presente invenção provê um método de indução de uma resposta imunoprotetora contra uma cepa de Vírus Influenza da Ave (AIV) em 30 um animal ou ser humano que compreenda:

- a) expressão em uma célula de planta de uma seqüência de áci

do nucléico compreendendo polipeptídio de região variável HA1 conhecido que tem entre cerca de 70% a cerca de 90% de homologia para um polipeptídio de região variável HA1 da cepa de provação;

5 b) preparação de uma composição de vacina usando o polipeptídio de região variável HA1 conhecido expresso na dita célula de planta, e;

c) administração da dita composição de vacina a um animal ou ser humano de modo que uma resposta imunoprotetora seja induzida no dito animal ou ser humano.

A invenção provê ainda vetores, células hospedeiras e novas 10 composições de vacina para prática dos métodos acima mencionados. Tais composições de vacina compreendem seqüências de polipeptídio de HA1 conhecidas, produzidas por planta, que provêm imunidade protetora abaixo do nível de homologia de 90% comparado com uma cepa de provação quando administradas a um animal ou ser humano.

15 **Breve Descrição das Seqüências**

A proteína HA da influenza da ave de seqüência A/Turkey/Wiscosin/68 de influenza é mostrada abaixo. Esta proteína HA contém 568 aminoácidos e exibe 5 domínios distintos incluindo: um peptídeo de sinal (1-16 aminoácidos); a região principal variável de fragmento H1 (aminoácidos 17-323 [também referida aqui como HA1]); a região de base constante de fragmento H2 (aminoácidos 324-527); o domínio de transmembrana (aminoácidos 528-557); e o fragmento de lipídeo tioéster intracelular (aminoácidos 558-568).

A seqüência de comprimento integral e fragmentos acima identificados é mostrada abaixo:

A proteína HA de influenza da ave de comprimento completo (SEQ ID Nº:1):  
MERIVIALAIISVVKGDQICIGYHANNSTKQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKEHN  
GKLCSLKGVRPLILKDCSVAGWLLGNPMCDFLNVPFWSYIVEKDNPNTNGL  
CYPGDFNDYEELKYLMSNTNHFEKIQIIPRNSWSNHDASSGVSSACPYNGR  
30 SSFFRNVVWLIKKSNAEPTIKRTYNNTNVEDLLILWGIHHPNDAAEQTELYQ  
NSNTYVSVGTSTLNQRSIPEIATRPKVNGQSGRIEFFWTILRPNDAISFESN  
GNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMRSELEYGNCDTKCQTPVGAINSSMPFHNVH

- PLTIGECPKYVKSDKLVLATGLRNVPQRETRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDG  
WYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGITNKVNSIIDKMNTQFEAVGKEFN  
NLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSYVKNLYDKV  
RLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEESRLNRE
- 5 EIDGVKLESMGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSF WMCSNGSLQCRICI;  
Peptídeo de sinal (SEQ ID Nº:2): MERIVIALAIISVVKG;  
Fragmento de região principal variável de H1 (HA1) (SEQ ID Nº:3):  
DQICIGYHANNSTKVQVTIMEKNVTVTQAQDILEKEHNGKLC SLKGVRPLILK  
DCS VAGWLLGNPMCDEF LN VP EWSYIVEKDNP TNGLC YPGDFNDYEEELKY
- 10 LMSNTNHFEKIQIIPRNSWSNHDASSGVSSACPYNGRSSFFRN VVWL IKKS  
NAYPTIKRTYNNTNV E D L L I L W G I H H P N D A A E Q T E LY Q N S N T Y V S V G T S T L N  
QR SIPEIATRPKVNGQSGRIEFFWTILRPNDAISFESNGNFI APEYAYKIVKK  
GDS AIM RSELEYGN CDT K C Q T P V G A I N S S M P F H N V H P L T I G E C P K Y V K S D K  
LVLATGLRNVPQRETR;
- 15 Fragmento constante de base H2 (SEQ ID Nº:4):  
GLFGAIAGFIEGGWQGMVDG WYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGITN  
KVNSIIDKMNTQFEAVGKEFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVL  
MENERTLDFHDSYVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMES  
VRNGTYDYPQYSEESRLNREEIDGVKLESMGTY;
- 20 Âncora de transmembrana (SEQ ID Nº:5): QILSIYSTVASSLALAIMVA-  
GLSFWMCS; e  
Fragmento de lipídeo de tioéster intracelular (SEQ ID Nº:6): NGSLQCRICI  
Outra seqüência de proteína HA de influenza da ave, A/Mallard  
Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2; ACESSO AAF04720) é mostrada abaixo.  
25 A seqüência de comprimento integral e fragmentos identificados é mostrada abaixo:  
A proteína HA de comprimento integral (SEQ ID Nº:7):  
MERIVIALAIISVVKG DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTQAQDILEKEHN  
GKLCSLKGVRPLILKDCS VAGWLLGNPMCDEF LN VP EWSYIVEKDNP VNGL
- 30 CYPGDFNDYEEELKHLMSSTNHFEKIQIIPRSSWSNHDASSGVSSACPYNGR  
SSFFRN VVWL IKKNNAYPTIKRTYNNTNV E D L L I L W G I H H P N D A T E Q T K L Y Q  
NSNTYVSVGTSTLNQR SIPEIATRPKVNGQSGRM EFFWTILRPNDAISFESN

- GNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPVGAINSSMPFHNVHP  
LTIGECPKYVKSDKLVLATGLRNVPQRETRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDG  
WYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGITNKVNSIIDKMNTQFEVVGKEFN  
NLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVRNLYDKV  
5 RLQLRDNAAKELNGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEESRLNRE  
EIDGVKLESMGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSFWMCNSGSLQCRICI;  
Peptídeo de sinal (SEQ ID Nº: 8): MERIVIALAIISVVKG;  
Fragmento de região principal variável H1 (HA1) (SEQ ID Nº:9):  
DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTQAQDILEKEHNGKLCSLGVRPLILK  
10 DCSVAGWLLGNPMCDEFLNVPEWSYIVEKDNPVNGLCYPGDFNDYEELKH  
LMSSTNHFEKIQIIPRSSWSNHDASSGVSSACPYNGRSSFFRNVVWLICKN  
NAYPTIKRTYNNTNVEDLLILWGIHHPNDATEQTLYQNSNTYVSVGTSTLN  
QRSIPEIATRPKVNGQSGRMEFFWTILRPNDAISFESNGNFIAPYAYKIVKK  
GDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPVGAINSSMPFHNVHPLTIGECPKYVKSDK  
15 LVLATGLRNVPQRETR;  
Fragmento constante de base H2 (SEQ ID Nº:10):  
GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGITN  
KVNSIIDKMNTQFEVVGKEFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVL  
MENERTLDFHDSNVRNLYDKVRLQLRDNAAKELNGNGCFEFYHKCDNECME  
20 SVRNGTY;  
Âncora de transmembrana (SEQ ID Nº:11): QILSIYSTVASSLALAIMVA-  
GLSF; e  
Fragmento de lipídeo de tioéster intracelular (SEQ ID Nº:12): NGSLQCRICI.  
Descrição Detalhada da Invenção  
25 A expectativa por vacinas convencionais é que elas vão prover proteção de infecção de cepas de influenza que são 90% a 100% homólogas comparado com as seqüências de polipeptídio usadas para preparar as vacinas. No caso de vacinas feitas de planta, as propriedades inesperadas de controle de um espectro mais amplo de cepas de influenza com homologias  
30 entre cerca de 70% a cerca de 90% resultam na habilidade em controlar tipos de influenza mais heterotípicos e melhora a eficácia da vacina.  
Acredita-se que antígenos de subunidade de vacina feitos de

planta sejam superiores a antígenos de subunidade convencionalmente preparados porque eles são integrados à matriz celular de membrana e componentes carboidrato da planta provendo uma propriedade adjuvante. O antígeno feito de planta vai também conter padrões de glicosilação de carboidrato de planta únicos conforme comparado com plataformas feitas de não-planta.

Acredita-se ainda que tais estruturas glicano de planta contribuem para um espectro aumentando de proteção cruzada e o uso de antígenos que não são completamente purificados da célula de planta ou componentes de matriz de célula de planta pode ser parcialmente responsável pela habilidade em proteger um indivíduo de infecção por um AIV tendo entre cerca de 90% a cerca de 70% de homologia com o polipeptídeo de HA1 descrito aqui. Como será compreendido, qualquer porcentagem de homologia entre cerca de 70,0% e cerca de 90,0% de homologia é expressamente compreendida pela presente invenção. Então, um polipeptídeo de região variável HA1 conhecido pode ter pelo menos 70% e menos do que Y% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provocação, onde Y é selecionado de 87,0%, 86,5%, 86,0%, 85,5% 85,0%, 84,5%, 84,0%, 83,5%, 83,0%, 82,5%, 82,0%, 81,5%, 81,0%, 80,5%, 80,0%, 79,5%, 79,0%, 78,5%, 78,0%, 77,5%, 77,0%, 76,5%, 76,0%, 75,5%, 75,0%, 74,5%, 74,0%, 73,5%, 73,0%, 72,5%, 72,0%, 71,5% ou 71,0%. Alternativamente, o polipeptídeo de região variável HA1 conhecido pode ter entre 70% e 71,0%, 71,5%, 72,0%, 72,5%, 73,0%, 73,5%, 74,0%, 74,5%, 75,0%, 75,5%, 76,0%, 76,5%, 77,0%, 77,5%, 78,0%, 78,5%, 79,0%, 79,5%, 80,0%, 80,5%, 81,0%, 81,5%, 82,0%, 82,5%, 83,0%, 83,5%, 84,0%, 84,5%, 85,0%, 85,5%, 86,0%, 86,5% ou 87,0% de homologia com um polipeptídeo de região variável HA1 da cepa de provocação.

Polipeptídeos de HA1 de acordo com a presente invenção podem ser completamente ou parcialmente purificados de seus sistemas de expressão conforme descrito na US 2004/0268442 e no WO 2004/098533, ambos aqui incorporados a título de referência em sua totalidade. Então, polipeptídeos de HA1 parcialmente purificados podem existir em uma com-

posição que inclui várias partes ou porções do sistema de expressão de célula de planta onde polipeptídeo foi feito. Por exemplo, onde sistemas de expressão de planta são usados para a produção de polipeptídeos de HA1, uma composição compreendendo o polipeptídeo de HA1 purificado identificado aqui pode incluir componentes de célula de planta (por exemplo, paredes celulares, a matriz celular de membranas de célula de planta e carboidratos, etc) ou componentes de matriz de célula de planta.

Antígenos feitos de planta recombinantes em homogenatos de planta isolados podem conter vários constituintes de planta incluindo, mas não limitado a, material de parede celular, carboidratos pequenos, membranas, componentes de lipídeo, proteínas, ácidos nucléicos bem como intermediários biossintéticos pequenos e metabólitos secundários. Tais preparações de vacina feitas de planta estimulam uma resposta imune com títulos geralmente mais altos do que os mesmos抗ígenos purificados para homogeneidade ou preparados em sistemas convencionais. A resposta mais alta inesperada em invocar soroconversão pelo antígeno produzido por célula de planta enriquecido formulado, conforme comparado com o material bruto formulado ou抗ígenos de vacina convencionalmente preparados, é creditada ser devido a uma apresentação única do antígeno a células do sistema imune bem como a estabilidade aperfeiçoada do antígeno durante processamento, formulação e armazenamento.

O efeito sinérgico ou tipo adjuvante da matriz de planta ou componentes sobre a atividade do antígeno é uma propriedade que é única para a plataforma de expressão de planta. Esta propriedade aperfeiçoada provê a habilidade em administrar doses baixas de antígeno e provê melhor proteção da provocação de doença.

Acredita-se que抗ígenos feitos de planta e matriz de célula de planta que estão contidos dentro das preparações descritas aqui tenham um efeito significante sobre as respostas imunes celular e humoral em animais de preferencialmente ao se dirigir a células apresentando抗ígeno profissionais (APCs). Este direcionamento preferencial acontece através da interação da matriz de planta e/ou o抗ígeno feito de planta, especificamente抗ígeno-

nos glicosilados de planta, diretamente com receptores de manose e receptores de lectina tipo C relacionados em APCs. Essas APCs são capazes de processar e apresentar os抗ígenos a outros componentes do sistema imune através de outros receptores em sua superfície (por exemplo, complexo de histocompatibilidade principal Classe II) e pode dirigir ambas respostas imunes humoral e mediadas por células. A proliferação de células auxiliares T (Th) 1 e 2 é bastante aumentada por抗ígenos que podem interagir diretamente com as células APC quando apresentados como parte integral da matriz de célula de planta e/ou como抗ígenos glicosilados de planta. Interações direcionadas com essas APCs através de sua MR ou receptores de lectina apropriados são responsáveis pelas respostas imunes celular e humoral robustas. Imunidade celular associada com imunidade de célula T CD8<sup>+</sup> foi apenas conseguida através de vacinação com patógenos atenuados vivos. Esta imunidade é uma necessidade importante para o controle de patógenos intracelulares tal como *Leshmania* spp e vírus (D.M. Pardoll, *Nat. Med.*, 1998, 4, 525-531).

As posições de aminoácido das regiões variáveis da miríade de polipeptídeos de HA conhecidos vão diferir das posições de aminoácido da região e HA1 da SEQ ID N°:1 e da SEQ ID N°:7, no entanto, tais regiões podem ser prontamente discernidas por aqueles versados na técnica (vide, por exemplo, De BK; Brownlee GG; Kendal AP; Shaw MW, 1988, *Nucleic Acids Res.*, 16, 4181-4182, incorporados aqui em sua totalidade). Em infecção natural, HA inativada é amadurecida em HA1 e HA2 fora da célula por uma ou mais endoproteases específicas de arginina, tipo tripsina, secretadas pelas células epiteliais bronquiais. Uma protease identificada envolvida neste processo é triptase Clara. O grau de infecção no organismo hospedeiro é determinado por HA. Vírus influenza floresce da superfície apical de células epiteliais polarizadas (por exemplo, células epiteliais bronquiais) para o lúmen de pulmões e são então geralmente pneumotrópicos. O fragmento de HA1 se liga a receptores contendo ácido siálico sobre a superfície celular, causando a ligação da partícula de vírus à célula. Ele também desempenha um papel principal na determinação da restrição e virulência da faixa de

hospedeiro. O fragmento de HA1 é uma proteína de fusão viral de classe I e é responsável pela penetração do vírus no citoplasma da célula mediando a fusão da membrana da partícula de vírus endocitosado com a membrana endossomal. pH baixo em endossomas induz uma mudança conformacional irreversível em HA2, liberando o peptídeo hidrofóbico de fusão. Vários trímeros são requeridos para formar um poro de fusão competente.

A expressão "vírus influenza da ave heterólogo" ou "cepa(ns) do vírus influenza da ave heterólogo" deve ser considerada como vírus influenza da ave (ou cepas) que expressam um polipeptídeo de HA1 heterólogo ou relacionado que exibe entre cerca de 70% a cerca de 90% de homologia de seqüência com a seqüência de aminoácido do antígeno de vacina de subunidade feito de planta.

Para determinar a atividade de espectro que uma vacina pode possuir para a proteção de infecção por uma cepa de influenza heterotípica, uma comparação da homologia da seqüência de aminoácido é realizada. Esta análise de homologia é realizada comparando a homologia do fragmento principal variável de H1 usando a seqüência de aminoácido 17 a 323 através de análise BLAST. A análise BLAST é realizada como segue: o banco de dados de proteína não-redundante NCBI é baixado do site FTP (<ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA>) como *nr.gz* em um computador rodando ou com Linux (Red Hat Enterprise Linus 3.2) ou UNIX (Solaris 8). O arquivo que vem compactado é descompactado com a ferramenta *gunzip* e é então formatado para uso com BLAST com o programa *formatdb* que vem com a instalação BLAST. Uma pesquisa *blastp* (versão 2.2.4 em UNIX ou versão 2.2.13 em Linux) da seqüência de pesquisa versus o banco de dados *nr* formatado é realizada usando um caso local do programa BLAST ou através de uma interface da web ou na linha de comando dependendo de se a pesquisa retorna mais do que 500 *hits* significantes (limite da web) e da análise a ser feita após a análise BLAST. O número de entradas de vírus influenza no banco de dados da seqüência está agora nos milhares de proteínas.

A análise resultante relata aquelas seqüências que têm uma homologia estatisticamente significante para a seqüência de referência. A

significância estatística é dependente do ajuste de parâmetros tal como a matriz de *scoring* usada e o valor esperado selecionado bem como o custo de abrir e estender uma lacuna bem como as penalidades para falta de combinação. Os parâmetros usados eram os parâmetros *default* do programa BLAST.

Polipeptídeos compreendendo fragmentos de HA1 conhecidos descritos aqui podem ser também fundidos a uma ou mais seqüências de polipeptídeo heterólogas (por exemplo, *tags* que facilitam purificação do polipeptídeo da invenção (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.342.362, aqui

incorporada a título de referência em sua totalidade; Altendorf *e outros*, [1999-WWW, 2000] "Structure and Function of the F<sub>0</sub> Complex of the ATP Synthase from *Escherichia Coli*," *J. of Experimental Biology* 203:19-28, The Co. of Biologists, Ltd., G.B.; Baneyx [1999] "Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*," *Biotechnology* 10:411-21, Elsevier Science Ltd.; Eihauer

*e outros*, [2001] "The FLAG® Peptide, a Versatile Fusion Tag for the Purification of Recombinant Proteins," *J. Biochem Biophys Methods* 49:455-65; Jones *e outros*, [1995] *J. Chromatography* 707:3-22; Jones *e outros*, [1995] "Current Trends in Molecular Recognition and Bioseparation," *J. of Chromatography A*. 707:3-22, Elsevier Science B.V.; Margolin [2000] "Green Fluorescent Protein as a Reporter for Macromolecular Localization in Bacterial Cells," *Methods* 20:62-72, Academic Press; Puig *e outros*, [2001] "The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification," *Methods* 24:218-29, Academic Press; Sassenfeld

[1990] "Engineering Proteins for Purification," TibTech 8:88-93; Sheibani [1999] "Prokaryotic Gene Fusion Expression Systems and Their Use in Structural and Functional Studies of Proteins," *Prep. Biochem. & Biotechnol.* 29(1):77-90, Marcel Dekker, Inc.; Skerra *e outros*, [1999] "Applications of a Peptide Ligand for Streptavidin: the Strep-tag", *Biomolecular Engineering* 16:79-86, Elsevier Science, B.V.; Smith [1998] "Cookbook for Eukaryotic Protein Expression: Yeast, Insect, and Plant Expression Systems," *The Scientist*

12(22):20; Smyth *e outros*, [2000] "Eukaryotic Expression and Purification of Recombinant Extracellular Matrix Proteins Carrying the Strep II Tag", *Me-*

*thods in Molecular Biology*, 139:49-57; Unger [1997] "Show Me the Money: Prokaryotic Expression Vectors and Purification Systems," *The Scientist* 11(17):20, cada um deles é aqui incorporado a título de referência em suas totalidades), ou *tags* comercialmente disponíveis de vendedores tal como 5 STRATAGENE (La Jolla, CA), NOVAGEN (Madison, WI), QIAGEN, Inc. (Valencia, CA) ou InVitrogen (São Diego, CA). Por exemplo, seqüências heterólogas incluem seqüências não-traduzidas, transcritas, que podem desempenhar um papel em transcrição e processamento de mRNA tal como ligação de ribossomo e estabilidade de mRNA. As seqüências heterólogas podem 10 alternativamente compreender seqüências de codificação adicionais que provêem funcionalidades adicionais. Então, uma seqüência de nucleotídeo codificando um polipeptídeo pode ser fundida a uma seqüência *tag*, tal como uma seqüência codificando um peptídeo que facilita a purificação ou detecção do polipeptídeo fundido. Em certas modalidades deste aspecto da invenção, a seqüência de aminoácido *tag* é um peptídeo hexa-histidina, tal 15 como o *tag* provido em um vetor pQR (QIAGEN), ou em qualquer um de vários vetores comercialmente disponíveis, adicionais. Por exemplo, hexahistidina provê a purificação convencional da proteína de fusão (vide, Gentz e outros, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Fev; 86(3):821-4, cuja descrição é 20 aqui incorporada a título de referência em sua totalidade). Os polipeptídeos da presente invenção podem ser também fundidos com o domínio constante de imunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), ou suas porções (CH1, CH2, CH3, quaisquer combinações delas incluindo ambos domínios integrais e suas porções) resultando em polipeptídeos quiméricos. Essas proteínas de fusão 25 facilitam purificação, e mostram uma meia-vida aumentada *in vivo*. Em outras modalidades, polipeptídeos de HA descritos e usados aqui podem ser fundidos a seqüências de polipeptídeo heterólogas que têm atividade adjuvante (um adjuvante de polipeptídeo). Exemplos não-limitantes de tais polipeptídeos incluem proteínas de choque térmico (hsp) (vide, por exemplo, 30 Patente U.S. Nº 6.524.825, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade).

Adjuvantes ou componentes imunoestimuladores úteis na prepa-

ração das composições acima mencionadas incluem, e não estão limitados a, sais de alumínio, óleos minerais, produtos micobacterianos (por exemplo, adjuvante completo ou incompleto de Freund) ou veículos tal como uma mistura da glicosídeo da planta saponina, colesterol e fosfatidilcolina que provê 5 um veículo para apresentação de várias cópias da proteína em uma estrutura tipo gaiola. Para propósitos do presente pedido, um adjuvante é uma substância que acentua, aumenta, modera ou realça a resposta imune a um imunógeno ou antígeno. Adjuvantes tipicamente realçam ambas respostas imunes humoral e celular mas uma resposta aumentada a uma na ausência 10 da outra qualifica para definir um adjuvante. Além disso, adjuvantes e seus usos são bem conhecidos dos imunologistas e são tipicamente empregados para realçar a resposta imune quando doses de imunógeno são limitadas, quando o imunógeno é pobemente imunogênico ou quando a via de administração é subótima. Então o termo ‘quantidade adjuvante’ é aquela quantidade 15 de adjuvante capaz de realçar a resposta imune para um dado imunógeno ou antígeno. A massa que iguala uma ‘quantidade adjuvante’ vai variar e é dependente de uma variedade de fatores incluindo, mas não limitado a, as características do imunógeno, a quantidade de imunógeno administrado, a espécie do hospedeiro, a via de administração e os protocolos para administração 20 do imunógeno. A ‘quantidade adjuvante’ pode ser prontamente quantificada através de experimentação de rotina dado um conjunto particular de circunstâncias. Isto está bem dentro da habilidade do versado na técnica e tipicamente emprega o uso de determinações de resposta de dose de rotina a quantidades variáveis de imunógeno e adjuvante administrados. 25 Respostas são medidas através da determinação dos títulos de anticorpo no soro ou respostas mediadas por célula criadas para o imunógeno usando ensaios imunoabsorventes ligados à enzima, radioimunoensaios, ensaios de hemaglutinina e similar.

Vacinação e vacinando são definidas como um meio para provisão 30 de proteção contra um patógeno através de inoculação de um hospedeiro com uma preparação imunogênica, uma partícula imunoprotetora ou uma preparação imunogênica de um agente patogênico, ou uma forma não-

virulenta de sua parte, de modo que o sistema hospedeiro imune é estimulado e previne ou atenua patologia indesejada subsequente associada com as reações do hospedeiro a exposições subsequentes do patógeno. No caso da presente invenção, vacinação com as composições da invenção resulta em  
5 uma redução em mortalidade ou morte e/ou espalhamento viral a partir do trato respiratório.

Administração ou administrar é definido como a introdução de uma substância no corpo de um animal, incluindo um ser humano, e inclui vias oral, nasal, ocular, retal, vaginal e parenteral. Composições podem ser  
10 administradas individualmente ou em combinação com outros agentes terapêuticos através de qualquer via de administração, incluindo, mas não limitado a, subcutânea (SQ), intramuscular (IM), intravenosa (IV), intraperitoneal (IP), intradermal (ID), via a mucosa nasal, ocular ou oral (IN) ou oralmente.

A presente invenção também provê métodos para uso de seqüências de polinucleotídeo isoladas, recombinantes e/ou purificadas conhecidas compreendendo:  
15

- a) uma seqüência de polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de região variável HA1 conhecido que tem entre cerca de 70% a cerca de 90% de homologia com um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa  
20 de provação;
- b) um polinucleotídeo que é complementar aos polinucleotídeos mostrados em (a);
- c) um construto genético compreendendo uma seqüência de polinucleotídeo conforme mostrado em (a) ou (b);
- d) um vetor compreendendo um polinucleotídeo ou construto genético conforme mostrado em (a), (b) ou (c); ou  
25
- e) uma célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo, construto genético ou vetor conforme mostrado em (a), (b), (c) ou (d).

Os termos "seqüência de nucleotídeo", "polinucleotídeo" ou "ácido nucléico" podem ser usados intercomutavelmente e são compreendidos significar, de acordo com a presente invenção, ou um DNA de filamento duplo, um DNA de filamento simples ou produtos de transcrição dos ditos  
30

DNAs (por exemplo, moléculas de RNA). Deve ser também compreendido que a presente invenção não se refere a seqüências de polinucleotídeo em seu ambiente natural ou estado natural. As seqüências de ácido nucléico, polinucleotídeo ou nucleotídeo da invenção podem ser isoladas, purificadas 5 (ou parcialmente purificadas), através de métodos de separação incluindo, mas não limitado a, cromatografia de troca de íon, cromatografia de exclusão de tamanho molecular ou através de métodos de engenharia genética tal como amplificação, hibridização subtrativa, clonagem, subclonagem ou síntese química, ou combinações desses métodos de engenharia genética.

10 Ambas homologias de proteína e ácido nucléico podem ser avaliadas usando qualquer um de uma variedade de algoritmos de comparação de seqüência e programas conhecidos na técnica e estão disponíveis em bancos de dados publicamente acessíveis (por exemplo, vide *world wide web sites*: [ebi.ac.uk/fasta33/index.html](http://ebi.ac.uk/fasta33/index.html) (*European Biotechnology Institute*); or 15 [ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (*National Center for Biotechnology Information*)). Tais algoritmos e programas incluem, mas não estão limitados a, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA e CLUSTALW (Pearson e Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(8):2444-2448; Altschul e outros, 1990, *J. Mol. Biol.*, 215(3):403-410; Thompson e outros, 1994, *Nucleic Acids Res.*, 22(2):4673- 20 4680; Higgins e outros,, 1996, *Methods Enzymol.*, 266:383-402; Altschul e outros , 1990, *J. Mol. Biol.*, 215(3):403-410; Altschul e outros,, 1993, *Nature Genetics*, 3:266-272). Comparações de seqüência são, tipicamente, conduzidas usando parâmetros *default* providos pelo vendedor ou usando aqueles parâmetros mostrados nas referências acima identificadas, que são aqui 25 incorporados a título de referência em suas totalidades.

Uma seqüência de nucleotídeo "complementar", conforme aqui usado, geralmente se refere a uma seqüência que surge da ligação de hidrogênio entre uma purina particular e uma pirimidina particular em moléculas de ácido nucléico de filamento duplo (DNA-DNA, DNA-RNA ou RNA-RNA). Os emparelhamentos específicos principais são guanina com citosina 30 e adenina com timina ou uracila. Uma seqüência de polinucleotídeo "complementar" pode ser também referida como uma seqüência de polinucleotí-

deo de "anti-sentido" ou uma "seqüência de anti-sentido".

Homologia de seqüência e identidade de seqüência podem ser determinadas através de estudos de hibridização sob alta estringência, estringência intermediária e/ou baixa estringência. Quanto mais severas as condições, maior a complementaridade requerida para formação de duplex. Severidade de condições pode ser controlada através de temperatura, concentração de sonda, comprimento de sonda, resistência iônica, tempo e similar. De preferência, hibridização é conduzida sob condições de estringência baixa, intermediária ou alta através de técnicas bem conhecidas na área, conforme descrito, por exemplo, em Keller, G.H., M.M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, Nova York, NY, pp. 169-170.

Por exemplo, hibridização de DNA imobilizado em *Southern blots* com sondas específicas de gene marcadas com  $^{32}\text{P}$  pode ser realizada através de métodos padrão (Maniatis e outros, 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova York). Em geral, hibridização e lavagens subseqüentes podem ser realizadas sob condições de estringência intermediária a alta que permitem a detecção de seqüências alvo com homologia para a seqüência de polinucleotídeo exemplificada. Para sondas de gene de DNA de filamento duplo, hibridização pode ser realizada da noite para o dia a 20-25°C abaixo da temperatura de fusão ( $T_m$ ) do híbrido de DNA em 6X SSPE, solução de Denhardt 5X, SDS a 0,1%, 0,1 mg/ml de DNA desnaturado. A temperatura de fusão é descrita pela fórmula que segue (Beltz e outros, 1983, *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman e K. Moldave, Eds. Academic Press, Nova York, 100:266-285).

$$TM = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \cdot \log[\text{Na}^+] + 0,41(\%G+C) - 0,61(\%\text{formamida}) - 600/\text{comprimento de duplex em pares de base}.$$

Lavagens são tipicamente realizadas como segue:

(1) duas vezes em temperatura ambiente por 15 minutos em 1XSSPE, SDS a 0,1% (lavagem em baixa estringência);

(2) uma vez em  $T_m - 20^\circ\text{C}$  por 15 minutos em 0,2X SSPE, SDS a 0,1% (lavagem de estringência intermediária).

Para sondas de oligonucleotídeo, hibridização pode ser realiza-

da da noite para o dia a 10-20°C abaixo da temperatura de fusão ( $T_m$ ) do híbrido em 6X SSPE, 5X solução de Denhardt, SDS a 0,1%, 0,1 mg/ml de DNA desnaturado.  $T_m$  para sondas de oligonucleotídeo pode ser determinada através da fórmula que segue:

5            $T_m(^{\circ}\text{C})=2(\text{número de pares de base T/A})+4(\text{número de pares de base G/C})$  (Suggs e outros, 1981, *ICN-UCLA Symp. Dev. Biol. Using Purified Genes*, D.D. Brown, ed., Academic Press, Nova York, 23:683-693).

As lavagens podem ser realizadas como segue:

(1) duas vezes em temperatura ambiente por 15 minutos 1X

10       SSPE, SDS a 0,1% (lavagem em baixa estringência);

(2) uma vez na temperatura de hibridização por 15 minutos em 1X SSPE, SDS a 0,1% (lavagem de estringência intermediária).

Em geral, sal e/ou temperatura pode ser alterada para mudar estringência. Com um fragmento de DNA marcado >70 aproximadamente bases de comprimento, as condições que seguem podem ser usadas:

Baixa:           1 ou 2X SSPE, temperatura ambiente

Baixa:           1 ou 2X SSPE, 42°C

Intermediária:   0,2X ou 1X SSPE, 65°C

Alta:           0,1X SSPE, 65°C

20       A título de outro exemplo não-limitante, procedimentos usando condições de alta estringência podem ser também realizados como segue.

Pré-hibridização de filtros contendo DNA é realizada por 8 horas da noite para o dia a 65°C em tampão composto de 6X SSC, Tris-HCl a 50 mM (pH=7,5), EDTA a 1 mM, PVP a 0,02%, Ficoll a 0,02%, BSA a 0,02% e 500

25       mg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. Filtros são hibridizados por 48 horas a 65°C, a temperatura de hibridização preferida, em mistura de pré-hibridização contendo 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado e 5-20 x 10<sup>6</sup> cpm de sonda marcada com <sup>32</sup>P. Alternativamente, a etapa de hibridização pode ser realizada a 65°C na presença de tampão

30       SSC, 1X SSC correspondendo a NaCl a 0,15M e citrato de Na a 0,05 M.

Subseqüentemente, lavagens de filtro podem ser feitas a 37°C por uma hora em uma solução contendo 2X SSC, PVP a 0,01%, Ficoll a 0,01% e BSA a

0,01%, seguido por uma lavagem em 0,1X SSC a 50°C por 45 minutos. Alternativamente, lavagens de filtro podem ser realizadas em uma solução contendo 2X SSC e SDS a 0,1% ou 0,5X SSC e SDS a 0,1% ou 0,1X SSC e SDS a 0,1% a 68°C por intervalos de 15 minutos. Segundo as etapas de

- 5 lavagem, as sondas de hibridização são detectáveis através de autoradiografia. Outras condições de alta estringência que podem ser usadas são bem conhecidas na técnica conforme citado em Sambrook e outros, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Press, N.Y., pp. 9.47-9.57; e Ausubel e outros, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. são incorporados aqui em sua totalidade.

Outro exemplo não-limitante de procedimentos usando condições de estringência intermediária é como segue: Filtros contendo DNA são pré-hibridizados e então hibridizados em uma temperatura de 60°C na presença de um tampão 5X SSC e sonda marcada. Subseqüentemente, lavagens de filtro são realizadas em uma solução contendo SSC a 2X a 50°C e as sondas hibridizadas são detectáveis através de autoradiografia. Outras condições de estringência intermediária que podem ser usadas são bem conhecidas na técnica e conforme citado em Sambrook e outros, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Press, N.Y., pp. 9.47-9.57; e Ausubel e outros, 1989, *Current Protocols em Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. são incorporados aqui em sua totalidade.

Formação de duplex e estabilidade dependem de complementaridade substancial entre os dois filamentos de um híbrido e, conforme acima mencionado, um certo grau de falta de combinação pode ser tolerado. Deste modo, as seqüências de sonda da presente invenção incluem mutações (ambas simples e múltiplas), deleções, inserções das seqüências descritas, e suas combinações, onde as ditas mutações, inserções e deleções permitem formação de híbridos estáveis com o polinucleotídeo alvo de interesse. Mutações, inserções e deleções podem ser produzidas em uma dada seqüência de polinucleotídeo de muitas maneiras, e esses métodos são co-

nhecidos de um versado na técnica. Outros métodos podem se tornar conhecidos no futuro.

Sabe-se também na técnica que enzimas de restrição podem ser usadas para obter fragmentos funcionais das seqüências de DNA objeto. Por exemplo, exonuclease Bal31 pode ser convenientemente usada para digestão de DNA limitada de tempo controlado (geralmente referida como procedimentos "erase-a-base"). Vide, por exemplo, Maniatis e outros, 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova York; Wei e outros, 1983, *J. Biol. Chem.*, 258:13006-13512.

A presente invenção também provê construtos genéticos compreendendo: a) uma seqüência de polinucleotídeo codificando um polipeptídeo compreendendo (ou consistindo em) um polipeptídeo de região variável HA1 conhecido que tem entre cerca de 70% a cerca de 90% de homologia para polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provocação. Construtos genéticos da presente invenção vão também conter elementos reguladores adicionais tal como promotores e aumentadores e, opcionalmente, marcadores selecionáveis.

Também dentro do escopo da presente invenção estão vetores ou cassetes de expressão contendo construtos genéticos conforme aqui revelado e polinucleotídeos codificando os polipeptídeos, mostrados *supra*, operavelmente ligados a elementos reguladores. Os vetores e cassetes de expressão podem conter seqüências de controle transcripcional adicionais também. Os vetores e cassetes de expressão podem compreender ainda marcadores selecionáveis. O cassete de expressão pode conter pelo menos um gene adicional, operavelmente ligado a elementos de controle, a ser co-transformado no organismo. Alternativamente, o(s) gene(s) adicional(ais) e elemento(s) de controle pode(m) ser provido(s) em cassetes de expressão múltiplos. Tais cassetes de expressão são providos com uma pluralidade de sítios de restrição para inserção das seqüências da invenção ser sob a regulação transcripcional das regiões reguladoras. O(s) cassete(s) de expressão pode(m) adicionalmente conter genes marcadores selecionáveis operavelmente ligados a elementos de controle.

O cassete de expressão vai incluir na direção 5'-3' de transcrição, uma região de iniciação transcripcional e traducional, uma seqüência de DNA da invenção e regiões de terminação transcripcional e traducional. A região de iniciação transcripcional, o promotor, podem ser nativos ou análogos, ou estranhos ou heterólogos, para a célula hospedeiro. Adicionalmente, o promotor pode ser a seqüência natural ou alternativamente uma seqüência sintética. Por "estranho" quer dizer a região de iniciação transcripcional não é encontrada na planta nativa na qual a região de iniciação de transcrição é introduzida. Conforme aqui usado, um gene quimérico compreende uma seqüência de codificação operavelmente ligada a uma região de iniciação transcripcional que é heteróloga à seqüência de codificação.

Outro aspecto da invenção provê vetores para clonagem e/ou a expressão de uma seqüência de polinucleotídeo ensinada aqui. Vetores da presente invenção, incluindo vetores de vacina, podem também compreender elementos necessários para permitir expressão e/ou secreção das ditas seqüências de nucleotídeo em uma dada célula hospedeiro. O vetor pode conter um promotor, sinais para iniciação e para terminação da tradução, bem como regiões apropriadas para regulagem de transcrição. Em certas modalidades, os vetores podem ser estavelmente mantidos na célula hospedeiro e podem, opcionalmente, conter seqüências de sinal direcionando a secreção de proteína traduzida. Esses elementos diferentes são escolhidos de acordo com a célula hospedeiro usada. Vetores podem integrar no genoma hospedeiro ou, opcionalmente, ser vetores autonomamente replicantes.

A presente invenção também provê a expressão de um polipeptídeo codificado por uma seqüência de polinucleotídeo revelada aqui compreendendo a cultura de uma célula hospedeiro transformada com um polinucleotídeo da presente invenção sob condições que permitem a expressão do polipeptídeo e, opcionalmente, recuperação do polipeptídeo expresso.

As seqüências de polinucleotídeo reveladas podem ser também reguladas por uma segunda seqüência de ácido nucléico de modo que a proteína ou peptídeo é expresso em um hospedeiro transformado com a mo-

lécula de DNA recombinante. Por exemplo, expressão de uma proteína ou peptídeo pode ser controlada por qualquer elemento promotor/aumentador conhecido na técnica. Promotores que podem ser usados para controlar expressão incluem, mas não estão limitados a, o promotor CMV-IE, a região de 5 promotor precoce SV40 (Bernoist e Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), o promotor contido na repetição terminal de comprimento 3' do vírus sarcoma Rous (Yamamoto e outros, 1980, *Cell*, 22:787-797), promotor de timidina cinase do herpes simplex (Wagner e outros, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:1441-1445), as seqüências reguladoras do gene metalotioneína 10 (Brinster e outros, 1982, *Nature*, 296:39-42); vetores procarióticos contendo promotores tal como o promotor β-lactamase (Villa-Kamaroff e outros, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-3731) ou o promotor *tac* (DeBoer e outros, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25); vide também "Useful proteins from recombinant bacteria" em *Scientific American*, 1980, 242:74- 15 94); vetores de expressão de planta compreendendo a região de promotor de nopalina sintetase (Herrera-Estrella e outros, 1983, *Nature*, 303:209-213) ou o promotor de RNA 35S do vírus mosaico da couve-flor (Gardner e outros, 1981, *Nucl. Acids. Res.*, 9:2871) e o promotor da enzima fotossintética ribulose bifosfato carboxilase (Herrea-Estrella e outros, 1984, *Nature*, 20 310:115-120); elementos promotores de levedura ou fungos tal como o promotor Gal 4, o promotor ADC (álcool desidrogenase), promotor PKG (fosfo-glicerol cinase) e/ou o promotor de fosfatase alcalina.

Os vetores de acordo com a invenção são, por exemplo, vetores de origem de plasmídeo ou viral. Em uma modalidade específica, um vetor é 25 usado que comprehende um promotor operavelmente ligado a uma seqüência de ácido nucléico codificando proteína ou ácido nucléico contido dentro das seqüências de polinucleotídeo reveladas, uma ou mais origens de replicação e, opcionalmente, um ou mais marcadores selecionáveis (por exemplo, um gene de resistência a antibiótico). Vetores de expressão comprehendem seqüências reguladoras que controlam expressão de gene, incluindo expressão de gene em uma célula hospedeiro desejada. Vetores exemplares para a expressão dos polipeptídeos da invenção incluem os vetores de plasmídeo 30

tipo PET (Promega) ou vetores de plasmídeo pBAD (Invitrogen) ou aqueles providos nos exemplos abaixo. Ainda, os vetores de acordo com a invenção são úteis para transformação de células hospedeiras de modo a clonar ou expressar as seqüências de polinucleotídeo da invenção.

5 **Plantas Transgênicas**

Polipeptídeos úteis na produção das composições acima mencionadas ou protocolos de imunização podem ser derivados ou obtidos de uma célula de planta transgênica que foi geneticamente engenheirada para expressar um polipeptídeo compreendendo (ou consistindo em) polipeptídeo de região variável HA1 conhecido que tem entre cerca de 70% a cerca de 90% de homologia com um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provação.

Planta transgênica é aqui definida como uma cultura de célula de planta, cepa de célula de planta, cultura de tecido de célula de planta, 15 planta inferior, briófito, planta monocotiledônea, planta dicotiledônea ou sua progênie derivada de uma célula de planta ou protoplasto transformado, onde o genoma da planta transformada contém DNA estrangeiro, introduzido através de técnicas de laboratório, não originalmente presente em uma célula de planta não-transgênica, nativa, da mesma espécie. Os termos "planta transgênica" e "planta transformada" têm algumas vezes sido usados na técnica como termos sinônimos para definir uma planta cujo DNA contém uma molécula de DNA exógena. Plantas transgênicas e plantas transformantes incluem ainda métodos e plantas cujo genoma não foi estavelmente transformado ou que expressa transientemente um vetor viral recombinante tal 20 como descrito nas Patentes U.S. Números 5.550.360; 5.846.795; 4.885.248; 5.173.410; 5.602.242; 5.627.060; 5.804.439; WO 05/049839; WO 25 03/020938; WO 02/101006; WO 02/101060; WO 02/096192; WO 02/088369; WO 02/08386; WO 02/29068; WO 02/46440; e WO 02/068664.

Construção de cassetes de gene para expressão de antígenos 30 imunoprotetores em plantas é prontamente realizada utilizando métodos bem conhecidos, tal como aqueles descritos em Sambrook e outros (1989); e Ausubel e outros (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley

and Sons, Nova York, NY. A presente invenção também inclui seqüências de DNA tendo homologia de seqüência substancial com as seqüências reveladas codificando antígenos imunoprotetores de modo que eles são capazes de ter o efeito revelado em expressão. Conforme usado no presente pedido,

5 o termo "homologia de seqüência substancial" é usado para indicar que uma seqüência de nucleotídeo (no caso de DNA ou RNA) ou uma seqüência de aminoácido (no caso de uma proteína ou peptídeo) exibe equivalência substancial, funcional ou estrutural com outra seqüência de nucleotídeo ou aminoácido. Quaisquer diferenças funcionais ou estruturais entre seqüências

10 tendo homologia de seqüência substancial serão mínimas; isto é, elas não vão afetar a habilidade da seqüência em funcionar conforme indicado no presente pedido. Seqüências que têm homologia de seqüência substancial com a seqüência revelada aqui são geralmente variantes da seqüência revelada, tal como mutações, mas podem ser também seqüências sintéticas.

15 Na preparação dos construtos da presente invenção, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados, de modo a prover as seqüências de DNA na orientação apropriada e, conforme apropriado, na estrutura de leitura apropriada. Adaptadores ou ligantes podem ser empregados para unir os fragmentos de DNA ou outras manipulações podem estar envolvidas

20 para prover sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de sítios de restrição ou similar.

Ao realizar as várias etapas, clonagem é empregada, de modo a amplificar um vetor contendo o promotor/gene de interesse para introdução subsequente nas células hospedeiro desejadas. Uma ampla variedade de

25 vetores de clonagem está disponível, onde o vetor de clonagem inclui um sistema de replicação funcional em *E. coli* e um marcador que permite seleção das células transformadas. Vectors ilustrativos incluem pBR322, série PUC, pACYC184, série Bluescript (Stratagene), etc. Então, a seqüência pode de ser inserida no vetor em um sítio(s) de restrição apropriado(s), o plasmídeo resultante usado para transformar o hospedeiro *E. coli* (por exemplo, cepas de *E. coli* HB101, JM101 e DH5 $\alpha$ ), a *E. coli* cultivada em um meio nutritivo apropriado e as células colhidas e lisadas e o plasmídeo recuperado.

Análise pode envolver análise de seqüência, análise de restrição, eletroforese ou similar. Após cada manipulação, a seqüência de DNA a ser usada no construto final pode ser restrita e unida à próxima seqüência, onde cada um dos construtos parciais pode ser clonado nos mesmos plasmídeos ou em

5 diferentes.

Vetores estão disponíveis ou podem ser prontamente preparados para transformação de células de planta. Em geral, vetores de plasmídeo ou virais devem conter todas as seqüências de controle de DNA necessárias para ambos manutenção e expressão de uma seqüência de DNA het-

10 teróloga em um dado hospedeiro. Tais seqüências de controle geralmente incluem uma seqüência líder e uma seqüência de DNA codificando códon de sinal de partida tradicional, um códon de terminação de tradução e uma se-  
15 quência de DNA codificando um sinal 3' UTR controlando processamento de RNA mensageiro. Seleção de elementos apropriados para otimizar expres-  
são em muitas espécies particulares é uma questão de habilidade comum na  
técnica utilizando os ensinamentos da descrição. Finalmente, os vetores de-  
vem desejavelmente ter um gene marcador que é capaz de prover uma pro-  
priedade fenotípica que permite a identificação de células hospedeiras con-  
tendo o vetor.

20 A atividade da seqüência de codificação estranha inserida em células de planta é dependente da influência de DNA de planta endógeno adjacente ao inserto. Em geral, a inserção de genes heterólogos parece ser aleatória usando qualquer técnica de transformação; no entanto, tecnologia atualmente existe para produção de plantas com recombinação específica  
25 de sítio de DNA em células de planta (vide WO 91/09957). Qualquer método ou combinação de métodos resultando na expressão da seqüência ou se-  
quências desejadas sob o controle do promotor é aceitável.

A presente invenção não é limitada a nenhum método particular para transformação de células de planta. Tecnologia para introdução de  
30 DNA em células de planta é bem conhecida daqueles versados na técnica. Quatro métodos básicos para aplicação de DNA estranho a células de planta foram descritos. Métodos químicos (Graham e van der Eb, *Virology*,

54(02):536-539, 1973; Zatloukal, Wagner, Cotten, Phillips, Plank, Steinlein; Curiel, Birnstiel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:136-153, 1992); Métodos físicos incluindo microinjeção (Capecchi, *Cell*, 1980, 22(2):479-488), eletroporação (Wong e Neumann, 1982, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 107(2):584-587; Fromm, Taylor, Walbot, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(17):5824-5828; Pat. U.S. Nº 5.384.253) e a pistola de gene (Johnston e Tang, 1994, *Methods Cell. Biol.*, 43(A):353-365; Fynan, Webster, Fuller, Haynes, Santoro, Robinson, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(24):11478-11482); Métodos virais (Clapp, 1993, *Clin. Perinatol.*, 20(1):155-168; Lu, Xiao, Clapp, Li, Broxmeyer, 1993, *J. Exp. Med.*, 178(6):2089-2096; Eglitis e Anderson, 1988, *Biotechniques*, 6(7):608-614; Eglitis, Kantoff, Kohn, Karson, Moen, Lothrop, Blaese, Anderson, 1988, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 241:19-27); e Métodos mediados por receptor (Curiel, Agarwal, Wagner, Cotten, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(19):8850-8854; Curiel, Wagner, Cotten, Birnstiel, Agarwal, Li, Loechel, Hu, 1992, *Hum. Gen. Ther.*, 3(2):147-154; Wagner e outros,, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (13):6099-6103).

A introdução de DNA em células de planta por meio de eletroporação é bem conhecida daqueles versados na técnica. Enzimas de degradação de parede de célula de planta, tal como enzimas de degradação de pectina, são usadas para tornar as células recipientes mais suscetíveis à transformação por eletroporação do que células não-tratadas. Para realizar transformação através de eletroporação uma pessoa pode empregar ou tecidos friáveis tal como uma cultura em suspensão de células ou calos embriogênicos, ou embriões imaturos ou outros tecidos organizados diretamente. É geralmente necessário parcialmente degradar as paredes celulares do material de planta alvo para enzimas de degradação de pectina ou ferimento mecanicamente de uma maneira controlada. Tal material de planta tratado está pronto para receber DNA estranho através de eletroporação.

Outro método para aplicação de DNA transformante estranho a células de planta é através de bombardeamento de micropojétil. Neste método, micropartículas são revestidas com DNA estrangeiro e aplicadas a células através de uma força propelente. Tais micropartículas são tipicamente

feitas de tungstênio, ouro, platina e metais similares. Uma vantagem de bombardeamento por microprojétil é que nem o isolamento de protoplastos (Cristou e outros, 1988, *Plant Physiol.*, 87:671-674) nem a susceptibilidade à infecção com *Agrobacterium* é requerido. Uma modalidade ilustrativa de um

5 método para aplicação de DNA em células de milho através da aceleração é um *Biostatic Particle Delivery System*, que pode ser usado para propelir partículas revestidas com DNA ou células através de uma tela em uma superfície de filtro coberta com células de milho culturadas em suspensão. A tela dispersa as partículas de modo que elas não aplicam ao recipiente células em

10 agregados grandes. Para bombardeamento, células em suspensão são de preferência concentradas em filtros ou meio de cultura sólido. Alternativamente, embriões imaturos ou outras células alvo podem ser dispostos em meio de cultura sólido. As células a serem bombardeadas são posicionadas em uma distância apropriada abaixo da placa de parada de microprojétil. Em

15 transformação de bombardeamento, uma pessoa pode otimizar as condições de cultura de pré-bombardeamento e os parâmetros de bombardeamento para dar os números máximos de transformantes estáveis. Ambos parâmetros físicos e biológicos para bombardeamento são importantes nesta tecnologia. Fatores físicos são aqueles que envolvem manipulação precipitado de DNA/microprojétil ou aqueles que afetam o vôo e velocidade de qualquer um dos microprojetéis. Fatores biológicos incluem todas as etapas envolvidas em manipulação de célula antes e imediatamente após bombardeamento, o ajuste osmótico de células alvo para ajudar a aliviar o trauma associado com bombardeamento e também a natureza do DNA transformante, tal como DNA linearizado ou plasmídeos superenrolados intactos.

Transferência mediada por *Agrobacterium* é um sistema amplamente aplicável para introdução de DNA estranho em células de planta porque o DNA pode ser introduzido em tecidos de planta integral, eliminando a necessidade de regenerar uma planta intacta de um protoplasto. O uso de

30 vetores de integração de planta mediada por *Agrobacterium* para introduzir DNA em células de planta é bem conhecido na técnica. Vide, por exemplo, o método descrito em Fraley e outros, 1985, *Biotechnology*, 3:629; Rogers e

outros, 1987, *Meth. in Enzymol.*, 153:253-277. Ainda, a integração de Ti-DNA é um processo relativamente preciso resultando em alguns rearranjos. A região de DNA a ser transferida é definida pelas seqüências de borda, e DNA de intervenção é geralmente inserido no genoma da planta conforme descrito em Spielman e outros, 1986, *Mol. Gen. Genet.*, 205:34; Jorgensen e outros, 1987, *Mol. Gen. Genet.*, 207:471.

Vetores de transformação de *Agrobacterium* modernos são capazes de replicação em *E. coli* bem como *Agrobacterium*, permitindo manipulações convenientes. Além disso, avanços tecnológicos recentes em vetores para transferência de gene mediada por *Agrobacterium* melhoraram a disposição de genes e sítios de restrição nos vetores para facilitar construção de vetores capazes de expressar várias proteínas ou polipeptídeos. Regiões multiligantes convenientes flanqueadas por um promotor e um sítio de poliadenilação para expressão direta de genes de codificação de polipeptídeo inserido são adequadas para presentes propósitos. Ainda, *Agrobacterium* contendo ambos genes Ti armados e desarmados pode ser usada para as transformações.

Transformação de protoplastos de planta pode ser conseguida usando métodos baseados em precipitação de fosfato de cálcio, tratamento com polietileno glicol, eletroporação e combinações desses tratamentos (vide, por exemplo, Potrykus e outros, 1985, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183; Marcotte e outros, 1988, *Nature*, 335:454). Aplicação desses sistemas a espécies de planta diferentes depende da habilidade em regenerar a espécie particular a partir de protoplastos.

Uma vez as células de planta tendo sido transformadas, selecionadas e checadas quanto à expressão de antígeno, é possível em alguns casos regenerar plantas férteis integrais. Isso vai depender muito da espécie de planta escolhida. Métodos para regeneração de várias espécies de planta foram relatados na literatura e são bem conhecidos do versado na técnica. Para prática da presente invenção, é preferível transformar cepas de célula de planta que podem ser culturadas e melhoradas rapidamente evitando a etapa de regeneração geralmente longa. Ainda, o uso de culturas de célula

de planta evita produção em campo aberto e reduz muito as chances de escape de gene e contaminação de alimento. Culturas de célula de suspensão de tabaco tal como NT-1 e BY-2 (An. G., 1985, *Plant Physiol.*, 79:568-570) são preferidas porque essas cepas são particularmente adequadas para manuseamento em cultura, são prontamente transformadas, produzem eventos estavelmente integrados e são condescendentes à criopreservação.

A cepa de célula de suspensão de tabaco, NT-1, é adequada para a prática da presente invenção. Células NT-1 foram originalmente desenvolvidas de *Nicotiana tabacum* L.cv. amarelo brilhante 2. A cepa de célu-

la NT-1 é amplamente usada e prontamente disponível; embora qualquer cepa de célula de suspensão de tabaco esteja de acordo com a prática da invenção. Células NT-1 adequadas para uso nos exemplos abaixo estão disponíveis da *American Type Culture Collection* sob o número de acesso ATCC Nº 74840. Vide também Patente U.S. Nº 6.140.075, aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

Muitas técnicas e sistemas de cultura de célula de planta variando de frascos agitadores em escala de laboratório a recipientes biorreatores de multimilhares de litros foram descritos e são bem conhecidos na técnica de cultura de célula de planta. Vide, por exemplo, Fischer, R. e outros, 1999,

*Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30, 109-112 e Doran, P., 2000, *Current Opinions in Biotechnology*, 11:199-204. Após as células de planta transformadas terem sido culturadas para a massa desejada, elas são colhidas, gentilmente lavadas e postas em um tampão adequado para rompimento. Muitos tampões diferentes são compatíveis com a presente invenção. Em geral, o tam-

pão é uma solução salina tamponada isotônica aquosa no ou próximo a um valor de pH neutro que não contém detergentes desagradáveis que pode ser usada para solubilizar membranas. Tampões preferidos incluem Solução Salina Tamponada de Fosfato da Dulbecco e PBS contendo EDTA a 1 mM.

Em uma modalidade, células podem ser rompidas através de sonificação. As células lavadas são postas em tampão em uma faixa de cerca de 0,01 g/ml a cerca de 5,0 g/ml, de preferência na faixa de cerca de 0,1 g/ml a cerca de 0,5 g/ml (células em peso líquido lavadas por volume de

tampão). Muitos instrumentos de sonificação comercialmente disponíveis estão de acordo com a invenção e tempos de sonificação variam de a partir de cerca de 5 a cerca de 20 segundos, de preferência cerca de 15 a cerca de 20 segundos. O resultante pode variar em tamanho de alguns mícrons a 5 várias centenas de mícrons e expõe o polipeptídeo de HA1 ou seus fragmentos imunogênicos.

Os termos "compreendendo", "consistindo em" e "consistindo essencialmente em" são definidos de acordo com seu significado padrão. Os termos podem ser substituídos um pelo outro em todo o presente pedido a 10 fim de ligar o significado específico associado com cada termo. O termo "isolado" ou "biologicamente puro" refere-se a material que é substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham o material como é encontrado em seu estado nativo. Então, peptídeos isolados de acordo com a presente invenção de preferência não contêm materiais 15 normalmente associados com peptídeos em seu ambiente *in situ*.

Todas as patentes, pedidos de patente e publicações referidos ou citados aqui são incorporados a título de referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras e tabelas, até o ponto em que eles não forem inconsistentes com os ensinamentos explícitos do presente relatório. Deve ser 20 compreendido que os exemplos e modalidades descritos aqui são para propósitos ilustrativos apenas e que várias modificações ou mudanças à sua luz serão sugeridas a pessoas versadas na técnica e devem ser incluídas no espírito e escopo do presente pedido e no escopo das reivindicações apensas. Em adição, quaisquer elementos ou limitações de qualquer invenção ou 25 modalidade dela descrita aqui podem ser combinados com qualquer um e/ou todos os outros elementos ou limitações (individualmente ou em qualquer combinação) ou qualquer outra invenção ou modalidade dela descrita aqui, e todas tais combinações são compreendidas dentro do escopo da invenção sem limitação a ela.

30 Embora o presente relatório descreva proteção cruzada mais ampla de cepas heterotípicas variáveis de influenza da ave do que vacinas convencionalmente preparadas, a plataforma de vacina feita com planta e

conceitos descritos aqui são aplicáveis para controle de doença causada por outros patógenos com a habilidade em variar seus determinantes antigênicos.

Todas as patentes, pedidos de patente, pedidos provisórios e publicações referidos ou citados aqui são incorporados a título de referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras e tabelas, até que ponto em que eles não forem inconsistentes com os ensinamentos explícitos do presente pedido.

O que segue são exemplos que ilustram procedimentos para prática da invenção. Esses exemplos não devem ser considerados como limitantes. Todas as porcentagens são em peso e todas as proporções de mistura de solvente são em volume a menos que de outro modo indicado.

**EXEMPLO 1 – EFICÁCIA PROTETORA DE H5 PRODUZIDO POR CÉLULA DE PLANTA EM UMA PROVOCAÇÃO HETERÓLOGA EM CAMUNDONGOS**

Para confirmar e compreender mais a habilidade do antígeno H5 do Vírus Influenza da Ave (AIV) produzido por célula de planta para proteger contra uma provocação heteróloga (<90% de homologia), um estudo de vacinação de murino e provocação com AIV foi completado. O gene do antígeno H5 de Cepa Turkey Wisconsin 68 foi otimizado em códon de planta, transformado em células de planta NT-1 e cultivado de acordo substancial com os ensinamentos da Patente US Número 7.132.291, aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

**Lise de Célula**

Células de planta NT-1 transformadas para expressar antígeno H5 foram lisadas em alíquotas de 100 g (usando batedores de conta Biospec® em gelo) em Tris a 200 mM pH 8, EDTA a 5 mM pH 8, ditiotreitol a 2 mM e desoxicolato de Na a 2% (Doc). O lisato foi agitado da noite para o dia a 4°C para auxiliar na extração de H5, então clarificado através de centrifugação seguido por filtragem (0,45 µm) então purificado mais conforme descrito abaixo. Uma porção foi quantificada para H5, liofilizada e armazenada a -20°C.

**Cromatografia Mab**

Antígeno H5 bruto purificado foi preparado a partir de células de

planta NT-1 transformadas como segue. O lisato de célula de planta preparado acima foi diluído 4 para 1 com água Milli-Q®, para reduzir a concentração de Doc para 0,5%. O lisado de célula de planta diluído foi passado em uma coluna de afinidade Mab H5 de 125 ml equilibrada com Tris a 50 mM pH 8. A coluna foi lavada para linha de base com Tris a 50 mM pH 8 e proteína ligada foi eluída com Tris a 50 mM pH 8, NaSCN a 2 M. A proteína H5 eluída foi dialisada contra dois volumes grandes de bicarbonato de amônio 10,5 mM (um tampão volátil) antes da liofilização.

#### Preparação de Antígeno

10 1. Vacina Experimental: Torta de lisato de célula NT-1 transformada liofilizada contendo aproximadamente 129,5 µg de antígeno H5 foi reidratada usando 3,5 ml de água estéril resultando em uma solução de estoque de lisato de célula de planta tendo concentração de 37 µg/ml de solução de estoque de antígeno H5 bruto. A solução de estoque de antígeno H5 bruto foi clarificada 15 através de centrifugação por 20 minutos a 6000 X G, então filtrada estéril através de um filtro de 0,22 micron. Este antígeno H5 bruto estéril foi então guardado para montagem de vacina experimental final.

20 2. Vacina Purificada: Frascos liofilizados de antígeno H5 purificado com cromatografia Mab foram usados para preparar vacina purificada. Cada um dos frascos liofilizados continha 500 µg de antígeno H5. Cada frasco foi reidratado com 5 ml de água estéril para dar uma concentração final de 100 µg/ml. Este material não requereu clarificação ou filtragem estéril e foi então guardado para montagem de vacina purificada final.

25 3. Controle Vazio de NT-1: Controle vazio de NT-1 foi preparado usando o mesmo procedimento que usado para vacina experimental (1) acima exceto que células de planta NT-1 não-transformadas foram usadas ao invés de células de NT-1 transformadas expressando antígeno H5.

#### Formulação

30 Cada uma das vacinas finais foi montada para uma concentração de H5 final de 26,7 ng/ml usando o procedimento que segue. Antígeno de vacina experimental, antígeno de vacina purificada ou lisato de controle vazio de NT-1 foi adicionado a um tubo de centrífuga de fundo cônico de 50

ml estéril. A quantidade requerida de solução de estoque Quil A filtrada estéril (50 mg/ml em água estéril, Brenntag, DK) foi adicionada ao tubo para uma concentração final de 40 ug/dose e misturada por um minuto usando um homogeneizador do tipo rotor estator esterilizado. A quantidade requerida de 5 solução estoque de colesterol (18 mg/ml em EtOH) foi adicionada ao tubo para uma concentração final de 10 ug/dose e misturada por um minuto usando um homogeneizador do tipo rotor estator estéril. O volume requerido de uma mistura previamente preparada e autoclavada de lecitina e polímero acrílico (3:2 de lecitina:carbopol) foi adicionado para uma concentração final 10 de 1 mg/dose e homogeneizado por um minuto. A quantidade requerida de água estéril foi adicionada ao tubo e misturada.

A vacina montada foi então assepticamente transferida para frascos de soro esterilizados, vedada e rotulada. Os frascos de vacinas montadas foram armazenados a 4°C até que eles fossem transportados conforme necessário para o sítio de teste clínico.  
15

#### Vacinação

Sessenta e cinco camundongos BALB (fêmeas; 5-6 semanas de vida) foram designados a Grupo de Tratamento 1, Grupo de Tratamento 2, Grupo de Tratamento 3 ou Grupo de Tratamento 4 conforme descrito na Tabela 1. Nos Dias de Estudo 0, 14 e 21, os camundongos foram vacinados com uma dose de 150 ul do tratamento prescrito conforme descrito na Tabela 1. Vacinações foram administradas subcutaneamente. Camundongos no Grupo 4 não foram vacinados.  
20

#### Análise Pós-vacinação

No dia 35, todos os camundongos foram mudados para uma instalação ABSL3 e aclimatados à nova instalação por 1 semana. No Dia 42, camundongos de cada Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3 foram aleatoriamente selecionados e exsanguinados sob sedação. Sangue foi processado em soro e armazenado a  $\geq -20^{\circ}\text{C}$  para análise sorológica. Adicionalmente, no Dia 30 42, os 15 camundongos restantes de cada Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3 foram provocados com 50 uL de aproximadamente  $1,5 \times 10^3$  de Vírus Influenza da Ave TCID<sub>50</sub> A/Vietnam/1203/04. Os 5 camundongos no Grupo 4 foram

provocados falsamente com Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS). Todas as mudanças foram realizadas sob anestesia com Cetamina.

No Dia de Estudo 45, 5 animais do Grupo 1, 5 animais do Grupo 2, 5 animais do Grupo 3 e todos os camundongos do Grupo 4 (5 camundongos) foram sacrificados e os pulmões e cérebros foram removidos. Pulmões e cérebros foram homogeneizados e testados quanto a vírus viável através da quantificação de TCID<sub>50</sub>.

Os 10 camundongos restantes no Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3 foram monitorados quanto a sinais clínicos de doença até o final do Dia de Estudo 56.

#### Ensaios Sorológicos

Inibição de hemaglutinina contra Cepa Turkey Wisconsin 68 de AIV e neutralização de soro contra A/Vietnam/1203/04 foram realizadas no sangue coletado de camundongos nos Grupos 1 e 2 no Dia de Estudo 42.

#### 15 Ensaio de Inibição de Hemaglutinina

Ensaio sorológico de Inibição de Hemaglutinina (HAI) foi realizado em amostras de soro coletadas no Dia 42 contra Cepa Turkey Wisconsin 68 de AIV inativada preparada em fluido alantóico. O vírus inativado foi diluído para dar entre 8 a 16 unidades de hemaglutinina (HA) por 50 ul. As amostras de soro foram serialmente diluídas duas vezes em PBS. Às amostras de soro diluídas foi adicionado um volume igual de vírus diluído. A mistura de soro-vírus foi incubada em temperatura ambiente por 60 minutos. Uma solução a 1% de células de sangue vermelhas de galinha (cRBC) foi então adicionada à mistura de soro-vírus e incubada a 2-7°C por 24 horas. As placas foram então visualmente inspecionadas quanto à hemaglutinina (resultado positivo) ou cRBC em pélete (resultado negativo). O título de HAI representa a diluição inversa dos soros que é capaz de inibir a habilidade do vírus em causar hemaglutinação da cRBC.

#### Ensaio de Neutralização de Soro

Os ensaios de neutralização de soro foram realizados em um laboratório ABSL-3. Títulos de dose de neutralização 50 (ND<sub>50</sub>) foram determinados para amostras de soro como segue. Diluições seriais duas vezes

de cada amostra foram preparadas usando Meio Essencial Mínimo da Eagle (EMEM). Vírus Influenza da Ave (Vietnam/1203/04) foi adicionado às amostras de soro diluídas e esta mistura foi incubada a 37°C por uma hora. Placas de noventa e seis cavidades que eram pelo menos 90% confluentes com 5 células MDCK foram então enxaguadas com Solução Salina Equilibrada de Hank (HBSS) e as cavidades inoculadas em quintuplicata com 100 µl de cada diluição de soro-vírus. As placas foram então incubadas em aproximadamente 37°C e CO<sub>2</sub> a 5% em uma incubadora umidificada por 96 ± 6 horas. As placas foram graduadas quanto a efeitos citológicos (CPE) com o auxílio 10 de um microscópio. A diluição ND<sub>50</sub> foi relatada com a diluição que resulta na ausência de CPE em 50% das cavidades inoculadas e foi calculada usando o método Spearman Kärber.

#### Titulação de Vírus Viável de Pulmão e Cérebro

O cérebro e pulmões de 5 camundongos em cada Grupo 1, 2 e 3 15 foram removidos e homogeneizados em CMF-PBS. Os homogenatos foram separados em alíquota para tubos de centrífuga e armazenados a ≤ -70°C. Amostras de homogenato de cérebro e pulmão foram testadas quanto a vírus viável usando TCID<sub>50s</sub>. Pulmões e cérebro foram removidos e congelados intactos a ≤-70°C em 1 ml de solução salina tamponada com fosfato 20 (PBS) preparada com antibiótico a 1% (Penicilina e Estreptomicina). Após descongelamento, os pulmões e cérebro foram homogeneizados e as amostras foram testadas quanto a vírus viável através de dose infecciosa de cultura de tecido 50 (TCID<sub>50s</sub>). Resumidamente, diluições seriais de 50 vezes de cada amostra foram preparadas usando EMEM. Uma série de diluição foi 25 também preparada para uma amostra controle positiva (PC, uma amostra positiva com um título TCID<sub>50</sub> conhecido) e uma amostra controle negativa (NC, conhecida ser sem vírus). Placas de noventa e seis cavidades que eram pelo menos 90% confluentes com células MDCK foram então enxaguadas com Solução Salina Equilibrada de Hank (HBSS) e as cavidades inoculadas em quintuplicata com 100 ml de cada diluição de amostra. Uma série de pelo menos 5 cavidades de controle de cultura celular (CC) foi então inoculada com 100 ml de EMEM. Séries de diluição para as amostras PC e NC 30

foram então inoculadas em quintuplicata em placas de 96 cavidades separadas. Ambas placas de controle positivo e negativo incluíam um mínimo de 5 cavidades CC cada. As placas foram então incubadas em aproximadamente 37°C e CO<sub>2</sub> a 5% em uma incubadora umidificada por 96 ± 6 horas. As placas foram graduadas quanto a efeitos citopatológicos (CPE) por um técnico com o auxílio de um microscópio. A fim de que o ensaio seja considerado válido não poderia haver nenhuma contaminação e pelo menos 5 cavidades CC em cada placa precisavam ser monocamadas confluentes saudáveis (>80%). A TCID<sub>50</sub> era a diluição que resultou em CPE em 50% das cavidades inoculadas e foi calculada usando o método Spearman Kärber.

### Resultados

Cinco camundongos de cada Grupo 1, Grupo 2 e Grupo tiveram sangue tirado para teste sorológico. Os resultados sorológicos (Inibição de Hemaglutinina e Neutralização de Soro) são apresentados na Tabela 2. Todos os cinco camundongos do Grupo 1 (Vacina experimental) desenvolveram anticorpos contra Turkey Wisconsin 68 (homólogos ao antígeno H5 na vacina) conforme evidenciado por Sorologia de Inibição de Hemaglutinação (HAI). O Título Médio Geométrico (GMT) do Grupo 1 era 388. Três dos cinco camundongos do Grupo 2 (Vacina purificada) desenvolveram títulos HAI. O GMT do Grupo 2 foi 60,7.

Nenhum dos cinco camundongos do Grupo 3 (controle vazio de NT-1) desenvolveu anticorpos HAI para Turkey Wisconsin 68. Três dos cinco camundongos do Grupo 1 (Vacina experimental) desenvolveram anticorpo contra Vietnam/1203/04 (heterólogo para a HA na vacina) conforme evidenciado através de Sorologia de Neutralização de Soro (SN). O Título Médio Geométrico (GMT) do Grupo 1 foi 34,0. Um dos cinco camundongos do Grupo 2 desenvolveu um título SN (GMT=3,1) e nenhum dos camundongos do Grupo 3 desenvolveu anticorpos SN para Vietnam/1203/04.

Vírus influenza da ave viável foi isolado dos pulmões e cérebros de 5 camundongos de cada Grupo 1, 2, 3 e 4 no Dia de Estudo 45 (3 dias pós-provação). Todos os cinco camundongos no Grupo 4 foram sacrificados conforme acima discutido e então não são representados na Tabela 4.

Resultados de isolamento de vírus são apresentados na Tabela 3. Em todos os quatro grupos, nenhum vírus viável poderia ser isolado do tecido cerebral. No Grupo 1 (Vacina experimental), 1 dos 5 camundongos tinha tecido pulmonar estéril (nenhum vírus poderia ser isolado). O GMT do vírus viável do pulmão do camundongo do Grupo 1 foi  $3,31 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL. No camundongo do Grupo 2 (Vacina purificada), vírus viável poderia ser isolado de 5 dos 5 camundongos. O GMT do vírus viável dos pulmões dos camundongos do Grupo 2 foi  $2,19 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml. Camundongos no Grupo 3 (controle vazio de NT-1) tinham mais de 1 log de vírus influenza da ave viável superior em tecido de pulmão aos camundongos do Grupo 1. No Grupo 3, cinco de cinco camundongos tinham isolamentos positivos e o GMT do grupo foi  $8,72 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml. Os camundongos no Grupo 4 (não-vacinados e provocados com PBS apenas) não tinham nenhum isolamento de vírus de tecidos de pulmão.

Os camundongos em cada Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3 foram clinicamente monitorados do dia da provação (Dia 42) até duas semanas pós-provação (Dia 56). A Tabela 4 provê o Dia de Morte Pós-Provação para o Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3. Por volta do final da fase em vida do estudo (Dia de Estudo 56; 14 dias pós-provação), 100% dos camundongos no Grupo 1 (Vacina experimental) tinham sobrevivido à provação. No Grupo 2 (Vacina Purificada) 10% dos camundongos sobreviveram à provação. No Grupo 3 (Controle vazio) 100% dos camundongos sucumbiram à provação.

TABELA 1: Grupos de tratamento para vacinação de murino e estudo de eficácia de provação

Gru- po	Tratamento	Nº de Camun- dongos	Dose	Provação
1	Vacina Experimental	20	150ul SC, 3 doses	Sim
2	Vacina Purificada	20	150ul SC, 3 doses	Sim
3	Controle Vazio de NT-1	20	150ul SC, 3 doses	Sim
4	Controle Não-vacinado	5	NA	Não Falsa provação

TABELA 2: Títulos de Inibição de Hemaglutinação (HAI) e Títulos de Neutralização de Soro (SN) (Dia de Estudo 42)

Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3		
Camun-dongo	HAI*	SN**	Camun-dongo	HAI*	SN**	Camun-dongo	HAI*	SN**
7	512	0	1	<8	0	1	<8	0
10	256	459	3	64	0	5	<8	0
11	256	0	9	256	294	8	<8	0
13	512	283	19	1024	0	14	<8	0
15	512	348	20	<8	0	17	<8	0
GMT	388	34,0	GMT	60,7	3,1	GMT	<8	0
STD	140,2	208,2	STD	433	131	STD	0	0

3 \*para cálculos de GMT de HAI <8 foi expressos como 7

4 \*\* para cálculos de GMT de SN 0 foi expresso como 1

TABELA 3: Isolamento de Vírus Viável de Tecido Pulmonar (TCID<sub>50</sub>)

Camun-dongo	Pulmão	Camun-dongo	Pulmão	Camun-dongo	Pulmão	Camun-dongo	Pulmão
1	$7,93 \times 10^3$	5	$3,16 \times 10^4$	3	$2,0 \times 10^5$	1	0
6	$2,0 \times 10^4$	6	$5,01 \times 10^4$	7	$1,26 \times 10^5$	2	0
14	0	7	$5,01 \times 10^4$	10	$7,94 \times 10^4$	3	0
18	$7,94 \times 10^4$	11	$3,16 \times 10^4$	12	$1,26 \times 10^5$	4	0
19	$3,16 \times 10^4$	14	$2,0 \times 10^4$	18	$2,0 \times 10^4$	5	0
GMT	$3,31 \times 10^3$	GMT	$2,19 \times 10^4$	GMT	$8,72 \times 10^4$	GMT	0
STD	$3,12 \times 10^4$	STD	$2,01 \times 10^4$	STD	$6,64 \times 10^4$	STD	0

TABELA 4: Tabela de Mortalidade – Dia de Morte Pós-provocação

Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
Camun-dongo	Dia da Morte	Camundongo	Dia da Morte	Camun-dongo	Dia da Morte
2	Sobreviveram	2	8	2	8
3	Sobreviveram	4	7	4	7
4	Sobreviveram	8	8	6	7
5	Sobreviveram	10	9	9	8
8	Sobreviveram	12	7	11	9
9	Sobreviveram	13	7	13	9
12	Sobreviveram	15	6	15	9
16	Sobreviveram	16	Sobreviveram	16	7
17	Sobreviveram	17	7	19	8
20	Sobreviveram	18	7	20	8

Deve ser compreendido que os exemplos e modalidades descritos aqui são para propósitos ilustrativos apenas e que várias modificações ou mudanças à sua luz serão sugeridas à pessoa versada na técnica e devem ser incluídas dentro do espírito e escopo do presente pedido e no escopo das reivindicações apenas. Ainda, quaisquer elementos ou limitações de qualquer invenção ou modalidade dela aqui revelada podem ser combinados com qualquer e/ou todos os outros elementos ou limitações (individualmente ou em qualquer combinação) ou qualquer outra invenção ou modalidade de la aqui descrita, e todas tais combinações são contempladas com o escopo da invenção sem limitação a ela.

Listagem de Seqüência

&lt;110&gt; Dow AgroSciences LLC

Webb, Steven Robert

Henry, Matthew

&lt;120&gt; Vacina para Influenza da Ave e Métodos de Uso

&lt;130&gt; DAS-132XC1

&lt;150&gt; US 60/793,804

&lt;151&gt; 2006-04-21

&lt;160&gt; 12

&lt;170&gt; versão de Patente 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 548

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Vírus Influenza da Ave

&lt;400&gt; 1

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys

Gln Val

1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln

Asp Ile

20 25 30

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly

Val Arg

35 40 45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu  
Gly Asn

50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr  
Ile Val

65 70 75 80

Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp  
Phe Asn

85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His  
Phe Glu

100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp  
Ala Ser

115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser  
Phe Phe

130 135 140

Arg Ser Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Val Tyr Pro  
Thr Ile

145 150 155 160

Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile  
Leu Trp

165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu  
Tyr Gln

180 185 190

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn  
Gln Arg

195 200 205

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln  
Ser Gly

210 215 220

Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala  
Ile Ser

225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr  
Lys Ile

245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu  
Tyr Gly

260 265 270

Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn  
Ser Ser

275 280 285

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys  
Pro Lys

290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg  
Asn Val

305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly  
Phe Ile

325 330 335

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr  
His His

340 345 350

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser  
Thr Gln

355 360 365

Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile  
Asp Lys

370 375 380

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn  
Leu Glu

385 390 395 400

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe  
Leu Asp

405 410 415

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn  
Glu Arg

420 425 430

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp  
Lys Val

435 440 445

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly  
Cys Leu

450 455 460

Glu Phe Ser His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val  
Arg Asn

465 470 475 480

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu  
Asn Arg

485 490 495

Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr  
Gln Ile

500 505 510

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala  
Ile Met

515 520 525

Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu  
Gln Cys

530 535 540

Arg Ile Cys Ile

545

<211> 16

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 2

Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val

Lys Gly

1 5 10 15

<210> 3

<211> 326

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 3

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Lys

Gln Val

1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln

Asp Ile

20 25 30

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly

Val Arg

35 40 45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu

Gly Asn

50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr  
Ile Val  
65 70 75 80  
Glu Lys Asp Asn Pro Thr Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp  
Phe Asn  
85 90 95  
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys Tyr Leu Met Ser Asn Thr Asn His  
Phe Glu  
100 105 110  
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Asn Ser Trp Ser Asn His Asp  
Ala Ser  
115 120 125  
Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser  
Phe Phe  
130 135 140  
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Ala Tyr Pro  
Thr Ile  
145 150 155 160  
Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile  
Leu Trp  
165 170 175  
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Glu Leu  
Tyr Gln  
180 185 190

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn  
Gln Arg

195 200 205

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln  
Ser Gly

210 215 220

Arg Ile Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala  
Ile Ser

225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr  
Lys Ile

245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Arg Ser Glu Leu Glu  
Tyr Gly

260 265 270

Asn Cys Asp Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn  
Ser Ser

275 280 285

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys  
Pro Lys

290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg  
Asn Val

305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Thr Arg

<210> 4

<211> 184

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 4

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp  
Gln Gly

1 5 10 15

Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln  
Gly Ser

20 25 30

Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp  
Gly Ile

35 40 45

Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln  
Phe Glu

50 55 60

Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu  
Asn Leu

65 70 75 80

Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr  
Asn Ala

85 90 95

Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe  
His Asp

100 105 110

Ser Tyr Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu  
Arg Asp

115 120 125

Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His  
Lys Cys

130 135 140

Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp  
Tyr Pro

145 150 155 160

Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu Asn Arg Glu Glu Ile Asp  
Gly Val

165 170 175

Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr

180

<210> 5

<211> 28

<212> PRT

<213> Virus Influenza da Ave

<400> 5

Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala  
Leu Ala

1 5 10 15

Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser

20 25

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 6

Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile

1 5 10

<210> 7

<211> 564

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 7

Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val  
Lys Gly

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 Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly  
Val Arg

50 55 60

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu  
Gly Asn

65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr  
Ile Val

85 90 95

Glu Lys Asp Asn Pro Val Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp  
Phe Asn

100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Met Ser Ser Thr Asn His  
Phe Glu

115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Ser Ser Trp Ser Asn His Asp  
Ala Ser

130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser  
Phe Phe

145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro  
Thr Ile

165 170 175

Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile  
Leu Trp

180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Thr Glu Gln Thr Lys Leu  
Tyr Gln

195 200 205

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn  
Gln Arg

210 215 220

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln  
Ser Gly

225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala  
Ile Ser

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 Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu  
Tyr Gly

275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn  
Ser Ser

290 295 300

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys  
Pro Lys

305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg  
Asn Val

325 330 335

Pro Gln Arg Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly  
Phe Ile

340 345 350

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr  
His His

355 360 365

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser  
Thr Gln

370 375 380

Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile  
Asp Lys

385 390 395 400

Met Asn Thr Gln Phe Glu Val Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn  
Leu Glu

405 410 415

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe  
Leu Asp

420 425 430

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn  
Glu Arg

435 440 445

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Arg Asn Leu Tyr Asp  
Lys Val

450 455 460

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly  
Cys Phe

465 470 475 480

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val  
Arg Asn

485 490 495

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ser Arg Leu  
Asn Arg

500 505 510

Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Thr Tyr  
Gln Ile

515 520 525

Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala  
Ile Met

530 535 540

Val Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu  
Gln Cys

545            550            555            560

Arg Ile Cys Ile  
<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 8

Met Glu Arg Ile Val Ile Ala Leu Ala Ile Ile Ser Val Val  
Lys Gly

1            5            10            15  
<210> 9

<211> 326

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 9

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu  
Gln Val

1            5            10            15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln  
Asp Ile

20            25            30

Leu Glu Lys Glu His Asn Gly Lys Leu Cys Ser Leu Lys Gly  
Val Arg

35 40 45

Pro Leu Ile Leu Lys Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu  
Gly Asn

50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr  
Ile Val

65 70 75 80

Glu Lys Asp Asn Pro Val Asn Gly Leu Cys Tyr Pro Gly Asp  
Phe Asn

85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Met Ser Ser Thr Asn His  
Phe Glu

100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Arg Ser Ser Trp Ser Asn His Asp  
Ala Ser

115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly Arg Ser Ser  
Phe Phe

130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Ala Tyr Pro  
Thr Ile

145 150 155 160

Lys Arg Thr Tyr Asn Asn Thr Asn Val Glu Asp Leu Leu Ile  
Leu Trp

165 170 175

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Thr Glu Gln Thr Lys Leu  
Tyr Gln

180 185 190

Asn Ser Asn Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn  
Gln Arg

195 200 205

Ser Ile Pro Glu Ile Ala Thr Arg Pro Lys Val Asn Gly Gln  
Ser Gly

210 215 220

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Arg Pro Asn Asp Ala  
Ile Ser

225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr  
Lys Ile

245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu  
Tyr Gly

260 265 270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Val Gly Ala Ile Asn  
Ser Ser

275 280 285

Met Pro Phe His Asn Val His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys  
Pro Lys

290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asp Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg  
Asn Val

305 310 315 320

Pro Gln Arg Glu Thr Arg

325  
<210> 10

<211> 157

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 10

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp  
Gln Gly

1 5 10 15

Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln  
Gly Ser

20 25 30

Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp  
Gly Ile

35 40 45

Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln  
Phe Glu

50 55 60

Val Val Gly Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu  
Asn Leu

65 70 75 80

Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr  
Asn Ala

85 90 95

Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe  
His Asp

100 105 110

Ser Asn Val Arg Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu  
Arg Asp

115 120 125

Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His  
Lys Cys

130 135 140

Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr

145 150 155  
<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 11

Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala  
Leu Ala

1 5 10 15

Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Phe

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Vírus Influenza da Ave

<400> 12

Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile

1

5

10

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de indução de uma resposta imunoprotetora contra uma cepa de Vírus Influenza da Ave (AIV) em um animal ou ser humano que compreende:

5           a) expressão em uma célula de planta de uma seqüência de DNA compreendendo polipeptídeo de região variável HA1 conhecido que tem entre cerca de 70% a cerca de 90% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 da cepa de provação;

             b) preparação de uma composição de vacina usando o polipe-

10          tídeo de região variável HA1 conhecido expresso na dita célula de planta, e;

             c) administração da dita composição de vacina a um animal ou humano de modo que uma resposta imunoprotetora é induzida no dito animal ou ser humano.

2. Método para preparação de uma vacina de AIV feita de planta

15          que compreende:

             a) transformação de uma célula de planta com um vetor recombinante compreendendo um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de região variável HA1 conhecido que tem entre cerca de 70% a cerca de 90% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 de provação;

20          b) cultura da dita célula de planta sob condições adequadas para aexpressão do dito polipeptídeo conhecido;

             c) recuperação do dito polipeptídeo conhecido; e

             d) mistura do dito polipeptídeo conhecido com excipientes farmaceuticamente aceitáveis e diluentes para eles.

25          3. Vacina para AIV feita de planta compreendendo um polipeptídeo de região variável de hemaglutinina 1 (HA1) conhecido que tem entre cerca de 70% a cerca de 90% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provação que quando da administração da dita vacina feita de planta a um animal ou ser humano elicitá uma resposta imune protetora no dito animal ou ser humano contra a dita cepa de provação 70% a cerca de 90% homóloga.

30          4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o dito

- polipeptídeo de região variável HA1 conhecido tem pelo menos 70% e menos do que 87,0%, 86,5%, 86,0%, 85,5% 85,0%, 84,5%, 84,0%, 83,5%, 83,0%, 82,5%, 82,0%, 81,5%, 81,0%, 80,5%, 80,0%, 79,5%, 79,0%, 78,5%, 78,0%, 77,5%, 77,0%, 76,5%, 76,0%, 75,5%, 75,0%, 74,5%, 74,0%, 73,5%, 5 73,0%, 72,5%, 72,0%, 71,5% ou 71,0% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provação.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o dito polipeptídeo de região variável HA1 conhecido tem entre cerca de 70% e cerca de 71,0%, 71,5%, 72,0%, 72,5%, 73,0%, 73,5%, 74,0%, 10 74,5%, 75,0%, 75,5%, 76,0%, 76,5%, 77,0%, 77,5%, 78,0%, 78,5%, 79,0%, 79,5%, 80,0%, 80,5%, 81,0%, 81,5%, 82,0%, 82,5%, 83,0%, 83,5%, 84,0%, 84,5%, 85,0%, 85,5%, 86,0%, 86,5% ou 87,0% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provação.

6. Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, 15 em que o dito polipeptídeo de região variável de HA1 conhecido tem entre 70% e 71,0%, 71,5%, 72,0%, 72,5%, 73,0%, 73,5%, 74,0%, 74,5%, 75,0%, 75,5%, 76,0%, 76,5%, 77,0%, 77,5%, 78,0%, 78,5%, 79,0%, 79,5%, 80,0%, 80,5%, 81,0%, 81,5%, 82,0%, 82,5%, 83,0%, 83,5%, 84,0%, 84,5%, 85,0%, 85,5%, 86,0%, 86,5% ou 87,0% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provação.

7. Vacina de AIV feita de planta de acordo com a reivindicação 3, em que o dito polipeptídeo de região variável HA1 conhecido tem pelo menos 70% e menos do que 87,0%, 86,5%, 86,0%, 85,5% 85,0%, 84,5%, 84,0%, 83,5%, 83,0%, 82,5%, 82,0%, 81,5%, 81,0%, 80,5%, 80,0%, 79,5%, 25 79,0%, 78,5%, 78,0%, 77,5%, 77,0%, 76,5%, 76,0%, 75,5%, 75,0%, 74,5%, 74,0%, 73,5%, 73,0%, 72,5%, 72,0%, 71,5% ou 71,0% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provação.

8. Vacina de AIV feita de planta de acordo com a reivindicação 3, em que o dito polipeptídeo de região variável HA1 conhecido tem entre 30 cerca de 70% e cerca de 71,0%, 71,5%, 72,0%, 72,5%, 73,0%, 73,5%, 74,0%, 74,5%, 75,0%, 75,5%, 76,0%, 76,5%, 77,0%, 77,5%, 78,0%, 78,5%, 79,0%, 79,5%, 80,0%, 80,5%, 81,0%, 81,5%, 82,0%, 82,5%, 83,0%, 83,5%,

84,0%, 84,5%, 85,0%, 85,5%, 86,0%, 86,5% ou 87,0% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provação.

9. Vacina de AIV feita de planta de acordo com a reivindicação 3, em que o dito polipeptídeo de região variável HA1 conhecido tem entre 5 70% e 71,0%, 71,5%, 72,0%, 72,5%, 73,0%, 73,5%, 74,0%, 74,5%, 75,0%, 75,5%, 76,0%, 76,5%, 77,0%, 77,5%, 78,0%, 78,5%, 79,0%, 79,5%, 80,0%, 80,5%, 81,0%, 81,5%, 82,0%, 82,5%, 83,0%, 83,5%, 84,0%, 84,5%, 85,0%, 85,5%, 86,0%, 86,5% ou 87,0% de homologia para um polipeptídeo de região variável HA1 de cepa de provação.

## **RESUMO**

**Patente de Invenção: "VACINA PARA INFLUENZA DA AVE E MÉTODOS DE USO".**

A presente invenção refere-se a vacinas para influenza e particularmente vacinas para influenza da ave (AIV). A invenção inclui métodos para preparação de células de planta transgênica para expressar polipeptídeos de HA1 conhecidos tendo homologias especificadas que são usados para preparar composições de vacina e métodos para indução de imunidade protetora em um indivíduo, animal, mamífero ou ser humano.