

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1999.11.28**

(30) Prioridade(s): **1998.11.30 IL 12733198**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.07.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.05.09**
154/2012

(73) Titular(es):

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LIMITED**

**THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95 76100 REHOVOT**

IL

(72) Inventor(es):

RUTH ARNON

TAMAR BEN-YEDIDIA

RAPHAEL LEVI

IL

IL

IL

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **VACINA CONTRA A GRIPE HUMANA CONTENDO QUATRO PÉPTIDOS DE INFLUENZA**

(57) Resumo:

UMA VACINA DA INFLUENZA BASEADA EM PÉPTIDOS SINTÉTICOS HUMANOS PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL COMPREENDE UMA MISTURA DE FLAGELOS CONTENDO, PELO MENOS, QUATRO EPITOPOS DO VÍRUS INFLUENZA REACTIVOS COM CÉLULAS HUMANAS, CADA UMA EXPRESSA INDIVIDUALMENTE NA FLAGELINA DE SALMONELLA, SENDO OS REFERIDOS EPITOPOS DO VÍRUS INFLUENZA SELECIONADOS DO GRUPO CONSISTINDO DE: (I) UM EPITOPO DE HEMAGLUTININA (HA) DAS CÉLULAS B; (II) UM EPITOPO DE HEMAGLUTININA (HA) DAS CÉLULAS T AUXILIARES OU NA NUCLEOPROTEÍNA (NP) QUE SE PODE LIGAR A MUITAS MOLÉCULAS DE HLA; E (III) PELO MENOS DOIS EPITOPOS DE NUCLEOPROTEÍNA (NP) DE LINFÓCITOS CITOTÓXICOS (CTL) OU PROTEÍNA DE MATRIZ (M) QUE SÃO RESTRITOS PARA A MAIORIA DAS MOLÉCULAS DE HLA PREVALENTES EM DIFERENTES POPULAÇÕES HUMANAS.

RESUMO

"VACINA CONTRA A GRIPE HUMANA CONTENDO QUATRO PÉPTIDOS DE INFLUENZA"

Uma vacina da influenza baseada em péptidos sintéticos humanos para administração intranasal compreende uma mistura de flagelos contendo, pelo menos, quatro epitopos do vírus influenza reactivos com células humanas, cada uma expressa individualmente na flagelina de *Salmonella*, sendo os referidos epitopos do vírus influenza seleccionados do grupo consistindo de: (i) um epitopo de hemaglutinina (HA) das células B; (ii) um epitopo de hemaglutinina (HA) das células T auxiliares ou na nucleoproteína (NP) que se pode ligar a muitas moléculas de HLA; e (iii) pelo menos dois epitopos de nucleoproteína (NP) de linfócitos citotóxicos (CTL) ou proteína de matriz (M) que são restritos para a maioria das moléculas de HLA prevalentes em diferentes populações humanas.

DESCRIÇÃO

"VACINA CONTRA A GRIPE HUMANA CONTENDO QUATRO PÉPTIDOS DE INFLUENZA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a vacinas de influenza e, particularmente, a vacinas baseadas em péptidos compreendendo epitopos conservados de ambos os linfócitos B e T, reconhecidos pelos HLA prevalentes em humanos.

ABREVIATURAS: **Ab:** Anticorpos; **CTL:** Linfócitos T citotóxicos; **EID:** Dose de infecção no ovo; **HA:** Hemaglutinina; **HAU:** Unidade de Hemaglutinação; **i.n.:** intranasal; **i.p.:** intraperitoneal; **NP:** Nucleoproteína; **PMBC:** Células mononucleares do sangue periférico; **TT:** Toxóide Tetânico.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A Influnza é um problema de saúde pública e resulta em custos económicos, morbidade e até mesmo mortalidade. A infecção por Influenza pode resultar em vários estados de doença, que vão desde infecção sub-clínica, passando por uma infecção respiratória das vias superiores moderada e traqueobronquite, até uma pneumonia viral grave ocasionalmente letal. As razões para este amplo espectro de gravidade são explicadas pelo local da infecção e o estado do sistema imunitário do hospedeiro. A

característica mais importante da influenza, do ponto de vista imunológico, são as alterações rápidas e imprevisíveis das glicoproteínas de superfície, hemaglutinina e neuraminidase, referidas como desvios e mudanças antigénicas. Estas alterações conduzem, eventualmente, à emergência de novas estirpes de influenza, que permitem que o vírus escape do sistema imunitário e que não a causa das epidemias quase anuais (Laver *et al.*, 1980 e 1980a; Webster, 1982).

A imunização contra o vírus influenza está limitada por esta variação antigénica acentuada do vírus e pela restrição da infecção às membranas da mucosa respiratória. As vacinas de influenza actualmente disponíveis e com licença, baseiam-se no vírus total inactivo ou nas glicoproteínas de superfície viral. Estas vacinas de influenza falharam na indução de imunidade completa, de longo termo e de estirpe cruzada.

O vírus influenza compreende dois antigénios de superfície: neuraminidase (NA) e hemaglutinina (HA), que sofrem alterações graduais (desvios e mudanças), conduzindo às variações antigénicas elevadas na gripe. A HA é um imunogénio forte e é o antigénio mais significativo na definição da especificidade serológica das diferentes estirpes de vírus. A molécula de HA (75-80 kD) compreende uma pluralidade de determinantes antigénicos, entre os quais vários estão em regiões que sofrem alterações em diferentes estirpes (determinantes específicos de estirpe) e outros em regiões que são comuns a muitas moléculas de HA (determinantes comuns).

O documento US 4474757 descreve uma vacina sintética contra uma pluralidade de vírus de influenza diferentes, compreendendo um veículo macromolecular adequado com um péptido ligado a ele,

sendo um fragmento antigénico de HA que é comum a várias estirpes de vírus influenza diferentes. Um dos determinantes comuns descritos é o epitopo 91-108 de HA que é conservado nas três estirpes do subtipo H3 de influenza.

A nucleoproteína (NP) está localizada no núcleo viral e é um dos antígenos específicos do grupo que distingue entre os vírus Influenza A, B e C. Ao contrário de HA, a NP é uma das proteínas virais mais conservadas, sendo 94% conservada em todos os vírus Influenza A. O anticorpo específico de NP do vírus Influenza A não tem actividade neutralizadora de vírus, mas a NP é um alvo importante para os linfócitos T citotóxicos (CTL) que têm reactividade cruzada com todos os vírus do tipo A (Townsend e Skehel, 1984). Os CTL reconhecem pequenos péptidos sintéticos correspondendo a regiões lineares da molécula de Influenza NP (Townsend *et al.*, 1985 e 1986).

A Publicação Internacional PCT WO 93/20846 descreve uma vacina recombinante sintética contra várias estirpes de vírus influenza diferentes, compreendendo, pelo menos, uma proteína quimérica compreendendo a sequência de aminoácidos da flagelina e, pelo menos, uma sequência de aminoácidos de um epitopo de HA ou NP do vírus influenza, ou um agregado da referida proteína quimérica. Seguindo esta abordagem, verificou-se que uma vacina anti-influenza recombinante sintética baseada em três epítopos é altamente eficiente em murhanhos. Esta vacina inclui HA 91-108, um epitopo das células B de HA que é conservado em todas as estirpes de H3 e induz anticorpos neutralizadores anti-influenza, em conjunto com epítopos das células T auxiliares e epítopos CTL de NP (NP 55-69 e NP 147-158, respectivamente), que induzem respostas imunitárias restritas a MHC. Cada um destes epítopos foi expresso na flagelina da

estirpe da vacina da Salmonela. Os flagelos isolados foram administrados a murganhos, resultando em protecção contra infecção viral (Levi e Arnon, 1996).

Ben-Yedidia T. et al., (Mechanisms in Ageing and Development 104 (1998), pp. 11-23) investigaram a eficiência de vacina de influenza de três epitopos em murganhos de diferentes grupos de idades.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, os epitopos do péptido de influenza reactivos com células humanas foram expressos em flagelina de *Salmonella* e testados para a eficácia em quimeras por radiação humano/murganho em que as PBMC humanas foram enxertadas de um modo funcional. A eliminação do vírus após estímulo e a resistência a infecção letal foi observada apenas nos murganhos vacinados e a produção de anticorpos humanos específicos para o vírus foi também superior neste grupo. A análise FACS mostrou que a maioria das células humanas nos murganhos transplantados eram CD8+ e CD4+, indicando que a protecção foi mediada, principalmente, pela resposta celular imunitária.

A presente invenção refere-se, assim, a uma vacina de influenza baseada em péptidos sintéticos humanos para administração intranasal compreendendo uma mistura de flagelos contendo, pelo menos, quatro epitopos de vírus influenza, cada um expresso individualmente em flagelina de *Salmonella*, sendo os referidos epitopos do vírus influenza reactivos com células humanas e sendo seleccionados do grupo consistindo de: (i) um

epitopo de hemaglutinina (HA) das células B; (ii) um epitopo de hemaglutinina (HA) das células T auxiliares ou da nucleoproteína (NP) que se pode ligar a muitas moléculas de HLA; e (iii), pelo menos, dois epitopos de linfócitos citotóxicos (CTL), nucleoproteínas (NP) ou proteínas da matriz (M), que são restritos às moléculas de HLA mais prevalentes nas diferentes populações humanas.

O epitopo HA das células B é o epitopo 91-108 da hemaglutinina do vírus influenza [HA 91-108] da sequência:

**Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asn-Cys-Tyr-Pro-
Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala-Ser-Leu**

Os epitopos das células T auxiliares são o epitopo 307-319 da hemaglutinina do vírus influenza [HA 307-319] da sequência:

Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr

e o epitopo 306-324 de HA [HA 306-324] da sequência:

**Cys-Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-
Lys-Leu-Ala-Thr-Gly-Met-Arg-Asn-Val**

Os epitopos dos linfócitos T citotóxicos (CTL) utilizados na vacina da invenção irão variar de acordo com o tipo de população, nomeadamente, Caucasiana ou não-Caucasiana (de origem Asiática ou Africana). Para as populações Caucasianas, os epitopos CTL são o epitopo 335-350 da nucleoproteína (NP) do vírus influenza [NP 335-350] de sequência:

**Ser-Ala-Ala-Phe-Glu-Asp-Leu-Arg-
Val-Leu-Ser-Phe-Ile-Arg-Gly-Tyr**

e o epitopo 380-393 de NP [NP 380-393] da sequência:

**Glu-Leu-Arg-Ser-Arg-Tyr-Trp-
Ala-Ile-Arg-Thr-Arg-Ser-Gly**

Numa forma de realização preferida da invenção, a vacina da influenza intranasal consiste numa mistura de quatro epitopos do vírus influenza: epitopos de hemaglutinina HA91-108 e HA307-319, e epitopos ds nucleoproteína NP335-350 e NP380-393, expressos individualmente na flagelina da *Salmonella*. Para as populações não-Caucasianas, podem ser utilizados outros epitopos de CTL.

A presente invenção refere-se, também, à utilização de uma mistura de flagelos contendo, pelo menos, quatro epitopos de vírus influenza, cada um expresso individualmente na flagelina da *Salmonella*, como descrito acima, para a preparação de uma vacina de influenza sintética humana para administração intranasal.

A presente invenção refere-se, também, a um método para induzir uma resposta imunitária e conferir protecção contra o vírus influenza em humanos, que compreende a administração intranasal, a indivíduos humanos, de uma vacina de influenza baseada em péptidos sintéticos, compreendendo uma mistura de flagelos, como descrito abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Nas seguintes legendas, “construção tetra” significa uma mistura dos flagelos expressando quatro epitopos de influenza HA91-108, HA307-319, NP335-350 e NP380-393, respectivamente.

Fig. 1A-1B representam histogramas FACS típicos de linfócitos pulmonares humanos em quimeras por radiação humano/murganho, imunizados com a construção tetra. As amostras foram recolhidas 7 dias após imunização. As células foram separadas num gradiente de phicoll e coradas com anti-CD45, em conjunto com anti-CD3 (**Fig. 1A**) ou em conjunto com anti-CD19 (**Fig. 1B**), conjugado ao respectivo corante fluorescente. Os histogramas mostraram que, após imunização, a maioria das células humanas são células T e não conseguem ser detectadas quase nenhuma células B.

Fig.2: Foram analisados homogenatos de pulmões de murganhos imunizados e não imunizados, bem como um grupo de murganhos não transplantado, para o título de vírus, 5 dias após estímulo viral. Os murganhos foram imunizados com construção tetra (bloco da esquerda) ou flagelina nativa que não expressa os epitopos de influenza (bloco do meio). Outro grupo de controlo não recebeu PBMC mas foram imunizados com a construção tetra (bloco da direita). A figura apresenta os dados médios de 7 experiências repetidas, nas quais cada grupo consistiu em 6-8 animais. Em cada experiência foram empregues diferentes dadores.

Fig.3: Produção de anticorpos humanos (quantidade total de IgG, IgM e IgA) nas quimeras por radiação humano/murganho (6-8 animais por grupo em 7 experiências repetidas, foram

empregues diferentes dadores em cada experiência) imunizados com a construção tetra (coluna da esquerda) ou flagelina nativa que não expressa os epitopos de influenza (coluna do meio). Outro grupo de controlo não recebeu PBMC, mas foi imunizado com a construção tetra (coluna da direita). As amostras de soro foram diluídas de 1:10, as amostras de pulmões foram diluídas de 1:60. A produção Ab no grupo que foi transplantado e vacinado com a construção tetra (coluna da esquerda) foi significativamente superior relativamente aos outros grupos de controlo.

Fig. 4: Percentagem de sobreviventes das quimeras por radiação de humano/murganho de estímulo letal, após vacinação intranasal com a construção tetra. Os murganhos (5-10 animais por grupo em 2 experiências repetidas, foram empregues diferentes dadores em cada experiência) foram transplantados com PBMC no dia 0, vacinados no dia 9 e estimulados 7 dias depois. A vacinação com a construção tetra (círculos a preto), flagelina nativa (círculos vazios) ou murganhos não transplantados que foram vacinados com a construção tetra (quadrados). Após o dia 40, a taxa de sobrevivência permaneceu igual e todos os murganhos sobreviventes eventualmente recuperados.

Fig. 5: Peso corporal dos murganhos sobreviventes, que é indicador da gravidade da doença e o potencial para um processo de recuperação. As quimeras por radiação humano/murganho (5-10 animais por grupo em 2 experiências repetidas, foram empregues dadores diferentes em cada experiência), foram transplantadas com PBMC no dia 0, vacinadas intranasalmente no dia 9 e estimuladas intranasalmente 7 dias depois com uma dose letal do vírus.

Os murganhos vacinados com a construção tetra (círculos a preto) perderam menos peso e recuperaram mais rapidamente do que os dos outros grupos. Os grupos de controlo consistiram de murganhos transplantados que foram administrados com flagelina nativa (círculos vazios) ou murganhos não transplantados que foram vacinados com a construção tetra (quadrados). Após o dia 40, todos os murganhos sobreviventes recuperaram lentamente e ganharam peso.

Fig.6: Vacinação de protecção das quimeras por radiação humano/murganho transplantadas com PBMC e imunizadas intranasalmente com a construção tetra. Cada grupo de quimeras humano/murganho (5-10 animais por grupo em 2 experiências repetidas, foram empregues diferentes dadores em cada experiência) foi transplantada com as PBMC obtidas por leucoforese de um dador, que foi infectado 7 dias após a imunização, com uma das três estirpes de influenza diferentes: A/PR/8/34 (H1N1), A/Japonesa/57 (H2N2) ou A/Texana/1/77 (H3N2). Tanto os murganhos transplantados (coluna da esquerda) como os não-transplantados (coluna da direita), foram vacinados com a construção tetra. No entanto, apenas os murganhos transplantados foram capazes de resistir à infecção e o título do vírus nos seus pulmões foi significativamente reduzido.

Fig. 7: Anticorpos humanos no soro contra o vírus influenza, após imunização das quimeras por radiação humano/murganho, letalmente irradiadas (5-10 por grupo) radioprotégidos com 3×10^6 de SCID de medula óssea (BM) e transplantados com 70×10^6 de PBMC humanas. Todos os grupos foram imunizados com a construção tetra e, depois, estimulados com a dose subletal da estirpe H1N1 (losangos a preto) ou H2N2 (círculos a

preto) ou H3N2 (quadrados a preto). O grupo de controlo consistiu em murganhos reabastecidos com SCID irradiados que não receberam PBMC e foram imunizados com a mesma vacina antes de serem estimulados com H1N1 (losangos vazios) ou H2N2 (círculos vazios) ou H3N2 (quadrados vazios).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O conceito de vacina baseada em péptidos tem várias vantagens sobre as vacinas tradicionais, incluindo condições de segurança, o prazo de validade relativamente longo, a capacidade para direccionar a resposta imunitária aos epitopos específicos que não são supressores nem perigosos para o hospedeiro e a possibilidade de preparar uma vacina com multi-patogénicos. A eficácia de uma vacina peptídica é altamente dependente da identificação exacta dos epitopos imunogénicos que conferem protecção bem como a eficiente apresentação destes epitopos ao sistema imunitário.

A ideia de uma vacina peptídica para a influenza que inclui ambos os epitopos das células B e T, foi previamente testada num modelo de murganho e foi demonstrado que uma tal “vacina” poderá induzir a resposta local específica nos pulmões que conduz à protecção dos murganhos imunizados contra o estímulo viral (Arnon e Levi, 1996). No modelo de murganho utilizado aí, foi demonstrado que o epitopo das células B induz, realmente, uma produção de Ab elevada, enquanto o epitopo das células T auxiliares induz a proliferação dos linfócitos específica e o epitopo CTL foi importante para a actividade citotóxica contra as células infectadas. No entanto, a protecção eficiente foi

alcançada apenas quando os murganhos foram imunizados com uma mistura dos três epitopos (Levi e Arnon, 1996).

De acordo com a presente invenção, para o objectivo de utilização humana, têm de ser seleccionados epitopos apropriados porque os epitopos das células T são restritos a MHC. Inicialmente, os requerentes observaram que são necessários, pelo menos, quatro epitopos de influenza para utilização humana: um epitopo de HA das células B, um epitopo de HA das células T ou NP que se possa ligar a muitas moléculas HLA e, pelo menos, dois epitopos CTL de NP ou de matriz que são restritos à maioria das moléculas de HLA prevalentes nas diferentes populações.

De acordo com a invenção, o epitopo influenza das células B é HA 91-108. O epitopo influenza das células T auxiliares é HA 307-319. Também pode ser utilizado o HA 306-324 (Rothbard, 1988) ou NP 206-229 (Brett, 1991).

Os epitopos influenza de CTL são diferentes na população Caucasiana, Asiática ou Africana. Para a população Caucasiana, os epitopos CTL de influenza são NP335-350 e NP380-393 (Dyer e Middleton, 1993; Gulukota e DeLisi, 1996), que são restritos à maioria das moléculas de HLA prevalentes na população caucasiana. Outros epitopos de influenza que podem ser utilizados para a população Caucasiana são os epitopos de nucleoproteínas: NP305-313 (DiBrino, 1993); NP384-394 (Kvist, 1991); NP89-101 (Cerundolo, 1991); NP91-99 (Silver *et al.*, 1993); NP380-388 (Suhrbier, 1993); NP44-52 e NP265-273 (DiBrino, 1994); e NP365-380 (Townsend, 1986); e a proteína da matriz (M) epitopos M2-22, M2-12, M3-11, M3-12, M41-51, M50-59, M51-59, M134-142, M145-155, M164-172, M164-173 (todos descritos por

Nijman, 1993); M17-31, M55-73, M57-68 (Carreno, 1992); M27-35, M232-240 (DiBrino, 1993).

Para as populações não-Caucasianas, os epitopos CTL de influenza que podem ser utilizados são HA458-467 da sequência Asn-Val-Lys-Asn-Leu-Tyr-Glu-Lys-Val-Lys (NVKNLYEKVK), um epitopo CTL para o alelo A11 com frequência elevada nas populações Japonesa, Chinesa, Tailandesa e Indiana (J. Immunol. 1997, 159(10): 4753-61); M59-68 e M60-68 das sequências Ile-Leu-Gly-Phe-Val-Phe-Leu-Thr-Val (ILGFVFTLTV) e Leu-Gly-Phe-Val-Phe-Leu-Thr-Val (LGFVFTLTV), respectivamente, dois epitopos CTL para HLA-B51 com elevada frequência na população Tailandesa (Eur. J. Immunol. 1994, 24(3): 777-80); e M128-135 da sequência Ala-Cys-Ser-Met-Gly-Leu-Ile-Tyr (ACSMGLIY), um epitopo CTL para o alelo B35 com elevada frequência na população negra da África Ocidental (Eur. J. Immunol. 1996, 26(2): 335-39).

Uma vez que os péptidos são, normalmente, fracos imunogénios, a eficácia da vacina baseada em péptidos, depende da apresentação adequada dos epitopos ao sistema imunitário. Os epitopos de influenza foram expressos no gene da flagelina da estirpe da vacina da *Salmonella*, que proporciona ambas as fracções de adjuvante e veículo. Após clivagem dos flagelos das bactérias e dos passos de purificação, a suspensão fina dos flagelos foi utilizada para vacinação. Foi utilizada uma suspensão fina dos flagelos para a vacinação. Todas as imunizações foram efectuadas com uma mistura de quatro epitopos: HA91-108, HA307-319, NP335-350 e NP380-393, expressos na flagelina da *Salmonella*, na ausência de qualquer adjuvante. A mistura dos referidos quatro epitopos é referida como “construção tetra” ao longo desta descrição.

Os três epitopos das células T utilizados na vacina da presente invenção foram seleccionados devido ao seu reconhecimento específico pelos HLA prevalentes na população Caucasiana e foram incluídos na vacina em conjunto com o epitopo das células B HA 91-108. De modo a ultrapassar o problema da variação antigénica do vírus, todos estes epitopos são derivados de regiões conservadas nas proteínas virais e, por sua vez, podem induzir a protecção de estirpe cruzada. Os dois epitopos CTL das nucleoproteínas internas são reconhecidos pelos HLA prevalentes da população Caucasiana: o epitopo NP 335-350 é restricto aos halotipos A2, A3, Aw68.1 e B37 de HLA e o epitopo NP 380-393 é restricto aos halotipos B8 e B27 de HLA. O epitopo das células T auxiliares da hemaglutinina, HA 307-319, é um epitopo "universal" restricto a maioria das moléculas de classe II de MHC, incluindo DR1, DR2, DR4, DR5, DR7, DR9, DR52A e outras. Estes epitopos das células T, em conjunto com o epitopo das células B HA 91-108, foram expressos individualmente na flagelina e a mistura dos flagelos resultantes foi utilizada sem qualquer adjuvante para vacinação intranasal das quimeras por radiação de humano/murgancho, induzindo, assim, uma resposta imunitária e conferindo protecção. Os murganchos vacinados foram também protegidos de uma infecção letal e a sua recuperação foi mais rápida.

Para avaliar a capacidade de tal construção tetra como uma vacina e estimular uma resposta do sistema imunitário humano, foi empregue um modelo de murgancho humanizado. A observação de que as PBMC humanas podem ser transferidas, através de adopção, i.p. no murgancho SCID e que as células enxertadas sobrevivem durante um período de tempo aumentado, produzindo elevados níveis de Ig humano, ofereceu muitas possibilidades novas na investigação em imunologia clínica (revisto em Mosier, 1991). Em

particular, muitos investigadores têm utilizado este modelo para estudar a capacidade dos linfócitos enxertados para gerar respostas humorais humanas primárias e secundárias e para estudos de investigação viral.

Recentemente, Lubin *et al.*, 1994, descreveram uma nova abordagem permitindo o enxerto de PBMC humanas em estirpes normais de murganhos após uma irradiação letal de dose dividida, que permite um enxerto eficaz e rápido de células humanas. Como previamente relatado, em tais quimeras por radiação humano/murganho, respostas humorais humanas acentuadas, tais como respostas celulares (CTL), poderão ser geradas por imunização quer com antígenos estranhos ou com células alogénicas (Marcus *et al.*, 1995; Segal *et al.*, 1996), proporcionando vantagens a este modelo em comparação com o modelo em murganho SCID de Mosier utilizado anteriormente. Outra das vantagens deste modelo é que a disseminação de linfócitos enxertados é muito rápida e ambos os linfócitos B e T foram encontrados por análises de FACS em números significativos nos tecidos linfoides, no período de alguns dias após o transplante (Burakova *et al.*, 1997).

Para avaliar a eficácia de uma vacina de influenza humana de acordo com a invenção, foi utilizado um modelo de quimeras por radiação de humano/murganho. Embora o número de células B humanas após transplante tenha sido reduzido (**Fig. 1**), os murganhos quiméricos foram capazes de produzir anticorpos específicos em resposta à administração i.p. de antígenos. Isto está de acordo com as verificações anteriores, mostrando que próximo da segunda semana após transplante, as células B e T humanas enxertadas formam folículos no baço e nódulos linfáticos. Além disso, o seu fenótipo foi o das células de

memória, nomeadamente, a maioria positivo a CD45RO e negativo a CD45RA (Burakova *et al.*, 1997).

De acordo com a presente invenção, as quimeras por radiação humano/murganho foram imunizadas com a construção tetra pela via intranasal. Este é o primeiro relato de indução da resposta imunitária local na cavidade nasal e pulmões, após imunização intranasal nas quimeras de radiação humano/murganho.

A indução da resposta imunitária local nos pulmões foi demonstrada pela presença de anticorpos anti-influenza específicos nos homogenatos de pulmões (**Fig. 3**), por aumento da proporção de linfócitos CD8⁺ e pela eliminação viral como um resultado da imunização com a construção tetra (**Fig. 2**). A construção tetra da flagelina poderá, também, proteger os murganhos de um estímulo de dose letal do vírus, que é a demonstração final do efeito protector. Sob estas condições, nas quais a dose de estímulo é na ordem da magnitude superior ao que se passa na infecção natural, todas as quimeras foram infectadas independentemente do estado imunitário. No entanto, embora nenhum dos murganhos imunizados, que não tinha sido transplantado com os linfócitos humanos, tenha sobrevivido à infecção, e apenas 50% dos murganhos transplantados mas não imunizados sobreviveram, o grupo transplantado e imunizado foi completamente protegido e mostrou 100% de sobrevivência (**Fig. 4**).

A protecção parcial nos murganhos não vacinados é, provavelmente, devido à estimulação policlonal e expansão das células de memória originadas a partir de outro dador. Isto poderá ser devido à exposição prévia do dador ao antigénio ou porque é de reacção cruzada até alguma extensão com outros

antigénios recrutados, um fenómeno que foi previamente reportado para outros antigénios (Marcus *et al*, 1995).

No entanto, embora tal protecção parcial tenha sido de facto observada, foi observada uma diferença significativa na eficácia do processo de recuperação entre os grupos imunizados e não imunizados, como evidente tanto na taxa de sobrevivência como no seu padrão de perda de peso (**Fig. 4 e 5**). Embora os fenótipos HLA dos dadores de PMBC não tenham sido determinados, todos os murganhos transplantados foram protegidos como um resultado da vacinação, indicando que os epitopos utilizados na presente invenção sejam, de facto, reconhecidos por uma vasta gama de moléculas de HLA.

Um dos problemas mais agudos relacionados com as vacinas de influenza que existem actualmente é a estreita gama da sua especificidade e a sua actividade específica de estirpe. A variação rápida nas glicoproteínas de superfície virais conduz ao aparecimento de novas estirpes com uma elevada variabilidade na sua estereoespecificidade e, por sua vez, as vacinas contendo as glicoproteínas externas de algumas estirpes específicas estão limitadas, na sua eficácia, a estas estirpes. De acordo com a presente invenção, foi também estabelecida a capacidade de protecção cruzada da vacina de construção tetra. Todos os epitopos que foram incluídos na construção tetra são regiões conservadas nas proteínas respectivas e, consequentemente, os anticorpos contra os flagelos recombinantes poderão reconhecer várias estirpes de influenza (**Tabela 1**). Consequentemente, a imunização dos murganhos quiméricos com os epitopos conduz à produção de anticorpos específicos e à sua protecção da infecção de dose sub-letal por estas três estirpes de influenza diferentes, de especificidade H1, H2 ou H3 (**Fig. 6**).

Assim, os resultados com a construção tetra, de acordo com a invenção, demonstraram a capacidade de uma vacina baseada em péptidos sintéticos para conferir protecção contra o estímulo viral do influenza. A construção da flagelina recombinante apresenta, de facto, os epitopos das células B e T de influenza às células imunitárias humanas de um modo eficiente e induz ambas as respostas celulares e humorais. Uma vez que os epitopos das células T empregues, são reconhecidas por várias moléculas de HLA, a vacina foi eficaz em todas as experiências nas quais foram utilizados diferentes dadores com tipologia HLA desconhecida, indicando a aplicabilidade desta abordagem para uma vacina humana, numa população heteróloga.

EXEMPLOS

Materiais e Métodos

1 Murganhos. Os murganhos BALB/c (4-8 semanas de idade) foram obtidos de Olac Farms (Bicester, R.U.), os murganhos NOD/SCID (4-6 semanas de idade) do Weizmann Institute Animal Breeding Center (Rehovot, Israel). Todos os murganhos foram alimentados com comida esterilizada e água com pH ácido contendo ciprofloxacina (20 µg/mL).

2 Regime de acondicionamento. Os murganhos BALB/c foram expostos a uma irradiação de corpo total letal dividida (TBI) de 4 Gy seguida, 3 dias depois, por 10 Gy. A fonte da radiação é um feixe gama de 150-A ⁶⁰Co (produzido por Atomic Energy of Canada, Kanata, Ontario). As células da medula óssea de murganhos

NOD/SCID (com 4-6 semanas de idade) foram obtidas de acordo com Levite et al., 1991. Os murganhos irradiados receptores foram injectados com $2-3 \times 10^6$ de células de medula óssea de SCID (i.v. em 0,2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS)), um dia depois da irradiação.

3 Preparação e transplantação de linfócitos do sangue periférico humano. Foi retirada uma camada de glóbulos brancos de voluntários normais e colocada numa solução de *Lymphoprep* (Nycomed, Oslo, Noruega) e centrifugada a 2000 rpm, durante 20 min. A intercamada foi recolhida, lavada duas vezes, contada e ressuspensa em PBS pH 7,4, até à concentração de células desejada. As PBMC humanas (70×10^6 de células em 0,5 mL de PBS) foram injectados i.p. num murganho receptor, acondicionado como descrito em cima. Os murganhos de controlo não receberam PBMC humanas.

4 Processo de leucoforese. A leucoforese foi efectuada em voluntários normais. As células foram recolhidas por processamento de 3-4 litros de sangue através de Haemonetics V50 (USA) durante 3-3,5 horas. O produto da leucoforese foi centrifugado a 1200 rpm durante 10 min., e o plasma foi removido.

5 Flagelina quimérica. Os oligonucleótidos correspondentes aos epitopos de influenza designados, nomeadamente, NP335-350 (SAAFEDLRVLSFIRGY), NP380-393 (ELRSRYWAIRTRSG) e dois péptidos de hemaglutinina do subtipo H3: HA91-108 (SKAFSNCYPYDVPDYASL) e HA307-319 (PKYVKQNTLKLAT), foram sintetizados num Sintetizador de ADN 380B Applied Biosystems com uma sequência GAT adicional na extremidade 3' de cada oligonucleótido, de modo a preservar o local de restrição EcoRV, como descrito (Levi e Arnon, 1996). Os

oligonucleóticos sintéticos foram inseridos no local EcoRV do plasmídeo pLS408 e eventualmente transformado numa estirpe da vacina viva negativa à flagelina (um mutante Aro A) de *Salmonella dublin* SL5928 por transdução, utilizando o fago P22HT105/1 int. Finalmente, os flagelos foram purificados após clivagem acídica e foi utilizada uma suspensão fina para imunização (Levi e Arnon, 1996).

6 Preparação de bactérias recombinantes. A construção do vector de expressão pLS408 é descrita por Newton *et al.*, 1989. Os oligonucleótidos sintetizados foram inseridos no local EcoRV do plasmídeo pLS408 e transformados em células competentes de *E. coli* JM101. As colónias contendo o plasmídeo recombinante foram seleccionadas por sondas com um dos oligonucleótidos marcados com ³²p-ATP. Os plasmídeos das colónias positivas foram purificados e a orientação do inserto foi determinado utilizando análise de restrição. Os plasmídeos desejados foram utilizados para transformar células competentes de *Salmonella typhimurium* LB5000 (uma modificação negativa restritiva proeficiente não flagelada) (Bullas e Ryu, 1983,) e foram, depois, transferidas para uma estirpe de vacina viva negativa à flagelina (um mutante Aro A mutant) de *Salmonella dublin* SL5928 por transducção utilizando o fago P22HT105/1 int (Orbach e Jackson, 1982, e Schmieger, 1972,). As *S. Dublin* transformadas foram seleccionadas para a resistência à ampicilina, motilidade sob a luz do microscópio e crescidas em placas de agar LB semi-sólidas, suplementadas com caldo de nutrientes Oxoid N° 2. Os clones seleccionados foram crescidos de um dia para o outro em 2 litros de meio amp./LB e a flagelina foi purificada por clivagem ácida, de acordo com a técnica descrita por Ibrahim *et al.*, 1985.

7 Isolamento dos flagelos. Os flagelos foram isolados de acordo com Ibrahim *et al.*, 1985: As células bacterianas de um crescimento de cultura de um dia para o outro em meio LB/ampicilina, foram sedimentados e suspensos num pequeno volume de PBS. O pH foi reduzido com HCl 1 M para 2,0 e a suspensão foi incubada, à temperatura ambiente, durante 30 minutos, com agitação ligeira. As células que romperam foram removidas por centrifugação, a 5000 rpm, durante 15 minutos e o pH foi reajustado para 7,4. Os flagelos foram, depois, precipitados por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (35% em p/v) e mantidos, de um dia para o outro, a 4 °C. O sedimento obtido após centrifugação, a 10000 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C, foi dissolvido em PBS, dializado contra um volume grande de PBS a 4 °C e qualquer precipitado formado foi descartado. A proteína resultante foi armazenada a -20 °C. Estes flagelos resultantes são um agregado da proteína flagelina e podem ser utilizados como tal para uma vacina. A presença de uma flagelina quimérica de HA e proteína do epitopo NP da invenção são apresentados na Fig. 2 após SDS-PAGE dos flagelos.

8 Imunização e infecção de animais quiméricos. Ao nono dia após transplante de PBMC, as quimeras humano/murganho foram imunizadas uma vez, intranasalmente, com uma mistura de 25 µg de cada construção de flagelina híbrida num volume total de 50 µL de PBS ou, no grupo de controlo, com 75 µg dos flagelos nativos. Esta quantidade foi predeterminada como a dose óptima numa experiência preliminar em murganhos BALB/c. A infecção dos murganhos foi efectuada 7 dias mais tarde por inoculação intranasal do fluído alantóico infeccioso, 50 µL de vírus HAU a 10^{-4} por murganho, tanto na imunização como na infecção, os murganhos foram colocados sob uma anestesia de éter ligeiro. As

quimeras foram sacrificadas ao 5º dia após infecção. Foram removidos os pulmões para titulação viral.

9 A análise FACS de PBMC de dadores e células humanas enxertadas em murganhos quiméricos. Para a avaliação do enxerto de células humanas nas quimeras humano/murganho, os murganhos enxertados com linfócitos humanos foram sacrificados 27-29 dias após o transplante de PBMC. Os linfócitos de homogenatos de pulmão, bem como lavagens peritoneais, foram separados por gradiente de *ficoll-paque* (Pharmacia Biotech AB, Upsala, Suécia) e depois incubados durante 30 min em gelo, com uma mistura de anticorpos monoclonais com fluorescência apropriada. Após lavagem, foi efectuada uma análise de fluorescência dupla de antigénios humanos num analisador de FACScan (Beckton-Dickinson, CA). Foram utilizados os seguintes anticorpos que reconheceram moléculas de superfície humanas específicas: anti-CD45-ficoeritrina (PE)(clone HI30) de Pharmigen; proteína de clorofila anti-CD3-peridínina (PerCP) (clone SK7); e anti-CD19-FITC (clone 4G7) (Beckton-Dickinson, CA).

10 Determinação da imunoglobulina humana. A Ig humana total foi quantificada nas amostras de soro por ELISA em sanduíche, utilizando anticorpo de cabra anti-Ig humano F(ab)₂ purificado (G+M+A) (Sigma), como o agente de captura e anticorpo de cabra anti-Ig humano purificado conjugado com peroxidase (G+M+A) (Sigma), como o reagente de detecção. O soro humano de concentração conhecida em imunoglobulina foi utilizado como o padrão. A ELISA foi efectuada como descrito por Marcus et al., 1995.

11 Determinação de imunoglobulinas humanas específicas para o influenza. Os homogenatos de pulmões e soro foram testados

para anticorpos humanos anti-influenza específicos. O vírus (100 HAU/mL) foi adsorvido em placas de ELISA e o bloqueio foi efectuado com albumina de soro bovino a 1% (BSA) em PBS. Foi utilizado anticorpo de coelho anti-Ig humano, conjugado a peroxidase de rábano (Sigma), como segundo anticorpo. Após a adição do substrato (ABTS) as placas foram lidas a 414 nm.

12 Vírus influenza. Foram utilizadas as estirpes de influenza A/PR/8/34 (H1N1), A/Japonesa/57 (H2N2) e A/Texana/1/77 (H3N2). As quantidades de vírus foram determinadas em unidades de hemaglutinação (HAU). Para imunização, foi utilizado o vírus inactivo (A/Texana/1/77), purificado por gradiente de sacarose. O crescimento do vírus e purificação foram efectuados de acordo com métodos convencionais (Barret e Inglis, 1985). Para a titulação com vírus, as amostras de pulmão foram homogenizadas em PBS contendo 0,1% de BSA e centrifugadas, de modo a remover fragmentos. Os títulos de vírus foram determinados pelo método de titulação do ovo inteiro (Barret e Inglis, 1985). O título foi calculado por hemaglutinação e apresentado como o Log EID₅₀ (Thompson, 1947).

13 Análise estatística. As análises estatísticas foram efectuadas utilizando o programa Stat View II (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, EUA) num Macintosh IICi. O teste F foi utilizado para calcular a probabilidade dos valores (p). Os resultados são apresentados como a média e desvio padrão de, pelo menos, duas experiências independentes repetidas, incluindo 5-10 animais por grupo.

EXEMPLO 1. Resposta do murganho quimérico ao vírus influenza completo inactivado

De modo a estabelecer uma adequabilidade das quimeras por radiação humano/murganho para avaliar a vacina com base em péptidos sintéticos, foi inicialmente avaliada a sua resposta imunitária ao vírus influenza purificado inactivo que é conhecido por ser protector. Os murganhos foram imunizados i.p. com 50 µg do vírus, no dia do transplante de PBMC, seguido por um estímulo viral sub-letal com a estirpe A/Texana/1/77 de influenza 14 dias após a imunização. A vacinação das quimeras por radiação humano/murganho com a vacina de vírus inteiros mortos sem qualquer adjuvante, induz a produção dos anticorpos específicos - o título de anticorpo no soro foi significativamente superior (2,4 vezes) nas quimeras imunizadas em comparação com o grupo de controlo. Além disso, esta vacinação reduziu acentuadamente a infecção viral subsequente. O título de vírus nos pulmões após estímulo foi significativamente inferior (na ordem de 2,7 de magnitude) nas quimeras imunizadas, quando comparado com o grupo de controlo.

Após ter demonstrado, assim, a adequabilidade das quimeras por radiação humano/murganho para avaliar a resposta anti-influenza após a imunização com o vírus influenza inactivo, foi efectuada a avaliação da vacina recombinante baseada em péptidos sintéticos, concebida para humanos, neste modelo de murganhos humanizados.

EXEMPLO 2. Análises FACS dos murganhos imunizados para avaliar o enxerto de PBMC humanas em quimeras humano/BALB

O sucesso do enxerto de células humanas nas quimeras humano/murganho foi demonstrado numa experiência preliminar que mostrou que a maioria dos linfócitos no peritoneu (50-80%) e nos pulmões dos murganhos (30-60%) eram de origem humana. Para a avaliação do enxerto de células humanas nas quimeras humano/murganho, a presença de células humanas no murganho enxertado foi analisada por FACS.

Fig. 1 é um histograma de FACS representando o padrão dos linfócitos pulmonares humanos após imunização com a construção tetra sem outra infecção de estímulo. As células foram coradas com anticorpos anti-CD45 em conjunto com anti-CD3 ou em conjunto com anti-CD19. Como apresentado, a maioria das células humanas (coradas com anti-CD45) são CD3⁺, nomeadamente, células T (80%-90%) e apenas uma população menor é CD19⁺ (3%-10%). Foram obtidos dados semelhantes para linfócitos humanos no peritônio. Foi interessante observar que a proporção CD8⁺/CD4⁺ nos murganhos imunizados variou entre 1 e 2 quando comparado com uma proporção de 0,3-0,5 nas quimeras não tratadas. Esta expressão desproporcionada das células CD8 pode sugerir que estas têm uma função na protecção observada.

EXEMPLO 3. Eliminação do vírus dos pulmões após estímulo sub-letal

A infecção por influenza é uma doença respiratória, deste modo, uma resposta imunitária local induzida por uma administração intranasal da vacina poderá ser mais eficaz do que

a administração parentérica. O calendário de imunização foi modificado de modo a adaptar-se à imunização intranasal.

Os murganhos (6-8 por grupo, em 7 experiências repetidas) foram imunizados intranasalmente (i.n.) 10-12 dias após o transplante com PBMC, como descrito nos Métodos. Dez dias depois, foram estimulados i.n. com 10^{-4} HAU em 50 μ L de fluido alantóico de estirpes A/Texana/1/77 vivas do vírus influenza. Cinco dias depois foram sacrificados e os seus pulmões foram removidos para a titulação do vírus. Como apresentado na **Fig. 2**, que representa os resultados cumulativos, a vacinação com a construção tetra permitiu que as quimeras eliminassem o vírus dos seus pulmões de um modo significativamente mais eficiente do que no grupo vacinado com os flagelos nativos, ou no grupo que não foi transplantado com PMBC mas que foi imunizado com a construção tetra. Embora tenha sido detectada a mesma percentagem de linfócitos T humanos em ambos os grupos transplantados (**Fig. 1**), apenas os murganhos vacinados com a flagelina híbrida mostraram capacidade para reduzir a carga de vírus, indicando uma resposta local eficiente nos pulmões.

A produção de anticorpos humanos nestes murganhos foi avaliada tanto no soro (antes do estímulo) como nos pulmões (após estímulo). A imunização com a construção tetra resultou num título significativamente superior de anticorpos humanos específicos para o vírus em ambas as amostras de soro e pulmões (**Fig. 3**). Parece que embora a proporção de linfócitos CD19⁺, como detectado por análises de FACS seja, de um modo semelhante, inferior nos murganhos imunizados e transplantados de controlo, a produção da resposta de anticorpos anti-influenza difere significativamente entre os dois grupos.

EXEMPLO 4. Padrão de sobrevivência e perda de peso após dose letal da infecção viral

Para além da experiência de estímulo de infecção sub-letal, foi avaliada a capacidade da construção tetra para proteger as quimeras humano/murganho, de uma dose letal de vírus influenza. A **Fig. 4** descreve os resultados de duas experiências repetidas e demonstra a sobrevivência dos murganhos vacinados e não vacinados (ambos transplantados com PBMC humanas), bem como de outro grupo de controlo que não foi transplantado mas foi vacinado com a construção tetra. Como pode ser observado, embora todos os murganhos de controlo que foram imunizados com a construção tetra mas não tinham sido transplantados com os linfócitos humanos, tenham morrido no período de 19 dias após infecção, foi observada uma taxa de sobrevivência de 100% nos murganhos que receberam as PBMC antes da imunização. Isto indica que a sobrevivência é devida a uma resposta das células imunocompetentes humanas transplantadas. As PBMC, por si só, proporcionam um efeito benéfico limitado, como foi observado 50% de sobreviventes no grupo de controlo que foi vacinado com a flagelina nativa, que por si só não induz qualquer resposta protectora anti-influenza.

Na **Fig. 5**, é apresentado o padrão de perda de peso corporal do murganho estimulado: o grupo transplantado que foi imunizado com a construção tetra de flagelina, mostra apenas uma ligeira redução no seu peso corporal após uma infecção de dose letal e um rápido regresso ao normal, enquanto o grupo de controlo que foi transplantado com as PMBC humanas mas imunizado com a flagelina nativa, perdeu mais peso (o peso corporal é significativamente diferente entre o grupo experimental e os

grupos de controlo nos dias 22-33 após transplante) e os murganhos sobreviventes começaram a recuperar peso apenas no último dia da experiência. O grupo de controlo vacinado não transplantado perdeu peso rapidamente e não recuperou. A sobrevivência do grupo transplantado que foi imunizado com os flagelos nativos é melhor do que o grupo não transplantado, provavelmente devido a alguma resposta anti-influenza de memória das células dadoras.

EXEMPLO 5. Protecção da infecção com diferentes estirpes de influenza

Um dos principais problemas com as vacinas de influenza disponíveis actualmente é que são eficazes apenas contra a estirpe incluída na vacina. Deste modo, foi interessante avaliar a capacidade dos híbridos de flagelina que expressam os epitopos de influenza para proteger os murganhos das diferentes estirpes de influenza que transportam várias glicoproteínas hemaglutininas e neuraminidasas. O epitopo das células B que é expresso na flagelina é conservado em todos os sub-tipos H3 do influenza, enquanto os epitopos das células T são de regiões da nucleoproteína e hemaglutinina altamente conservadas noutros subtipos também. No primeiro passo, foi demonstrado que os anticorpos de coelho para estes epitopos podem, de facto, reconhecer e reagir em ELISA com diferentes estirpes de influenza, incluindo A/Texas/1/77, A/Aichi/68, A/PR/8/34 e A/Japonesa/57 (Tabela 1). Para testar também o potencial destes epitopos para conferir protecção cruzada em humanos, as quimeras por radiação humano/murganhos (8 murganhos por grupo), foram imunizados i.n. com a construção tetra. A sua resistência a diferentes estímulos com estirpes de influenza foi detectada

7 dias depois e comparada com murganhos não-transplantados que foram imunizados com a mesma mistura de flagelos. As estirpes de influenza que foram utilizadas para a infecção foram: A/Texas/1/77 (H3N2), A/Japonesa/57 (H2N2) e A/PR/8/34 (H1N1). A imunidade protectora foi observada contra as três estirpes, como apresentado na **Fig. 6**. A Ig humana específica para cada estirpe de influenza foi detectada no soro de todos os murganhos transplantados e vacinados, mas não no grupo de controlo, como apresentado na **Fig. 7**.

Tabela 1

Estirpe do Vírus Influenza	Ab Anti-NP 335-350	Ab anti-NP 380-393	Ab anti-HÁ 91- 108	Ab anti-HA 307- 319	Ab anti-Vírus (Texana)
A/Texas/1/77	++	+	+++	+-	+++
A/Aichi/68	+++	++	+++	++	+++
A/P.C./73	+++	+	++	+-	+++
A/Inglaterra/ 42/72	+++	+	+++	+	+++
A/PR/8/34	+++	++	+++	++	+++
A/Japonesa/57	+++	+-	+++	+-	+++
A/X/31	+++	+	+++	+++	+++
B/Victoria/2/ 87	+++	+	++	+++	+++

Os coelhos imunizados com quatro epitopos de influenza (NP 335-350, NP 380-393, HA 91-108 e HA 307-319) conjugados a BSA, produziram anticorpos cuja especificidade foi determinada por ELISA. Estes anticorpos reconhecem diferentes estirpes de vírus influenza que foram revestidos em microplacas ELISA. O reconhecimento entre anticorpos construídos contra o vírus inteiro (A/Texas/1/77) serve como controlo positivo. As amostras

de soro foram testadas na diluição 1:150 e o reconhecimento de anticorpos foi colocado em escalas de acordo com o O.D. máximo: +++ = O.D > 2; ++ = O.D 1-2; + = O.D 0,5-1; +- = O.D < 0,5;

Referências

1. Arnon, R. e Levi, R. Synthetic recombinant vaccine induces anti-influenza long-term immunity and cross strain protection, In: *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines* (Ed.: Cohen, S. e Shafferman, A.) Plenum Press, N.I., 1996, p. 23.
2. Barrett, T. e Inglis, S.C. Growth purification and titration influenza viruses, In: *Virology: A practical approach* (Ed. Mahy, W.J.) IRL Press, Wash. D.C., 1985, pp. 119-151.
3. Brett et al., *J. Immunol.* 1991. 147:984-991.
4. Bullas, L.R. e Ryu, J. *J. of Bacteriol.* 1983. 156:471-74.
5. Burakova, T., Marcus, H., Canaan, A., Dekel, B., Shezen, E., David, M., Lubin, I., Segal, H. e Reisner, Y. Engrafted human T and B lymphocytes form mixed follicles in lymphoid organs of human/mouse and human/rat radiation chimera. *Transplantation* 1997. 63:1166-1171.
6. Carreno, B.M., Koenig, S., Coligan, J.E. e Biddison, W.E. The peptide binding specificity of HLA class I

molecules is largely allele- specific and non-overlapping.
Mol Immunol 1992. 29:1131-1140.

7. Cerundolo *et al.* *Proc. R. Soc. Lon.* 1991. 244:169-7.

8. DiBrino *et al.* *PNAS* 90. 1993. (4):1508-12.

9. Dyer, P. e Middleton, D. In: *Histocompatibility testing, a practical approach* (Ed.: Rickwood, D. e Hames, B.D.) IRL Press, Oxford, 1993, p. 292.

10. Gulukota, K. e DeLisi, C. HLA allele selection for designing peptide vaccines. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1996. 13:81.

11. Ibrahim, G.F. *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 1985. 22:1040-1044.

12. Kvist *et al.*, *Nature.* 1991. 348:446-448.

13. Laver, W.G., Air, G.M., Dopheide, T.A. e Ward, C.W. Amino acids sequence changes in the Hemagglutinin of A/Hong kong (H3N2) influenza virus during the period 1968-77. *Nature* 1980. 283:454-457.

14. Laver, W., Air, G., Webster, R., Gerhard, W., Ward, C. e Dopheid, T. Antigenic drift in type A influenza virus: sequence differences in the Hemagglutinin of Hong-Kong (H3N2) variants selected with monoclonal hybridoma antibody. *Virology* 1980a. 98:226-237.

15. Levi, R. e Arnon, R. Synthetic recombinant influenza vaccine induces efficient long-term immunity and cross-strain protection. *Vaccine* 1996. 14:85-92.
16. Levite, M., Meshorer, A. e Reisner, Y. A rapid method for obtaining murine bone marrow cells in high yield. *Bone Marrow Transpl.* 1991. 8:1-3.
17. Lubin, I., Segall, H., Marcus, H., David, M., Kulova, L., Steinitz, M., Erlich, P., Gan, J. e Reisner, Y. Engraftment of human peripheral blood lymphocytes in normal strains of mice. *Blood* 1994. 83:2368-2381.
18. Marcus, H., David, M., Cnaan, A., Kulova, L., Lubin, I., Segal, H., Denis, L., Erlich, P., Galun, E., Gan, J., Laster, M. e Reisner, Y. Human/mouse radiation chimera are capable of mounting a human primary humoral response. *Blood* 1995. 86:398-406.
19. Mosier, D.E. Adoptive transfer of human lymphoid cells to severely immunodeficient mice: models for normal human immune function, autoimmunity, lymphomagenesis, and AIDS. *Adv. Immunol.* 1991. 50:303-325.
20. Newton, S.M.C. et al., *Science*. 1989. 244:70-72.
21. Nijman et al., *Eur. J. Immunol.* 1993. 23:1215-1219.
22. Orbach, M.J. e Jackson, E.N. *J. Bacteriol.* 1982. 149: 985-994.
23. Rothbard, J.B., et al., *Cell*. 1988. 52(4):515-523.

24. Schmieger, H. *Mol. Gen. Genet.* 1972. 119: 75-88.
25. Segal, H., Lubin, I., Marcus, H., Canaan, A. e Reisner, Y. Generation of primary antigen-specific human cytotoxic T lymphocytes in human/mouse radiation chimera. *Blood* 1996. 88:721-730.
26. Silver *et al.*, *Nature*. 1993. 360: 367-369.
27. Suhrbier, A., Schmidt, C. e Fernan, A. Prediction of an HLA B8-restricted influenza epitope by motif. *J. Immunology* 1993. 79:171-173.
28. Thompson, W.R. Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose. *Bacteriol. Rev.* 1947. 11:115-145.
29. Townsend, A.R.M. e Skehel, J.J. *J. Exp. Med.* 1984. 160:552-563.
30. Townsend, A.R.M. *et al.*, *Cell*. 1985. 42:457-467.
31. Townsend, A.R.M. *et al.*, *Cell*. 1986. 44:959-968.
32. Webster, R.G., Laver, W.G., Air, G.M. e Schild, G.C. Molecular mechanism of variation in influenza viruses. *Nature* 1982. 296:115-121.

LISTA DAS SEQUÊNCIAS

<110> Yeda Research and Development Co., Ltd.

<120> Vacina baseada em Péptidos para Influenza

<130> EP21464IHV163pau

<140> ainda não atribuída

<141> aqui com

<150> 99 972 929.6

<151> 1999-11-28

<150> PCT/IL99/00640

<151> 1999-11-28

<150> IL 127331

<151> 1998-11-30

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Vírus Influenza

<400> 1

Ser Lys Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5 10 15

Ser Leu

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Vírus Influenza

<400> 2

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Vírus Influenza

<400> 3

Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met
1 5 10 15
Arg Asn Val

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Vírus Influenza

<400> 4

Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Vírus Influenza

<400> 5

Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly
1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Vírus Influenza

<400> 6

Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys
1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus Influenza

<400> 7

Ile Leu Gly Phe Val Phe Leu Thr Val
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Vírus Influenza

<400> 8

Ile Leu Gly Phe Val Phe Leu Thr Val
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Vírus Influenza

<400> 9

Ala Cys Ser Met Gly Leu Ile Tyr
1 5

Lisboa, 3 de Agosto de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina da influenza baseada em péptidos sintéticos humanos compreendendo os quatro epitopos do vírus influenza:

(i) um epitopo de hemaglutinina das células B que é o epitopo de hemaglutinina HA91-108 de sequência: Ser-Lys-Ala-Phe-Ser-Asn-Cys-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala-Ser-Leu;

(ii) um epitopo das células T auxiliares que é o epitopo de hemaglutinina HA307-319 de sequência: Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr;

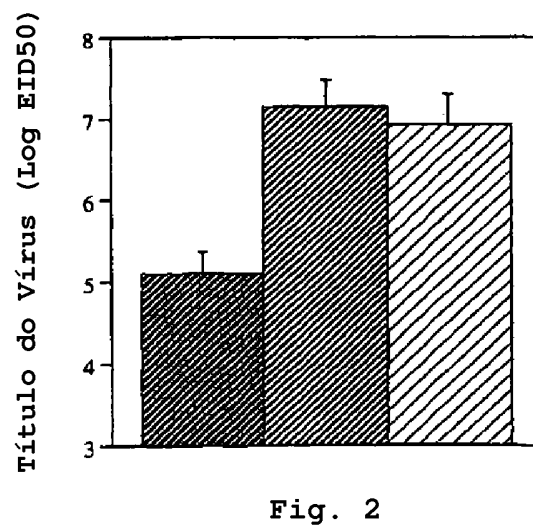
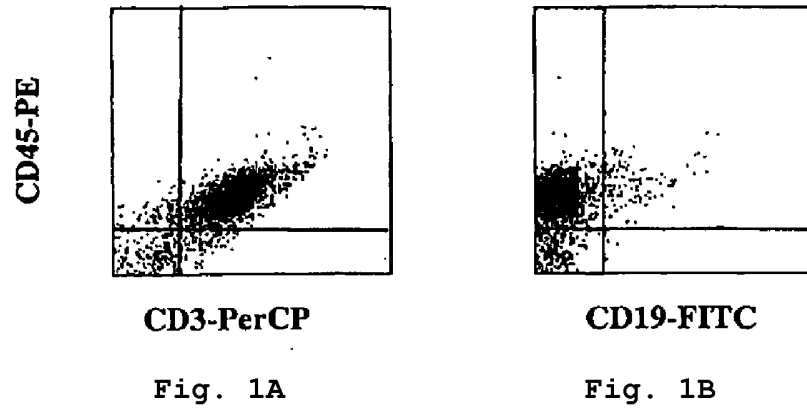
(iii) um epitopo (CTL) do linfócito citotóxico que é o epitopo da nucleoproteína NP335-350 de sequência: Ser-Ala-Ala-Phe-Glu-Asp-Leu-Arg-Val-Leu-Ser-Phe-Ile-Arg-Gly-Tyr; e

(iv) um epitopo CTL que é o epitopo da nucleoproteína NP380-393 de sequência: Glu-Leu-Arg-Ser-Arg-Tyr-Trp-Ala-Ile-Arg-Thr-Arg-Ser-Gly,

sendo os referidos epitopos do vírus influenza reactivos com células humanas.

2. Vacina da gripe baseada em péptidos sintéticos humanos de acordo com a reivindicação 1, para induzir uma resposta imunitária e conferir protecção contra o vírus influenza.

Lisboa, 3 de Agosto de 2012



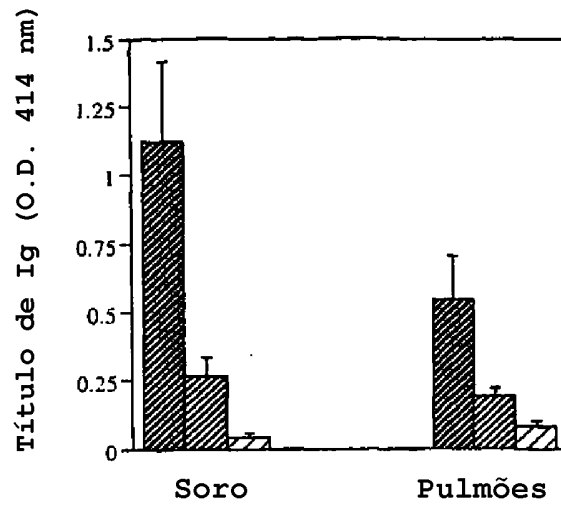


Fig. 3

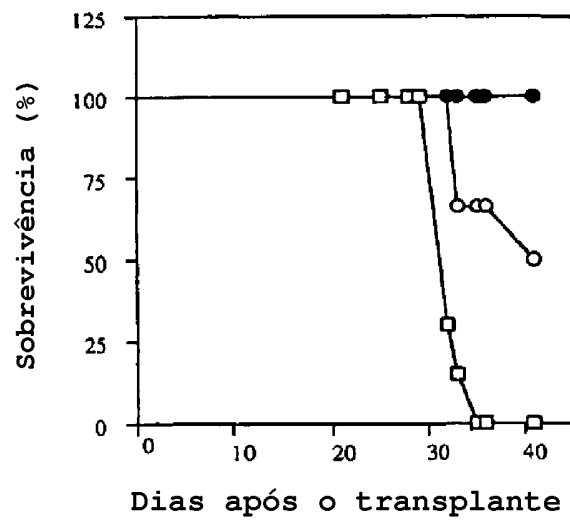


Fig. 4

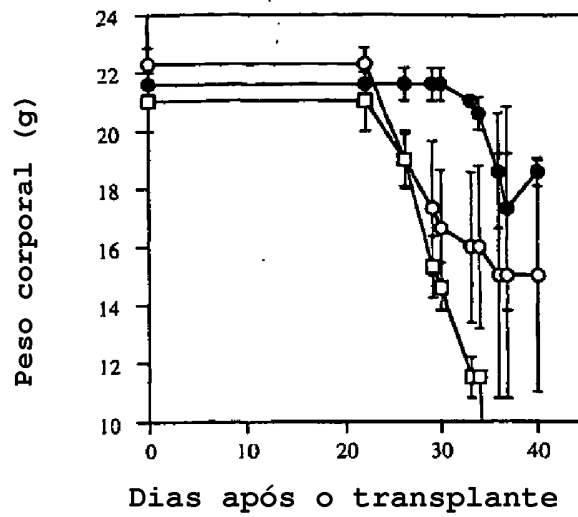


Fig. 5

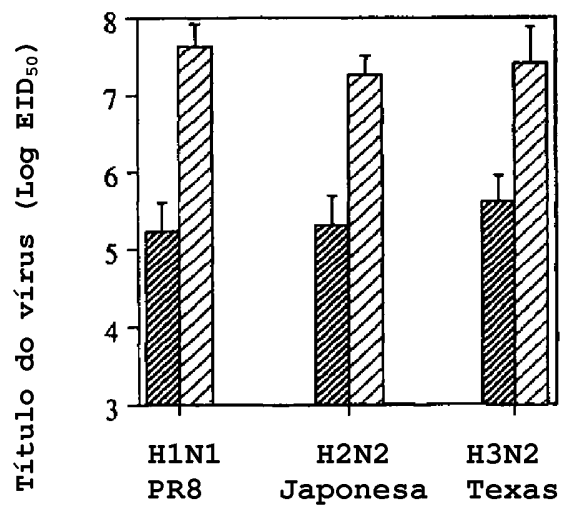


Fig. 6

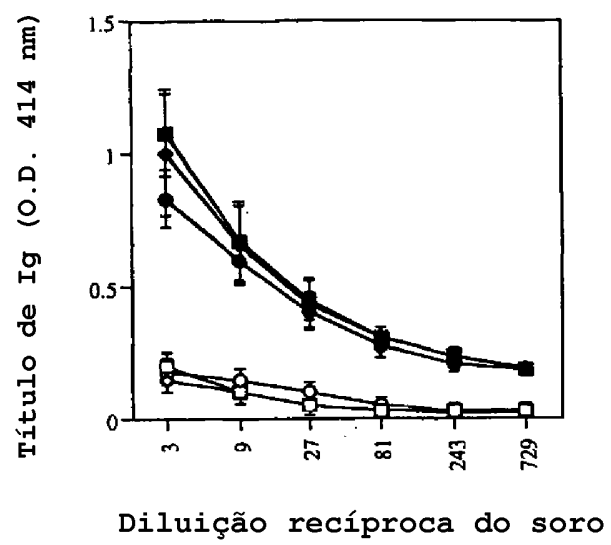


Fig. 7