

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

(22) Data de pedido: <b>2008.08.03</b>	(73) Titular(es): <b>BIONDVAX PHARMACEUTICALS LTD. WEIZMANN SCIENCE PARK 14 EINSTEIN STREET (4TH FLOOR) P.O. BOX 4143 74140 NESS-ZIONA</b>	IL
(30) Prioridade(s): <b>2007.08.02 US 953498 P</b>		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2010.04.14</b>		
(45) Data e BPI da concessão: <b>2015.03.25 147/2015</b>	(72) Inventor(es): <b>TAMAR BEN-YEDIDIA YOSSI SINGER</b>	IL IL
	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA</b>	PT

(54) Epígrafe: **VACINAS DE INFLUENZA MULTIEPITÓPICAS MULTIMÉRICAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A VACINAS MULTIEPITÓPICAS MULTIMÉRICAS BASEADAS EM PÉPTIDOS. EM PARTICULAR, A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE À UTILIZAÇÃO DE VACINAS MULTIEPITÓPICAS MULTIMÉRICAS BASEADAS EM PÉPTIDOS DEDUZINDO IMUNIDADE PROTETORA PARA INFLUENZA.

## RESUMO

### **"VACINAS DE INFLUENZA MULTIEPITÓPICAS MULTIMÉRICAS"**

A presente invenção refere-se a vacinas multiepitópicas multiméricas baseadas em péptidos. Em particular, a presente invenção refere-se à utilização de vacinas multiepitópicas multiméricas baseadas em péptidos deduzindo imunidade protetora para influenza.

## **DESCRIÇÃO**

### **"VACINAS DE INFLUENZA MULTIEPITÓPICAS MULTIMÉRICAS"**

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a vacinas multiepitópicas multiméricas baseadas em péptidos. Em particular, a presente invenção refere-se à utilização de vacina multiepitópica multimérica baseada em péptidos, deduzindo imunidade protetora para influenza.

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

##### Vacinas multiepitópicas

Sabe-se que epitopos de células B, epitopos de células T auxiliares e epitopos de linfócitos T citotóxicos desempenham, todos, um papel importante nestas duas respostas imunitárias. Obviamente, para vacinação eficaz, devem ser induzidas respostas humorais e celulares de largo espectro e de longa duração. Ainda não existem vacinas eficazes e de largo espectro contra vírus com elevadas taxas de mutação, tais como vírus influenza e vírus da imunodeficiência humana.

Existe uma relação estreita entre dose de antigénio e a eficiência da resposta específica de célula B. Estudos utilizando uma proteína veículo ligada quimicamente e sistema de péptido epitópico, consistindo da mesma quantidade de proteína

veículo ligada com quantidades variáveis de péptido epitópico, mostraram que a densidade epitópica afetava dramaticamente as respostas de IgG dependentes de células T auxiliares (Jegerlehner *et al.*, *Eur J Immunol.* 2002, 32:3305-14). Liu *et al.* (*Vaccine.* 2004 23(3):366-71.) observaram um efeito positivo da densidade epitópica na resposta humoral de murganhos e coelhos imunizados com proteínas de fusão de glutathione-S-transferase, contendo diversos números de cópias do epitopo peptídico M2e (1, 2, 4, 8 e 16 cópias) da proteína M2 do vírus influenza. No mesmo estudo, um ensaio de provocação letal mostrou que a proteína de fusão com as densidades epitópicas mais elevadas resultou em taxas de sobrevivência mais elevadas e perdas de peso mais lentas.

As vacinas multiepitópicas, nomeadamente vacinas compreendendo mais de um epitopo, foram desenvolvidas para uma ampla variedade de aplicações. Uma lista não exaustiva de exemplos inclui, *e. g.*, uma vacina multivalente recombinante para bactérias estreptocócicas, divulgada na Pat. US Nº 6063386; uma vacina para o tratamento da malária, a qual compreende uma única proteína compreendendo péptidos derivados de fases diferentes do ciclo de vida do parasita *Plasmodium falciparum*, divulgada na Pat. US Nº 6828416; composições imunogénicas antitumorais, compreendendo um polipéptido compreendendo epitopos antigénicos de células estaminais da próstata, divulgadas no Pedido de Pat. US 2007/0056315; e vacinas antivirais multiepitópicas contra VIH (Publicação Internacional WO 01/24810), vírus da rubéola (ver a Publicação Internacional WO 93/14206) e vírus da Hepatite C (Publicação Internacional WO 01/21189).

A Publicação Internacional WO 2006/069262 divulga composições, proteínas de fusão e polipéptidos compreendendo Padrões Moleculares Associados a Patogénios (PAMP) e epitopos de proteínas virais de influenza utilizados para estimular respostas imunitárias num indivíduo. Os PAMP são motivos moleculares (e. g., proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos) encontrados em microrganismos que podem provocar uma resposta imunitária inata num hospedeiro, *i. e.*, atuam como adjuvante. Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão incluem múltiplas cópias do epitopo de influenza M2e. A publicação internacional WO 2006/078657 divulga proteínas de fusão e polipéptidos semelhantes, compreendendo um ou mais PAMP e múltiplos epitopos de proteínas flavivirais.

### Influenza

A influenza é uma doença provocada por vírus de três subtipos principais, Influenza A, B e C, os quais são classificados de acordo com os seus determinantes antigénicos. O virião de influenza consiste de um único genoma de ARN de cadeia simples, estreitamente associado a uma nucleoproteína (NP) e encerrado por um envelope de lipoproteína revestido por proteína de matriz (M1) e transportando dois antigénios de glicoproteína de superfície principais, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). As glicoproteínas de HA e NA são muito suscetíveis a alteração; por exemplo, existem 16 classes imunes de HA e 9 classes de NA diferentes que proporcionam a base para os diferentes subtipos de vírus influenza, como H1N1 ou H3N2. O vírus influenza A tem uma glicoproteína transmembranar adicional, M2, a qual é altamente conservada entre os diferentes subtipos de HN. O gene de M2 codifica uma proteína tendo 96-97

aminoácidos que é expressa como um tetrâmero na superfície celular do virião. É composta por cerca de 24 aminoácidos extracelulares, cerca de 19 aminoácidos transmembranares e cerca de 54 resíduos citoplasmáticos (Lamb et al., *Cell*. 1985; 40:627-633.).

Os vírus influenza A e B são as causas mais comuns de influenza no homem. A influenza tem um enorme impacto na saúde pública, com graves implicações económicas além dos devastadores problemas de saúde, incluindo morbidade e até mortalidade. A infecção pode ser branda, moderada ou grave, variando entre infecção respiratória superior, assintomática, branda e traqueobronquite, até uma pneumonia viral grave, ocasionalmente letal. Os vírus influenza têm duas características imunológicas importantes que representam um desafio para a preparação vacinal. A primeira refere-se a alterações genéticas que ocorrem nas glicoproteínas de superfície, de tempos em tempos, referidas como "deriva antigénica". Esta alteração antigénica produz vírus que eludem a resistência deduzida pelas vacinas existentes. A segunda característica de grande preocupação de saúde pública é que os vírus influenza, em particular vírus influenza A, podem trocar material genético e fundir-se. Este processo, conhecido como "desvio antigénico", resulta em novas estirpes diferentes de ambos os vírus parentais, as quais podem ser estirpes pandémicas letais.

#### Antigénios de Vírus Influenza e Produção Vacinal

A imunização para o vírus influenza está limitada pela variação antigénica do vírus e pela restrição da infecção às membranas mucosas respiratórias. As vacinas de influenza

atualmente disponíveis são baseadas em vírus inativo intacto, em proteínas virais apresentadas na superfície de células bacterianas, ou em flagelina contendo determinantes antigênicos virais. O HA é um forte imunogênio e é o antigênio mais significativo na definição da especificidade serológica das diferentes estirpes de vírus.

A molécula de HA (75-80 kD) compreende uma pluralidade de determinantes antigênicos, vários dos quais são em regiões que sofrem alterações de sequência em diferentes estirpes (determinantes específicos de estirpe) e outros em regiões as quais são conservadas em muitas moléculas de HA (determinantes comuns). Devido a estas alterações, as vacinas da gripe necessitam de ser modificadas, pelo menos, de tempos em tempos anos.

Muitos antigênios de influenza e vacinas deles preparados, são conhecidos na técnica. A Patente US 4474757 divulga uma vacina contra infecções de vírus influenza, consistindo de um péptido sintético correspondendo a um fragmento antigênico de HA ligado a um veículo macromolecular adequado, tais como polímeros de aminoácidos ou toxoide tetânico.

A Publicação PCT Internacional WO 93/20846, para a requerente da presente invenção, ensina uma vacina recombinante sintética contra uma pluralidade de diferentes estirpes de vírus influenza, compreendendo, pelo menos, uma proteína recombinante compreendendo a sequência de aminoácidos de flagelina e, pelo menos, uma sequência de aminoácidos de um epitopo de vírus influenza HA ou NP, ou um agregado da referida proteína quimérica. Seguindo esta abordagem, verificou-se que uma vacina recombinante sintética anti-influenza baseada em três epitopos

era altamente eficiente em murganhos. As vacinas exemplificadas incluíam quimeras de flagelina, compreendendo o epitopo HA 91-108, um epitopo de célula B do HA, o qual é conservado em todas as estirpes de H3 e deduz anticorpos neutralizantes anti-influenza, juntamente com um ou ambos os epitopos de NP de auxiliar T ou CTL (NP 55-69 e NP 147-158, respetivamente), as quais induzem respostas imunitárias restringidas a MHC. Uma vacina compreendendo uma combinação das três quimeras acima mencionadas foi considerada como proporcionando a melhor proteção para a infeção viral.

A Patente US N° 6740325, para a requerente da presente invenção, ensina uma vacina de influenza baseada em péptido sintético humano, compreendendo, pelo menos, quatro epitopos de vírus influenza, os referidos epitopos de vírus influenza sendo reativos com células humanas, os referidos epitopos compreendendo:

(i) um epitopo de hemaglutinina de célula B (HA); (ii) um epitopo de hemaglutinina (HA) ou nucleoproteína (NP) de auxiliar T que se pode ligar a muitas moléculas de HLA; e (iii), pelo menos, dois epitopos de linfócito citotóxico (CTL), nucleoproteína (NP) ou proteína de matriz (M) que são restringidos às moléculas de HLA mais predominantes em diferentes populações humanas, em particular grupos étnicos ou raciais específicos. Os epitopos peptídicos de influenza podem ser expressos em flagelina de Salmonela recombinante. Essa vacina requer a preparação trabalhosa de, pelo menos, quatro polipéptidos quiméricos.

A Publicação PCT Internacional WO 2007/066334, para a requerente da presente invenção, divulga uma vacina capaz de



deduzir proteção de longo prazo e de estirpe cruzada, compreendendo uma pluralidade de proteínas quiméricas compreendendo, pelo menos, dois epitopos peptídicos de vírus influenza, em que, pelo menos, um epitopo é um epitopo peptídico de proteína de matriz M de vírus influenza A e o segundo epitopo é um epitopo peptídico de hemaglutinina HA. Também neste caso, os epitopos peptídicos de influenza podem ser expressos em flagelina de Salmonela recombinante.

Os mamíferos têm, frequentemente, respostas imunitárias adquiridas para antigénios flagelares. Contudo, dados clínicos mostraram que as doses eficazes de influenza de flagelina recombinante em animais têm efeitos adversos em indivíduos humanos, incluindo febre alta, provavelmente devido à elevada razão flagelina/antigénio. Também se suspeita que elevadas concentrações de flagelina tenham um efeito transiente no coração.

O documento WO 2006/128294 refere-se à produção de vacinas anti-vírus influenza proporcionando um cocktail de diferentes péptidos, todos derivados de Hemaglutinina (HA), para deduzir uma resposta imunitária humoral, *i. e.*, produção de anticorpos.

Caro-Aguilar I. *et al.*, *Microbes and Infection* 7 (2005), pp. 1324-1337, ensinam que uma vacina pode ser produzida proporcionando péptidos sintéticos derivados de estirpes de esporozoítos específicas e representando homo ou heteropolímeros de péptidos particulares, conhecidos por representarem epitopos de células B e T. Os péptidos individuais, a partir dos quais os homo/heteropolímeros devem ser produzidos, são ensinados a conterem um resíduo de cisteína na terminação amino e carboxilo que, por um lado, permite uma polimerização espontânea e,

obviamente, também aumenta a antigenicidade dos péptidos. Quando administrados aos animais de laboratório, juntamente com o adjuvante Montanida ISA 51, poderia ser obtida imunidade protetora.

O documento WO 2009/026465, um documento de acordo com o Art. 54(3) de EPC, pertence a uma composição compreendendo um multímero de um domínio extracelular de proteína de matriz de influenza (M2e). O M2e é apresentado ao sistema imunitário como uma exibição multimérica e é capaz da indução de uma resposta imunitária num indivíduo. A composição pode ser utilizada numa vacina contra influenza.

Existe, deste modo, uma necessidade não satisfeita para uma vacina baseada em epitopo peptídico de influenza, a qual pode induzir respostas humorais e celulares que são de longa duração, com especificidade alargada. Também existe uma necessidade para uma vacina com produção e processos de controlo de qualidade simplificados.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção proporciona vacinas de influenza que superam as desvantagens de vacinas contra influenza conhecidas, incluindo os efeitos adversos de elevada razão de veículo para antigénio e elevada razão de adjuvante para antigénio. A vacina da presente invenção compreende polipéptido compreendendo múltiplas cópias de pluralidade de epitopos peptídicos de vírus influenza, proporcionando vacina de multidiversidade, de elevada densidade, como definido nas reivindicações. De acordo com a presente invenção, o polipéptido multiepitópico multimérico pode

ser produzido recombinantemente, como um polipéptido isolado ou como uma proteína de fusão, ou sinteticamente pela ligação de uma pluralidade de péptidos sintéticos, ou pode ser misturado ou formulado com um adjuvante externo.

Os polipéptidos multiméricos da invenção contêm uma combinação de epitopos de células B de vírus influenza, epitopos de auxiliares T e epitopos de linfócitos citotóxicos (CTL). Os epitopos são, de um modo preferido, selecionados de péptidos de hemaglutinina (HA), péptidos de proteína de matriz (M1 e M2) e péptidos de nucleoproteína (NP). Os epitopos têm uma atividade de proteção cruzada demonstrável contra vários subtipos de influenza humanos e são escolhidos pela sua capacidade melhorada para induzirem uma resposta imunitária celular e humoral.

Foi, surpreendentemente, verificado que vários polipéptidos multiméricos de acordo com a invenção são ativos na dedução de uma resposta imunitária, mesmo sem estarem ligados ou sem fazerem parte de uma proteína veículo. Além disso, devido à elevada densidade e à variedade dos epitopos imunogénicos transportados pelo polipéptido, a vacina deduz uma forte resposta imunitária, mesmo sem a necessidade para um adjuvante. Além disso, a inclusão de um grande número de diferentes epitopos imunogénicos num único polipéptido facilita processos de produção e controlo de qualidade.

A invenção é como definida nas reivindicações anexas. No contexto desta invenção, um polipéptido "multimérico" é um polipéptido que contém uma pluralidade de repetições (pelo menos, duas, tipicamente, pelo menos, três ou mais), não necessariamente adjacentes, de uma extensão de aminoácidos do polipéptido. Por conseguinte, a expressão "multiepitópico

multimérico" refere-se a um polipéptido contendo uma pluralidade de repetições de uma pluralidade de epitopos.

Tabela 1: epitopos peptídicos de influenza E1 a E9

Epitopo	Tipo de Epitopo	Resíduos de proteína	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID Nº:
E1	célula B	HA 354-372	PAKLLKERGFFGAIAGFLE	82
E2	célula B	HA 91-108	SKAYSNCYPYDVPDYASL	48
E3	célula B & CTL	M1 2-12	SLLTEVETYVL	25
E4	célula B	HA 150-159	WLTGKNGLYP	52
E5	célula B	HA 143-149	WTGVTQN	51
E6	auxiliar T	NP 206-229	FWRGENGRKTRSAYERMC NILKGK	64
E7	auxiliar T	HA 307-319	PKYVKQNTLKLAT	59
E8	CTL	NP 335-350	SAAFEDLRVLSFIRGY	69
E9	CTL	NP 380-393	ELRSRYWAIRTRSG	70

Para melhorar a exposição dos epitopos ao sistema imunitário, os epitopos são, de um modo preferido, separados por um espaçador, o qual pode consistir num único aminoácido e pode compreender, pelo menos, um aminoácido ou ser um péptido. De um modo preferido, o espaçador consiste de 1-4 resíduos de aminoácido neutros.

São proporcionadas diversas configurações exemplificativas, compreendendo epitopos selecionados da Tabela 1, em que o número de repetições para cada epitopo é igual ou diferente e em que o polipéptido pode estar disposto numa estrutura polimérica sequencial alternante ou numa estrutura de copolímero em bloco.

A expressão estrutura "polimérica sequencial alternante" significa que uma única cópia de todos os epitopos contidos no polipéptido está disposta sequencialmente e esta disposição está repetida sequencialmente um número de vezes igual ao número de repetições. Por exemplo, se o polipéptido multiepitópico multimérico compreender quatro repetições de três epitopos  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  numa estrutura sequencial alternante, o polipéptido tem a seguinte estrutura polimérica:  $X_1X_2X_3-X_1X_2X_3-X_1X_2X_3-X_1X_2X_3$ , também escrita  $[X_1X_2X_3]_4$ . A expressão estrutura de "copolímero em bloco" significa que todas as cópias de um único epitopo contido no polipéptido estão dispostas de modo adjacente. Por exemplo, um polipéptido multiepitópico multimérico semelhante compreendendo quatro repetições de três epitopos  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  numa estrutura de copolímero em bloco tem a seguinte estrutura polimérica:  $X_1X_1X_1X_1-X_2X_2X_2X_2-X_3X_3X_3X_3$ , também escrita  $[A]_4-[B]_4-[C]_4$ .

Formas de realização adicionais da presente invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada dada a seguir. Contudo, deve ser compreendido que a descrição detalhada e exemplos específicos, embora indicando formas de realização preferidas da invenção, são dados apenas a título de ilustração.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

As **Figuras 1A e 1B** mostram um polipéptido multimérico compreendendo cinco repetições de nove epitopos peptídicos de influenza, dispostos numa estrutura polimérica sequencial alternante:  $(HA354-372---HA91-108---M1,2-12---HA150-159---HA143-149---NP206-229-HA307-319---NP335-350---NP380-393)_5$ . (A) a sequência nucleotídica (SEQ ID N°: 83) da construção utilizada para produzir um polipéptido

multimérico; (B) a sequência de aminoácidos (SEQ ID N°: 84) do polipéptido multimérico codificado pela sequência nucleotídica de A. Os epitopos na primeira sequência de nove epitopos estão sublinhados.

As **Figuras 2A e 2B** mostram um polipéptido multimérico compreendendo três repetições de nove epitopos peptídicos de influenza, dispostos numa estrutura de copolímero em bloco: (HA354-372)<sub>3</sub>---(HA91-108)<sub>3</sub>---(M12-12)<sub>3</sub>---(HA150-159)<sub>3</sub>---(HA 143-149)<sub>3</sub>---(NP206-229)<sub>3</sub>---(HA307-319)<sub>3</sub>---(NP335-350)<sub>3</sub>---(NP380-393)<sub>3</sub>. (A) Sequência nucleotídica (SEQ ID N°: 85) da construção utilizada para produzir o polipéptido. (B) Sequência de aminoácidos (SEQ ID N°: 86) do polipéptido multimérico. As três repetições do primeiro epitopo estão sublinhadas.

As **Figuras 3A e 3B** mostram um polipéptido multimérico compreendendo três repetições de nove epitopos peptídicos de influenza, dispostos numa estrutura polimérica sequencial alternante: (HA354-372---HA91-108---M1,2-12---HA150-159---HA143-149---NP206-229---HA307-319---NP335-350---NP380-393)<sub>3</sub>. (A) Sequência nucleotídica (SEQ ID N°: 87) da construção utilizada para produzir o polipéptido. (B) Sequência de aminoácidos (SEQ ID N°: 88) do polipéptido multimérico. Os epitopos na primeira sequência de nove epitopos estão sublinhados.

A **Figura 4** mostra a resposta imunitária celular a várias estirpes de vírus influenza de murganhos vacinados com duas vacinas multiméricas: N° 11 e N° 14. A resposta imunitária celular a duas concentrações diferentes de um vírus de estimulação foi medida e é mostrada como o índice de

proliferação para linfócitos incubados com um vírus de estimulação.

A **Figura 5** mostra o efeito protetor da vacina N° 14 multimérica contra uma dose altamente letal de uma estirpe H3N2 de vírus influenza adaptada de murganho (A/Texas/1/77). O efeito protetor da vacina é demonstrado por uma redução significativa no título de vírus nos pulmões de murganhos vacinados, em comparação com murganhos de controlo (PBS).

As **Figuras 6A e 6B** mostram a eficácia de várias vacinas multiméricas na proteção de murganhos de uma provocação viral. O efeito protetor da vacina N° 11, N° 12 e N° 14 multimérico é demonstrado por uma taxa de sobrevivência mais elevada (fig. 6A) de murganhos vacinados, em comparação com murganhos de controlo (PBS), após infeção com uma dose letal de uma estirpe H3N2 de vírus influenza adaptada de murganho (A/Texas/1/77) e por uma carga viral significativamente inferior nos pulmões (fig. 6B) de murganhos vacinados, em comparação com murganhos de controlo (50% Gly/PBS).

A **Figura 7** compara a eficácia de imunização de murganhos com várias vacinas compreendendo construções multiméricas em 50% de Glicerol em PBS (N° 11, N° 12 e N° 14) ou em emulsão com adjuvante Incompleto de Freund (N° 11-IFA, N° 12-IFA e N° 14-IFA). O efeito protetor das diferentes vacinas e o efeito do IFA são medidos pela taxa de sobrevivência de murganhos vacinados, em comparação com murganhos de controlo, após provocação com a estirpe H3N2 de vírus influenza adaptada de murganho (A/Texas/1/77).

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona polipéptidos multiepitópicos multiméricos e vacinas baseadas nestes polipéptidos, compreendendo uma pluralidade de epitopos peptídicos de vírus influenza, como definido pelas reivindicações. A presente invenção também proporciona vacinas baseadas nesses polipéptidos e suas utilizações.

Os epitopos peptídicos derivados de proteínas de influenza são úteis na preparação de vacinas contra influenza. Contudo, cada péptido isoladamente é quase invisível ao sistema imunitário, é degradado rapidamente e provoca uma resposta imunitária insuficiente. Quando múltiplas cópias de péptidos imunogênicos são apresentadas ao sistema imunitário como único polipéptido, a magnitude da resposta imunitária específica de epitopo é melhorada. Por exemplo, as vacinas baseadas numa proteína de fusão de flagelina recombinante contendo uma única cópia de um epitopo peptídico de influenza proporcionam uma razão epitopo/flagelina de, aproximadamente, 1:28. Pela utilização de vacinas multiepitópicas, contendo uma pluralidade de epitopos em várias cópias cada, pode ser obtida uma razão epitopo/flagelina de até 2:1. A presente invenção divulga polipéptidos multiepitópicos multiméricos com imunogenicidade melhorada, em comparação com as construções e configurações conhecidas. Os polipéptidos contêm, cada, uma pluralidade de epitopos, em que cada epitopo está repetido em múltiplas cópias. As múltiplas cópias ou repetições de cada epitopo podem ser contíguas como um bloco de cada epitopo. Alternativamente, a pluralidade de epitopos pode aparecer numa sequência



predeterminada, onde esta sequência está repetida um número de vezes no polipéptido. Mostra-se, agora, que ambos estes tipos de configurações dos múltiplos epitopos têm resultados inesperadamente superiores na concessão de imunidade contra influenza num indivíduo.

### Definições

Por razões de conveniência, são aqui descritos determinados termos empregues na descrição, exemplos e reivindicações.

A expressão "apresentação de antigénio" significa a expressão de antigénio na superfície de uma célula em associação com moléculas de classe I ou classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I ou MHC-II) de animais ou com os HLA-I e HLA-II de humanos.

O termo "imunogenicidade" ou "imunogénico" refere-se à capacidade de uma substância estimular ou deduzir uma resposta imunitária. A imunogenicidade é medida, por exemplo, pela determinação da presença de anticorpos específicos para a substância. A presença de anticorpos é detetada por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, utilizando um ensaio de ELISA.

Dependendo do tipo de resposta imunitária que deduzem, os epitopos de influenza podem ser classificados como tipo célula B, tipo célula T ou tipo célula B e célula T. A definição de epitopo peptídico de célula B ou célula T não é inequívoca; por exemplo, um epitopo peptídico pode induzir produção de anticorpo mas, ao mesmo tempo, esse epitopo pode possuir uma sequência que

possibilita ligação à molécula de HLA humana, tornando-a acessível a CTL, por este motivo, uma classificação de célula B ou célula T dupla para esse epítipo particular. "CTL", "células T assassinas" ou "células T citotóxicas" é um grupo de células T diferenciadas que reconhecem e lisam células alvo contendo um antígeno estranho específico que funciona na defesa contra infecção viral e células cancerígenas. "Célula T auxiliar" ou "Th" é qualquer das células T que, quando estimuladas por um antígeno específico, libertam citocinas que promovem a ativação e função de células B e células T assassinas.

A expressão "proteína de fusão de flagelina recombinante" refere-se a um polipéptido de flagelina compreendendo um epítipo peptídico ou um polipéptido multiepitópico multimérico embutido na sua sequência ou, alternativamente, a uma porção de um polipéptido de flagelina fundida a um epítipo peptídico ou um polipéptido multiepitópico multimérico em qualquer da sua terminação N ou C.

"Sequência de aminoácidos", como aqui utilizado, refere-se a uma sequência de oligopéptido, péptido, polipéptido ou proteína e seu fragmento e a moléculas de ocorrência natural ou sintéticas.

Na descrição e nas reivindicações, o termo "espaçador" denota qualquer composto químico, o qual pode estar presente na sequência polipeptídica, numa das extremidades ou entre dois epítipos. De um modo preferido, o espaçador consiste de 1-4 resíduos de aminoácidos. O espaçador pode compreender uma sequência que pode ser clivada por meios enzimáticos ou pode decompor-se espontaneamente. O espaçador pode forçar ou induzir conformação benéfica ao polipéptido. O espaçador pode,

opcionalmente, compreender uma sequência clivável específica de protease.

### Epitopos Peptídicos Úteis na Preparação de uma Vacina

Os epitopos peptídicos são derivados de proteínas de influenza selecionadas do grupo consistindo de HA, M1, M2 e NP. Os epitopos também podem ser selecionados de acordo com o seu tipo: tipo célula B, tipo Th e tipo CTL.

Deve ser notado que os epitopos peptídicos aqui listados são proporcionados apenas com fins exemplificativos. As proteínas de vírus influenza variam entre isolados proporcionando, desse modo, múltiplas sequências variantes para cada proteína de influenza. Conseqüentemente, a presente divulgação abrange epitopos peptídicos tendo uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos.

A proteína de matriz M1 é um componente estrutural principal das partículas de vírus influenza e forma uma camada interna do envelope derivado de célula lipídica. No virião e em células infectadas em fases tardias da replicação viral, a proteína M1 associa-se com as ribonucleoproteínas virais (vRNP), as quais são compostas por moléculas de ARN viral, múltiplas cópias das nucleoproteínas e as três subunidades da polimerase viral, mantendo as extremidades dos ARN virais. O domínio N-terminal de M1 refere-se aos aminoácidos 1 a cerca do aminoácido 20 da proteína M1.

A proteína de matriz M2 é um canal de ião de hidrogénio, resultando em dissociação do complexo de matriz e nucleoproteína

nos vacúolos. Este canal iônico liberta o genoma, possibilitando a entrada de ARN viral no núcleo da célula infetada e o início da replicação viral. As substâncias terapêuticas contra influenza, tais como amantadina e rimantadina, atuam pelo bloqueio da atividade de M2. O influenza B tem uma proteína equivalente, conhecida como NB; embora não exista semelhança de sequência entre M2 e NB, são ambas proteínas transmembranares e podem partilhar função semelhante. O domínio extracelular da proteína M2, a qual é uma proteína transmembranar do vírus influenza A, é quase invariante em todas as estirpes de influenza A. O domínio N-terminal de M2 refere-se à sequência de aminoácidos N-terminal em relação ao domínio transmembranar.

A Tabela 2 proporciona uma lista exemplificativa dos epitopos peptídicos de M1 e M2 que podem ser utilizados para preparação dos polipéptidos multiméricos.

Tabela 2. Epitopos peptídicos de M1 e M2

Tipo de Epitopo	Resíduos de proteína	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID Nº:
	M2 6-9	EVET	1
Th	M21-15	MSLLTEVETHTRNGW	2
	M2 10-18	PIRNEWGCR	3
	M2 8-15	ETPIRNEWGC	4
M2 10-20	M2 10-20	PIRNEWGCRCN	5
CTL	M2 3-11	LLTEVETPI	6
CTL	M2 2-10	SLLTEVETP	7

(continuação)

Tipo de Epitopo	Resíduos de proteína	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID Nº:
CTL	M2 2-11	SLLTEVETPI	8
CTL	M2 4-11	LTEVETPLT	9
Th	M2 1-15	MSLLTEVETPIRNEW	10
Th	M2 1-18	MSLLTEVETPIRNEWGCR	11
Th	M2 1-15	MSLLTEVETLTKNGW	12
Th	M21-15	MSLLTEVETLTRNGW	13
CTL	M2 4-12	LTEVETPIR	14
CTL	M2 4-13	LTEVETPIRN	15
CTL	M2 6-14	EVETPIRNE	16
CTL	M2 6-15	EVETPIRNEW	17
CTL	M2 4-14	LTEVETPIRNE	18
Th	M2 4-18	LTEVETPIRNEWGCR	19
Célula B	M2 6-13	EVETPIRN	20
Célula B	M2 1-18	MSLLTEVETPTRNEWECR	21
Célula B	M2 2-24	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD	22
Célula B	M2 2-24	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	23
Célula B	M2 7-15	VETPIRNEW	24
Célula B	M1 2-12	SLLTEVETYVL	25
CTL	M1 2-12	SLLTEVETYVP	26
CTL	M1 3-11	LLTEVETYV	27
CTL	M1 13-21	SIVPSGPL	28
CTL	M1 17-31	SGPLKAEIAQRLEDV	29
CTL	M1 18-29	GPLKAEIAQRLE	30

(continuação)

Tipo de Epitopo	Resíduos de proteína	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID Nº:
CTL	M1 27-35	RLEDVFAGK	31
CTL	M1 41-51	ALMEWLKTRPI	32
CTL	M1 50-59	PILSPLTKGI	33
CTL	M1 51-59	ILSPLTKGI	34
CTL	M1 55-73	LTKGILGFVFTLTVPSERG	35
CTL	M1 56-68	TKGILGFVFTLTV	36
TL	M1 57-68	KGILGFVFTLTV	37
CTL	M1 58-66	GILGFVFTL	38
CTL	M1 60-68	LGFVFTLTV	39
CTL	M1 59-67	ILGFVFTLT	40
TL	M1 128-135	ASCMGLIY	41
CTL	M1 134-142	RMGAVTTEV	42
CTL	M1 145-155	GLVCATCEQIA	43
CTL	M1 164-172	QMVATTNPL	44
CTL	M1 164-173	QMVATTNPLI	45
CTL	M1 178-187	RMVLASTTAK	46
CTL	M1 232-240	DLLENLQTY	47

A nucleoproteína (NP) é um dos grupos de antígenos específicos, o qual distingue entre vírus influenza A, B e C. Em contraste com HA, o NP é altamente conservado, sendo 94% conservado em todos os vírus influenza A. O anticorpo específico de NP de vírus influenza A não tem atividade neutralizante de vírus mas a NP é um alvo importante para linfócitos citotóxicos

T (CTL), os quais têm reatividade cruzada com todos os vírus de tipo A (Townsend, *J Exp Med* 1984 160(2):552-63). Os CTL reconhecem curtos péptidos sintéticos correspondendo a regiões lineares da molécula de NP de influenza.

A hemaglutinina (HA) é um trímero de glicoproteína embutido no envelope de influenza. É responsável pela ligação e penetração do vírus na célula hospedeira. Os anticorpos para HA neutralizam a infeciosidade viral. As variações antigénicas desta molécula são responsáveis por surtos frequentes de influenza e pelo fraco controlo de infeção pela imunização (Ada e Jones, *Curr Top Microbial Immunol* 1986;128:1-54).

A ARN polimerase de vírus influenza é um heterocomplexo composto pelas três proteínas PB1, PB2 e PA de polimerase (P), presentes numa razão 1:1:1. O seu papel na virulência de influenza não foi totalmente elucidado. Os exemplos não limitativos dos epitopos peptídicos de HA, NP, PB1 e PB2 são listados na tabela 3.

Tabela 3: Epitopos peptídicos de HA, NP, PB.

Tipo de Epitopo	Resíduos de proteína	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID N°:
Célula B	HA 91-108	SKAYSNCYPYDVPDYASL	48
Célula B	HA 91-108	SKAFSNCYPYDVPDYASL	49
Célula B	HA 107-124	STAYSNCYPYDVPDYASL	50
Célula B	HA 143-149	WTGVTQN	51
Célula B	HA 150-159	WLTGKNGLYP	52

(continuação)

Tipo de Epitopo	Resíduos de proteína	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID Nº:
Célula B	HA 166-175	WLTEKEGSYP	53
Th	HA 306-324	PKYVKQNTLKLATGMRNVP	54
CTL	HA 521-531	GVKLESMGIYQ	55
CTL	HA 518-528	EISGVKLESMG	56
CTL	HA 458-467	NVKNLYEKVK	57
Th	HA 128-145	KVKILPKDRWTQH TTGG	58
Th	HA 307-319	PKYVKQNTLKLAT	59
Th	NP 91-99	KTGGPIYRR	60
CTL	NP 44-52	CTELKLSDY	61
CTL	NP 82-95	HPSAGKDPKKTGGP	62
CTL	NP 82-94	HPSAGKDPKKTGG	63
Th	NP 206-229	FWRGENGRKTRSAYERMCNILK GK	64
CTL	NP 265-273	ILRGsvahk	65
CTL	NP 305-313	KLLQNSQVY	66
CTL	NP 335-349	SAAFEDLRVLSFIRG	67
CTL	NP 335-350	SAAFEDLRVSSFIRGT	68
CTL	NP 335-350	SAAFEDLRVLSFIRGY	69
CTL	NP 380-393	ELRSRYWAIRTRSG	70
CTL	NP 380-388	ELRSRYWAI	71
CTL	NP 383-391	SRYWAIRTR	72
CTL	NP 384-394	YWAIRTRSGG	73
CTL	NP 382-390	SRYWAIRTR	74
CTL	NP 418-426	LPFDKPTIM	75



(continuação)

Tipo de Epitopo	Resíduos de proteína	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID Nº:
CTL	PB1 591-599	VSDGGPNLY	76
CTL	PB1 571-579	RRSFELKKL	77
CTL	PB2 368-376	RRATAILRK	78
CTL (flu B)	NP 30-38	RPIIRPATL	79
CTL (flu B)	NP 263-271	ADRGLLRDI	80
Th (flu B)	HA 308-320	PYYTGEHAKAIGN	81
B (flu B)	HA 354-372	PAKLLKERGFFGAIAGFLE	82

#### Moléculas Quiméricas ou Recombinantes

Uma "proteína quimérica", "polipéptido quimérico" ou "proteína recombinante" são utilizados com o mesmo significado e referem-se a um polipéptido multimérico de influenza ligado operativamente a um polipéptido que não o polipéptido a partir do qual o epitopo peptídico foi derivado. Os polipéptidos multiepitópicos multiméricos podem ser preparados por expressão num vetor de expressão *per se* ou como uma proteína quimérica. Os métodos para produzir uma proteína quimérica ou recombinante, compreendendo um ou mais epitopos peptídicos de influenza, são conhecidos pelos especialistas na técnica. Uma sequência de ácido nucleico codificando um ou mais epitopos peptídicos de influenza pode ser inserida num vetor de expressão para preparação de uma construção polinucleotídica para propagação e expressão em células hospedeiras. Uma construção de ácido nucleico codificando um polipéptido compreendendo múltiplas repetições de vários epitopos, tal como um polipéptido

multiepitópico multimérico, pode ser preparada pela ligação de construções polinucleotídicas mais pequenas contendo sítios de restrição apropriados nas suas extremidades 3' e 5'.

Num exemplo não limitativo, o polipéptido quimérico pode incluir quimeras de um epitopo peptídico de influenza com um dos seguintes polipéptidos: flagelina, toxina da Cólera, toxina do Tétano, Ovalbumina, proteína do choque térmico da Tuberculose, Toxoide Diftérico, Proteína G do vírus sincicial respiratório, Proteína de Membrana Externa de *Neisseria meningitides*, nucleoproteína do vírus da estomatite vesicular, glicoproteína do vírus da estomatite vesicular, Proteína Rica em Glutamato de Antígeno de *Plasmodium falciparum*, Proteína 3 de Superfície de Merozoíto ou proteína de envelope dos Vírus.

A expressão "vetor de expressão" e "vetor de expressão recombinante", como aqui utilizada, refere-se a uma molécula de ADN, por exemplo, um plasmídeo, flagelina ou vírus, contendo sequências de ácido nucleico, desejadas e apropriadas, necessárias para a expressão dos epitopos peptídicos recombinantes para expressão numa célula hospedeira particular. Como aqui utilizado "ligado de um modo operativo" refere-se a uma ligação funcional de, pelo menos, duas sequências. Ligado de um modo operativo inclui ligação entre um promotor e uma segunda sequência, por exemplo, um ácido nucleico da presente invenção, em que a sequência promotora inicia e medeia a transcrição da sequência de ADN correspondendo à segunda sequência.

As regiões regulatórias necessárias para transcrição dos epitopos peptídicos podem ser proporcionadas pelo vetor de expressão. A natureza precisa das regiões regulatórias necessárias para expressão génica pode variar entre vetores e

células hospedeiras. Em geral, é requerido um promotor, o qual é capaz de se ligar a ARN polimerase e promover a transcrição de uma sequência de ácido nucleico associada de um modo operativo. As regiões regulatórias podem incluir aquelas sequências não codificantes em 5' envolvidas com a iniciação da transcrição e tradução, tais como a caixa TATA, sequência de encapsulação, sequência CAAT e semelhantes. A região não codificante, 3' em relação à sequência codificante, pode conter sequências regulatórias de terminação de transcrição, tais como terminadores e sítios de poliadenilação. Um codão de iniciação de tradução (ATG) também pode ser proporcionado.

De modo a clonar as sequências de ácido nucleico no sítio de clonagem de um vetor, são adicionados ligantes ou adaptadores proporcionando os sítios de restrição compatíveis apropriados durante a síntese dos ácidos nucleicos. Por exemplo, um sítio de enzima de restrição desejado pode ser introduzido num fragmento de ADN por amplificação do ADN por utilização de PCR com iniciadores contendo o sítio de enzima de restrição desejado.

Uma construção de expressão compreendendo uma sequência de epitopo peptídico, associada de modo operativo a regiões regulatórias, pode ser diretamente introduzida em células hospedeiras apropriadas para expressão e produção do polipéptido multiepitópico multimérico *per se* ou como proteínas de fusão recombinantes. Os vetores de expressão que podem ser utilizados incluem mas não estão limitados a plasmídeos, cosmídeos, fago, fagemídeos, flagelina ou vírus modificados. Tipicamente, esses vetores de expressão compreendem uma origem de replicação funcional para propagação do vetor numa célula hospedeira apropriada, um ou mais sítios de endonuclease de restrição para

inserção da sequência génica desejada e um ou mais marcadores de seleção.

A construção polinucleotídica recombinante compreendendo o vetor de expressão e um polipéptido multimérico deve ser, depois, transferida para uma célula hospedeira bacteriana, onde se pode replicar e ser expressa. Isto pode ser alcançado por métodos conhecidos na técnica. O vetor de expressão é utilizado com uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica compatível, a qual pode ser derivada de bactérias, levedura, insetos, mamíferos e humanos.

De acordo com um exemplo não limitativo, o vetor de expressão é um vetor de flagelina, por exemplo, como divulgado no documento US 6130082. O vetor plasmídico pode conter o gene *fliC* de flagelina com sítios de restrição únicos, em que o polipéptido multimérico está inserido na região hipervariável da flagelina e a proteína de fusão de flagelina recombinante contendo o polipéptido multiepitópico é expressa em *Salmonella* ou *E. Coli* mutante deficiente em flagelos. As células hospedeiras que expressam a proteína de fusão de flagelina recombinante podem ser formuladas como vacinas vivas.

#### Produção do Polipéptido Multimérico

Uma vez expresso pela célula hospedeira, o polipéptido multimérico pode ser separado de componentes não desejados por vários métodos de purificação de proteína. Um desses métodos utiliza uma cauda de poli-histidina na proteína recombinante. Uma cauda de poli-histidina consiste em, pelo menos, seis resíduos de histidina (His) adicionados a uma proteína

recombinante, frequentemente, na terminação N ou C. As caudas de poli-histidina são, frequentemente, utilizadas para purificação de afinidade de proteínas recombinantes marcadas com poli-histidina que são expressas em *E. coli* ou outros sistemas de expressão procarióticos. As células bacterianas são recolhidas por centrifugação e o sedimento celular resultante pode ser lisado por meios físicos ou com detergentes ou enzimas, tal como lisozima. O lisado em bruto contém, nesta fase, a proteína recombinante entre várias outras proteínas derivadas das bactérias e são incubadas com meios de afinidade, tais como NTA-agarose, resina HisPur ou resina Talon. Estes meios de afinidade contêm iões metálicos ligados, níquel ou cobalto, aos quais a cauda de poli-histidina se liga com afinidade micromolar. A resina é, depois, lavada com tampão de fosfatos para remover proteínas que não interagem especificamente com o ião de cobalto ou níquel. A eficiência de lavagem pode ser melhorada pela adição de imidazole a 20 mM e as proteínas são, depois, habitualmente eluídas com imidazole a 150-300 mM. A cauda de poli-histidina pode ser, subsequentemente, removida utilizando enzimas de restrição, endoproteases ou exoproteases. Os kits para a purificação de proteínas marcadas com histidina podem ser adquiridos, por exemplo, a partir da Qiagen.

Outro método é através da produção de corpos de inclusão, os quais são agregados inativos de proteína que se podem formar quando um polipéptido recombinante é expresso num procariota. Embora o ADNc possa codificar devidamente para um ARNm traduzível, a proteína que resulta pode não se enrolar corretamente, ou a hidrofobicidade dos epitopos peptídicos adicionados pode fazer com que o polipéptido recombinante se torne insolúvel. Os corpos de inclusão são facilmente purificados por métodos bem conhecidos na técnica. Diversos

processos para a purificação de corpos de inclusão são conhecidos na técnica. Os corpos de inclusão podem ser recuperados de lisados bacterianos por centrifugação e são lavados com detergentes e agentes quelantes, para remover tanta proteína bacteriana como possível da proteína recombinante agregada. Para se obter proteína solúvel, os corpos de inclusão lavados são dissolvidos em agentes desnaturantes e a proteína libertada é, depois, reenrolada por remoção gradual dos reagentes desnaturantes por diluição ou diálise (como descrito, por exemplo, em *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3ª edição, Sambrook, J. e Russell, D. W., 2001; CSHL Press).

Alternativamente, a proteína de fusão de flagelina recombinante retém a capacidade para formar flagelos intactos. Diversos processos para a purificação dos flagelos intactos são conhecidos na técnica. As moléculas de flagelina recombinantes podem ser expressas por uma estirpe parental, deficiente em flagelina, não móvel, de bactérias que produzem flagelos funcionais.

#### Formulação Vacinal

As vacinas da presente invenção compreendem um polipéptido multiepitópico e, opcionalmente, um adjuvante. A vacina pode ser formulada para administração num de muitos modos diferentes. De acordo com uma forma de realização da divulgação, a vacina é administrada intranasalmente. A formulação vacinal pode ser aplicada no tecido linfático do nariz, em qualquer modo conveniente. Contudo, prefere-se aplicá-la como uma corrente de líquido ou gotículas de líquido nas paredes da passagem nasal. A composição intranasal pode ser formulada, por exemplo, na forma

líquida como gotas nasais, spray ou adequada para inalação, como pó, como creme ou como emulsão. A composição pode conter uma variedade de aditivos, tais como adjuvante, excipiente, estabilizantes, tampões ou conservantes.

Para aplicação direta, a composição vacinal é, de um modo preferido, proporcionada num recipiente apropriado para distribuição do polipéptido ou proteína de fusão recombinante na forma de gotas nasais ou um aerossol. Em determinadas formas de realização preferidas, a vacina é formulada para distribuição mucosal, em particular, distribuição nasal (Arnon *et al.*, *Biologicals*. 2001; 29(3-4):237-42; Ben-Yedidia *et al.*, *Int Immunol*. 1999; 11(7):1043-51).

Noutra forma de realização da divulgação, a administração é oral e a vacina pode ser apresentada, por exemplo, na forma de um comprimido ou encerrada numa cápsula de gelatina ou uma microcápsula.

Ainda noutra forma de realização, a vacina é formulada para administração parentérica. Em algumas formas de realização, a vacina é formulada para inoculação de massa, por exemplo, para utilização com um injetor a jato ou um cartucho de utilização única. De acordo com ainda outra forma de realização, a administração é intramuscular.

De acordo com ainda outra forma de realização, a administração é intradérmica. Agulhas especificamente concebidas para depositar a vacina intradermicamente são conhecidas na técnica, como divulgadas, por exemplo, entre outros, nos documentos 6843781 e 7250036. De acordo com outras formas de

realização, a administração é realizada com um injetor sem agulhas.

Para os especialistas na técnica, a formulação destas modalidades é conhecimento geral.

Os lipossomas proporcionam outro sistema de distribuição para a distribuição e apresentação de antigénio. Os lipossomas são vesículas de bicamadas compostas por fosfolípidos e outros esteróis circundando um centro tipicamente aquoso, onde antigénios ou outros produtos podem ser encapsulados. A estrutura de lipossoma é altamente versátil, com muitos tipos variando em tamanhos de nanómetro a micrómetro, de cerca de 25 nm a cerca de 500 µm. Verificou-se que os lipossomas são eficazes na distribuição de agentes terapêuticos a superfícies dérmicas e mucosais. Os lipossomas podem ser ainda modificados para distribuição direcionada, por exemplo, pela incorporação de anticorpos específicos na membrana de superfície, ou alterados para encapsular bactérias, vírus ou parasitas. O tempo de sobrevivência média ou semi-vida da estrutura intacta de lipossoma pode ser prolongado com a inclusão de determinados polímeros, por exemplo, polietilenoglicol, permitindo a libertação prolongada *in vivo*. Os lipossomas podem ser unilamelares ou multilamelares.

A composição vacinal pode ser formulada por: encapsulação de um antigénio ou um complexo de antigénio/adjuvante em lipossomas, para formar antigénio encapsulado em lipossoma e mistura do antigénio encapsulado em lipossoma com um veículo compreendendo uma fase contínua de uma substância hidrófoba. Se um complexo de antigénio/adjuvante não for utilizado na primeira etapa, um adjuvante adequado pode ser adicionado ao antigénio



encapsulado em lipossoma, à mistura de antigénio encapsulado em lipossoma e veículo ou ao veículo, antes de o veículo ser misturado com o antigénio encapsulado em lipossoma. A ordem do processo pode depender do tipo de adjuvante utilizado. Tipicamente, quando é utilizado um adjuvante, como alúmen, o adjuvante e o antigénio são primeiro misturados, para formar um complexo de antigénio/adjuvante, seguido de encapsulação do complexo de antigénio/adjuvante com lipossomas. O antigénio encapsulado em lipossoma resultante é, depois, misturado com o veículo. Dependendo do contexto, a expressão "antigénio encapsulado em lipossoma" pode referir-se à encapsulação do antigénio isoladamente ou à encapsulação do complexo de antigénio/adjuvante. Isto promove contacto íntimo entre o adjuvante e o antigénio e pode, pelo menos em parte, contribuir para a resposta imunitária quando é utilizado alúmen como o adjuvante. Quando é utilizado outro, o antigénio pode ser primeiro encapsulado em lipossomas e o antigénio encapsulado em lipossoma resultante é, depois, misturado no adjuvante numa substância hidrófoba.

Na formulação de uma composição vacinal que é substancialmente isenta de água, o antigénio ou complexo de antigénio/adjuvante é encapsulado com lipossomas e misturado com uma substância hidrófoba. Na formulação de uma vacina numa emulsão de água-em-uma substância hidrófoba, o antigénio ou complexo de antigénio/adjuvante é encapsulado com lipossomas num meio aquoso, seguido da mistura do meio aquoso com uma substância hidrófoba. No caso da emulsão, para manter a substância hidrófoba na fase contínua, o meio aquoso contendo os lipossomas pode ser adicionado em alíquotas, com mistura, à substância hidrófoba.

Em todos os métodos de formulação, antes de ser misturado com a substância hidrófoba ou com o meio aquoso, consoante o caso, o antigénio encapsulado em lipossoma pode ser liofilizado. Em alguns casos, um complexo de antigénio/adjuvante pode ser encapsulado por lipossomas, seguido de liofilização. Noutros casos, o antigénio pode ser encapsulado por lipossomas, seguido pela adição de adjuvante, depois, liofilização, para formar um antigénio encapsulado em lipossoma liofilizado com adjuvante externo. Ainda noutro caso, o antigénio pode ser encapsulado por lipossomas, seguido de liofilização, antes da adição de adjuvante. A liofilização pode promover melhor interação entre o adjuvante e o antigénio, resultando numa vacina mais eficaz.

A formulação do antigénio encapsulado em lipossoma numa substância hidrófoba também pode envolver a utilização de um emulsionante, para promover a distribuição mais uniforme dos lipossomas na substância hidrófoba. Os emulsionantes típicos são bem conhecidos na técnica e incluem oleato de manida (Arlacel™ A), lecitina, Tween™ 80, Spans™ 20, 80, 83 e 85. O emulsionante é utilizado numa quantidade eficaz para promover a distribuição uniforme dos lipossomas. Tipicamente, a razão de volume (v/v) de substância hidrófoba para emulsionante é na gama de cerca de 5:1 a cerca de 15:1.

As micropartículas e nanopartículas empregam pequenas esferas biodegradáveis, as quais atuam como depósitos para distribuição vacinal. A principal vantagem que as microsferas poliméricas possuem em relação a outros adjuvantes efetuando depósito é que são extremamente seguras e foram aprovadas pela Food and Drug Administration nos EUA para utilização em medicina humana, como suturas adequadas e para utilização como um sistema de distribuição de fármacos biodegradável (Langer R. *Science*.

1990; 249(4976):1527-33). As taxas de hidrólise de copolímero estão muito bem caracterizadas, as quais, por sua vez, permitem a preparação de micropartículas com libertação prolongada de antigénio ao longo de períodos de tempo prolongados (O'Hagen, *et al.*, *Vaccine*. 1993;11(9):965-9).

A administração parentérica de micropartículas deduz imunidade de longa duração, especialmente se incorporarem características de libertação prolongada. A taxa de libertação pode ser modulada pela mistura de polímeros e seus pesos moleculares relativos, os quais irão hidrolisar ao longo de períodos de tempo variáveis. Sem se desejar a ligação à teoria, a formulação de partículas de diferentes tamanhos (1 µm a 200 µm) também pode contribuir para respostas imunológicas de longa duração, dado que as grandes partículas devem ser decompostas em partículas mais pequenas antes de ficarem disponíveis para absorção por macrófagos. Neste modo, poderia ser desenvolvida uma vacina de injeção única pela integração de diversos tamanhos de partícula prolongando, desse modo, a apresentação de antigénio e beneficiando grandemente os produtores de gado.

Em algumas aplicações, um adjuvante ou excipiente pode ser incluído na formulação vacinal. Montanide™ (adjuvante Incompleto de Freund) e alúmen, por exemplo, são adjuvantes preferidos para utilização humana. A escolha do adjuvante será determinada, em parte, pelo modo de administração da vacina. Por exemplo, a vacinação não injetada irá conduzir a melhor observância global e custos globais inferiores. Um modo de administração preferido é a administração intramuscular. Outro modo de administração preferido é administração intranasal. Os exemplos não limitativos de adjuvantes intranasais incluem quitosano em pó,

microsfemas de PLA e PLG, QS-21, nanopartículas de fosfato de cálcio (CAP) e mCTA/LTB (toxina de cólera mutante E112K com subunidade pentamérica B de enterotoxina termolábil).

O adjuvante utilizado também pode ser, teoricamente, qualquer dos adjuvantes conhecidos para vacinas baseadas em péptidos ou proteínas. Por exemplo: adjuvantes inorgânicos na forma de gel (hidróxido de alumínio/fosfato de alumínio, Warren *et al.*, 1986; fosfato de cálcio, Relyvelt, 1986); adjuvantes bacterianos, tais como monofosforil-lípido A (Ribi, 1984; Baker *et al.*, 1988) e péptidos de muramilo (Ellouz *et al.*, 1974; Allison e Byars, 1991; Waters *et al.*, 1986); adjuvantes particulados, tais como os denominados ISCOMS ("complexos imunoestimulatórios", Mowat e Donachie, 1991; Takahashi *et al.*, 1990; Thapar *et al.*, 1991), lipossomas (Mbawuike *et al.* 1990; Abraham, 1992; Phillips e Emili, 1992; Gregoriadis, 1990) e microsfemas biodegradáveis (Marx *et al.*, 1993); adjuvantes baseados em emulsões de óleo e emulsionantes, tais como IFA ("adjuvante Incompleto de Freund" (Stuart-Harris, 1969; Warren *et al.*, 1986), SAF (Allison e Byars, 1991), saponinas (tal como QS-21; Newman *et al.*, 1992), esqualeno/esqualano (Allison e Byars, 1991); adjuvantes sintéticos, tais como copolímeros em bloco não iónicos (Hunter *et al.*, 1991), análogos de péptido de muramilo (Azuma, 1992), lípido A sintético (Warren *et al.*, 1986; Azuma, 1992), polinucleótidos sintéticos (Harrington *et al.*, 1978) e adjuvantes policatiónicos (documento WO 97/30721).

Os adjuvantes para utilização com imunogénios da presente invenção incluem sais de alumínio ou cálcio (por exemplo, sais de hidróxido ou fosfato). Um adjuvante particularmente preferido para a presente utilização é um gel de hidróxido de alumínio, tal como o Alhydrogel™. As nanopartículas de fosfato de cálcio

(CAP) são um adjuvante sendo desenvolvido pela Biosante, Inc (Lincolnshire, Ill.). O imunogénio de interesse pode ser revestido no exterior de partículas ou encapsulado dentro do seu interior [He *et al.* (novembro de 2000) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7(6):899-903].

Outro adjuvante para utilização com um imunogénio da presente invenção é uma emulsão. Uma emulsão contemplada pode ser uma emulsão de óleo-em-água ou uma emulsão de água-em-óleo. Além das partículas de proteína quimérica imunogénica, essas emulsões compreendem uma fase de óleo de esqualeno, esqualano, óleo de amendoim ou semelhantes, com são bem conhecidos, e um agente dispersante. Os agentes dispersantes não iónicos são preferidos e esses materiais incluem ésteres de ácido mono e di-C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>-gordo de sorbitano e manida, tais como monoestearato de sorbitano, monooleato de sorbitano e monooleato de manida.

Essas emulsões são, por exemplo, emulsões de água-em-óleo que compreendem esqualeno, glicerol e um tensioativo, tal como monooleato de manida (Arlacel™ A), opcionalmente com esqualano, emulsionado com as partículas de proteína quimérica numa fase aquosa. Os componentes alternativos da fase de óleo incluem tocoferol alfa, di e triglicéridos de cadeia mista e ésteres de sorbitano. Os exemplos bem conhecidos dessas emulsões incluem Montanide™ ISA-720 e Montanide™ ISA 703 (Seppic, Castres, França). Outros adjuvantes de emulsão de óleo-em-água incluem os divulgados nos documentos WO 95/17210 e EP 0399843.

A utilização de adjuvantes de moléculas pequenas também está aqui contemplada. Um tipo de adjuvante de moléculas pequenas útil na presente é um derivado de 7-substituída-8-oxo- ou 8-sulfo-guanosina, descrito nas Pat. U.S. Nº 4539205, Pat.

U.S. N° 4643992, Pat. U.S. N° 5011828 e Pat. U.S. N° 5093318. A 7-alil-8-oxoguanosina (loxoribina) mostrou ser particularmente eficaz na indução de uma resposta específica de antígeno (imunogénio).

Um adjuvante útil inclui monofosforil-lípido A (MPL<sup>®</sup>), 3-desacil monofosforil-lípido A (3D-MPL<sup>®</sup>), um adjuvante bem conhecido, fabricado por Corixa Corp. de Seattle, anteriormente Ribicell, Hamilton, Mont. O adjuvante contém três componentes extraídos de bactérias: monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trealose (TDM) e esqueleto de parede celular (CWS) (MPL+TDM+CWS), numa emulsão de esqualeno/Tween<sup>™</sup> 80 a 2%. Este adjuvante pode ser preparado pelos métodos ensinados no documento GB 2122204B.

Outros compostos são estruturalmente relacionados com o adjuvante MPL<sup>®</sup>, denominado aminoalquilo glucosamida fosfatos (AGP), tais como os disponíveis a partir de Corixa Corp, sob a designação adjuvante RC-529<sup>™</sup> {sal de trietilamónio de 2-[(R)-3-tetra-decanoiloxitetradecanoilamino]-etil-2-desoxi-4-O-fosfon-o-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetra-decanoil]-2-[(R)-3-tetra-decanoiloxitetradecanoil-amino]-p-D-glucopiranosídeo}. Um adjuvante RC-529 está disponível numa emulsão de esqualeno, comercializada como RC-529SE e numa formulação aquosa, como RC-529AF, disponível a partir de Corixa Corp. (ver Pat. U.S. N° 6355257 e Pat. U.S. N° 6303347; Pat. U.S. N° 6113918; e Publicação U.S. N° 03-0092643).

Adjuvantes ainda contemplados incluem adjuvantes oligonucleotídicos sintéticos contendo o motivo nucleotídico CpG, uma ou mais vezes (mais sequências flanqueantes), disponíveis a partir de Coley Pharmaceutical Group. O adjuvante

designado QS21, disponível a partir de Aquila Biopharmaceuticals, Inc., são frações de saponina imunologicamente activas tendo atividade de adjuvante derivada da casca da árvore Sul-americana Quillaja Saponaria Molina (e. g., Quil™ A) e o método da sua produção é divulgado na Pat. U.S. Nº 5057540. Os derivados de Quil™ A, por exemplo, QS21 (um derivado de fração purificado por HPLC de Quil™ A, também conhecido como QA21) e outras frações, tal como QA17, também são divulgados. Os derivados semi-sintéticos e sintéticos de saponinas de Quillaja Saponaria Molina também são úteis, tais como os descritos na Pat. U.S. Nº 5977081 e Pat. U.S. Nº 6080725. O adjuvante denominado MF59, disponível a partir de Chiron Corp., é descrito na Pat. U.S. Nº 5709879 e Pat. U.S. Nº 6086901.

Os adjuvantes de dipéptido de muramilo também estão contemplados e incluem N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thur-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina [CGP 11637, referido como nor-MDP] e N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitiol-s-n-glicero-3-hidroxifosforiloxi) etilamina [(CGP) 1983A, referido como MTP-PE]. Os denominados análogos de dipéptido de muramilo são descritos na Pat. U.S. Nº 4767842.

Outras misturas de adjuvante incluem combinações de 3D-MPL e QS21 (documento EP 0671948 B1), emulsões de óleo-em-água compreendendo 3D-MPL e QS21 (documentos WO 95/17210, PCT/EP98/05714), 3D-MPL formulado com outros veículos (documento EP 0689454 B1), QS21 formulado em lipossomas contendo colesterol (documento WO 96/33739) ou oligonucleótidos imunoestimulatórios (documento WO 96/02555). O adjuvante SBAS2 (agora ASO2), disponível a partir de SKB (agora Glaxo-SmithKline), contém QS21

e MPL numa emulsão de óleo-em-água, também é útil. Os adjuvantes alternativos incluem os descritos no documento WO 99/52549 e suspensões de não particulados de éter de polioxietileno (Pedido de Patente UK N° 9807805.8).

A utilização de um adjuvante que contém um ou mais agonistas para o recetor 4 semelhante a Toll (TLR-4), tal como um adjuvante MPL<sup>®</sup>, ou um composto estruturalmente relacionado, tais como um adjuvante RC-529<sup>®</sup> ou um mimético de lípido A, isoladamente ou juntamente com um agonista para TLR-9, tal como um oligodesoxinucleótido não metilado contendo o motivo CpG, também é opcional.

Outro tipo de mistura de adjuvante compreende uma emulsão de água-em-óleo estável contendo, ainda, aminoalquilo glucosamina fosfatos, tal como descrito na Pat. U.S. N° 6113918. Dos aminoalquilo glucosamina fosfatos, a molécula conhecida como RC-529 {sal de trietilamónio de (2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxi-tetradecanoil]-2-[(R)-3--tetradecanoiloxitetra-decanoilamino]-p-D-glucopiranosido)} é a muito preferido. Uma emulsão de água-em-óleo preferida é descrita no documento WO 9956776.

Os adjuvantes são utilizados numa quantidade de adjuvante, a qual pode variar com o adjuvante, animal hospedeiro e imunogénio. As quantidades típicas podem variar de cerca de 1 .mcg a cerca de 1 mg por imunização. Os especialistas na técnica sabem que as concentrações ou quantidades apropriadas podem ser facilmente determinadas.



As composições vacinais compreendendo um adjuvante baseado em emulsão de óleo em água também estão incluídas no âmbito da presente invenção. A emulsão de água em óleo pode compreender um óleo metabolizável e uma saponina, tal como, por exemplo, como descrita no documento US 7323182. O óleo e uma saponina estão presentes, por exemplo, numa razão compreendida entre 1:1 e 200:1.

De acordo com várias formas de realização, as composições vacinais de acordo com a presente invenção podem conter um ou mais adjuvantes, caracterizados por estarem presentes como uma solução ou emulsão, a qual é substancialmente isenta de iões de sais inorgânicos, em que a referida solução ou emulsão contém uma ou mais substâncias solúveis em água ou emulsionáveis em água, a qual é capaz de tornar a vacina isotónica ou hipotónica. As substâncias solúveis em água ou emulsionáveis em água podem ser, por exemplo, selecionadas do grupo consistindo de: maltose; frutose; galactose; sacarose; álcool de açúcar; lípido; e suas combinações.

As formulações da presente invenção podem, opcionalmente, compreender um agente de melhoramento de distribuição mucosal, tal como, por exemplo, um péptido permeabilizante, que melhora de um modo reversível o transporte paracelular epitelial mucosal pela modulação da estrutura e/ou fisiologia de junção epitelial, como descrito no documento US 2004/0077540.

Os polipéptidos multiepitópicos multiméricos da presente invenção podem compreender, de acordo com várias formas de realização específicas, um adjuvante de proteossoma. O adjuvante de proteossoma compreende uma preparação purificada de proteínas de membrana externa de preparações de meningococos e

semelhantes de outras bactérias. Estas proteínas são altamente hidrófobas, refletindo o seu papel como proteínas e porinas transmembranares. Devido às suas interações de proteína-proteína hidrófobas, quando apropriadamente isoladas, as proteínas formam estruturas multimoleculares consistindo de vesículas de membrana de cerca de 60-100 nm de diâmetro, intactas ou fragmentadas. Este estado físico semelhante a lipossoma permite que o adjuvante de proteossoma atue como um veículo proteico e também atue como um adjuvante.

A utilização do adjuvante de proteossoma foi descrita na técnica anterior e é revista por Lowell GH em "New Generation Vaccines", Segunda Edição, Marcel Dekker Inc, Nova Iorque, Basileia, Hong Kong (1997), páginas 193-206. As vesículas de adjuvante de proteossoma são descritas como comparáveis em tamanho a determinados vírus, os quais são hidrófobos e seguros para utilização humana. A revisão descreve a formulação de composições compreendendo complexos não covalentes entre diversos antigénios e vesículas de adjuvante de proteossoma, as quais são formadas quando detergente solubilizante é removido, de um modo selecionável, utilizando tecnologia de diálise exaustiva.

Os polipéptidos da presente invenção são, opcionalmente, complexados às vesículas de antigénio de proteossoma através de frações hidrófobas. Por exemplo, um antigénio é conjugado a uma fração de lípido, tal como um grupo acilo gordo. Essa fração hidrófoba pode ser ligada diretamente ao polipéptido multimérico ou, alternativamente, um curto espaçador, por exemplo, de um, dois, três ou quatro, até seis ou dez aminoácidos, pode ser utilizado para ligar o polipéptido multimérico ao grupo gordo. Esta âncora hidrófoba interage com a membrana hidrófoba das

vesículas de adjuvante de proteossoma apresentando, simultaneamente, o péptido antigénico geralmente hidrófilo.

Em particular, uma âncora hidrófoba pode compreender um grupo acilo gordo ligado à terminação amino ou próximo da terminação carboxilo do polipéptido multimérico. Um exemplo é o lauroílo com cadeia de doze carbonos ( $\text{CH}_3(\text{CH})_{10}\text{CO}$ ), embora qualquer grupo acilo gordo servindo de modo semelhante, incluindo mas não limitado a grupos acilo que são de comprimentos de cadeia de oito, dez, catorze, dezasseis, dezoito ou vinte carbonos, também pode servir como âncoras hidrófobas. A âncora pode estar ligada ao péptido antigénico utilizando um espaçador de imunopotenciação. Esse ligante pode consistir de 1-10 aminoácidos, os quais podem auxiliar na manutenção da estrutura conformacional do péptido.

Os dois componentes, que são o polipéptido multimérico e o adjuvante de proteossoma, podem ser formulados pela mistura dos componentes numa solução selecionada de detergente(s) e, depois, remoção do(s) detergente(s) por métodos de diafiltração/ultrafiltração. Em geral, a razão de adjuvante de proteossoma para polipéptido multimérico contido na composição é, de um modo preferido, superior a 1:1 e pode ser, por exemplo, 1:2, 1:3, 1:4 até 1:5, 1:10 ou 1:20 (em peso). As soluções à base de detergente dos dois componentes podem conter o mesmo detergente ou detergentes diferentes e mais de um detergente pode estar presente na mistura submetida a ultrafiltração/diafiltração. Os detergentes adequados incluem Triton, Empigen e Mega-10. Outros detergentes adequados também podem ser utilizados. Os detergentes servem para solubilizar os componentes utilizados para preparar a composição.

As vacinas compreendendo diferentes polipéptidos multiméricos podem ser produzidas pela mistura de vários diferentes péptidos antigénicos com adjuvante de proteossoma. Alternativamente, duas ou mais composições de adjuvante de proteossoma/péptido antigénico podem ser produzidas e subseqüentemente misturadas.

Enquanto que a vacina de influenza comercial que é produzida em ovos induz alergia em indivíduos que são sensíveis a ovos de galinha, a vacina multimérica não deduz essas respostas, como manifestado pelo título de IgE, antes e após a imunização.

O teor de antigénio é mais bem definido pelo efeito biológico que provoca. Naturalmente, deve estar presente antigénio suficiente para provocar a produção de quantidades mensuráveis de anticorpo protetor. Um teste conveniente para a atividade biológica de vírus envolve a capacidade de o material antigénico submetido a testes deplecionar um anti-soro positivo conhecido do seu anticorpo protetor. O resultado é referido no log negativo da LD<sub>50</sub> (dose letal, 50%) para murganhos tratados com organismos virulentos, os quais são pré-tratados com um anti-soro conhecido, o qual, ele próprio, foi pré-tratado com diversas diluições do material antigénico sendo avaliado. Um valor elevado é, por conseguinte, refletivo de um teor elevado de material antigénico, o qual reteve os anticorpos no anti-soro conhecido reduzindo ou eliminando, deste modo, o efeito do anti-soro no organismo virulento, tornando letal uma dose pequena. Prefere-se que o material antigénico presente na formulação final esteja a um nível suficiente para aumentar o log negativo de LD<sub>50</sub> em, pelo menos, 1, de um modo preferido, 1,4, em comparação com o resultado do organismo virulento

tratado com anti-soro não tratado. Os valores absolutos obtidos para o controlo de anti-soro e material vacinal adequado estão, evidentemente, dependentes do organismo virulento e padrões anti-soro selecionados.

O seguinte método também pode ser utilizado para alcançar a formulação vacinal ideal: partindo de um antigénio definido, o qual se pretende que provoque a resposta imunitária desejada, numa primeira etapa, é encontrado um adjuvante correspondente, como descrito na literatura especializada, particularmente no documento WO 97/30721. Numa etapa seguinte, a vacina é otimizada pela adição de diversas substâncias isotónico-transformadoras, como definido nas presentes invenções, de um modo preferido, açúcares e/ou álcoois de açúcares, numa concentração isotónica ou ligeiramente hipotónica, à mistura de antigénio e adjuvante, com a composição sendo de outro modo idêntica, e ajustamento da solução para um pH fisiológico na gama de pH 4,0 a 10,0, particularmente, 7,4. Depois, numa primeira etapa, as substâncias ou a sua concentração, as quais irão melhorar a solubilidade da composição de antigénio/adjuvante em comparação com uma solução salina tamponada convencional, são determinadas. O melhoramento nas características de solubilidade por uma substância candidata é uma primeira indicação de que esta substância é capaz de causar um aumento na atividade imunogénica da vacina.

Dado que um dos pré-requisitos possíveis para um aumento na resposta imunitária celular é a ligação aumentada do antigénio a APC (células apresentadoras de antigénios), numa etapa seguinte pode ser realizada uma investigação para ver se a substância conduz a um aumento deste tipo. O processo utilizado pode ser análogo ao descrito na definição do adjuvante, e. g., incubação

de APC com péptido ou proteína marcado com fluorescência, adjuvante e substância isotónico-transformadora. Uma absorção ou ligação aumentada do péptido a APC provocada pela substância pode ser determinada por comparação com células as quais foram misturadas com péptido e adjuvante isoladamente ou com uma composição de péptido/adjuvante, a qual está presente em solução tampão salina convencional, utilizando citometria de fluxo.

Numa segunda etapa, as substâncias candidatas podem ser investigadas *in vitro* para ver se, e em que medida, a sua presença é capaz de aumentar a apresentação de um péptido a APC; a concentração de MHC nas células pode ser medida utilizando os métodos descritos no documento WO 97/30721, para testes de péptidos.

Outro modo possível de testar a eficiência de uma formulação é pela utilização de um sistema de modelo *in vitro*. Neste, as APC são incubadas juntamente com adjuvante, péptido e substância candidata e a ativação relativa de um clone de célula T, o qual reconhece especificamente o péptido utilizado, é medida (Coligan *et al.*, 1991; Lopez *et al.*, 1993).

A eficiência da formulação também pode ser, opcionalmente, demonstrada pela resposta imunitária celular pela deteção de uma reação de "hipersensibilidade de tipo retardado" (DTH) em animais imunizados.

Finalmente, a atividade imunomodulatória da formulação é medida em testes em animais.

Os péptidos e polipéptidos multiméricos da presente invenção podem ser sintetizados quimicamente, utilizando métodos

conhecidos na técnica para a síntese de péptidos, multímeros peptídicos e polipéptidos. Estes métodos baseiam-se, em geral, nos princípios conhecidos da síntese peptídica; muito convenientemente, os processos podem ser realizados de acordo com princípios conhecidos da síntese peptídica de fase sólida.

Como aqui utilizado, "péptido" indica uma sequência de aminoácidos ligada por ligações peptídicas. Os péptidos de acordo com a presente invenção compreendem uma sequência de 4 a 24 resíduos de aminoácidos. OS polipéptidos multiméricos compreendem, pelo menos, duas repetições e, no máximo, 50 repetições dos epitopos peptídicos.

Os análogos peptídicos e peptidomiméticos também estão incluídos no âmbito da invenção, assim como estão abrangidos os sais e ésteres dos péptidos da invenção. Um análogo peptídico de acordo com a presente invenção pode, opcionalmente, compreender, pelo menos, um aminoácido não natural e/ou, pelo menos, um grupo de bloqueio na terminação C ou terminação N. OS sais dos péptidos da invenção são sais orgânicos e inorgânicos fisiologicamente aceitáveis. A concepção de "análogos" apropriados pode ser assistida por computador.

O termo "peptidomimético" significa que um péptido de acordo com a invenção é modificado de tal modo que inclui, pelo menos, uma ligação não peptídica, tal como, por exemplo, ligação de ureia, ligação de carbamato, ligação de sulfonamida, ligação de hidrazina ou qualquer outra ligação covalente. A concepção de "peptidomimético" apropriado pode ser assistida por computador.

OS sais e ésteres dos péptidos da invenção estão abrangidos no âmbito da invenção. OS sais dos péptidos da invenção são sais

orgânicos e inorgânicos fisiologicamente aceitáveis. Os derivados funcionais dos péptidos da invenção abrangem derivados os quais podem ser preparados a partir de grupos funcionais, os quais ocorrem como cadeias laterais nos resíduos ou os grupos N- ou C-terminais, por meios conhecidos na técnica, e estão incluídos na invenção, desde que permaneçam farmacologicamente aceitáveis, *i. e.*, não destruam a atividade do péptido e não confirmem propriedades tóxicas em composições contendo-os. Estes derivados podem, por exemplo, incluir ésteres alifáticos dos grupos carboxilo, amidas dos grupos carboxilo produzidas por reação com amónia ou com aminas primárias ou secundárias, derivados de N-acilo de grupos amino livres dos resíduos de aminoácidos formados por reação com frações de acilo (*e. g.*, grupos de alcanóilo ou aroílo carbocíclico) ou derivados de O-acilo de grupo hidroxilo livre (por exemplo, o dos resíduos de serilo ou treonilo) formados por reação com frações de acilo.

O termo "aminoácido" refere-se a compostos, os quais têm um grupo amino e um grupo de ácido carboxílico, de um modo preferido, num padrão de substituição de 1,2- 1,3- ou 1,4- numa estrutura de carbono. Os aminoácidos  $\alpha$  são muito preferidos e incluem os 20 aminoácidos naturais (os quais são aminoácidos L, exceto para glicina), os quais são encontrados em proteínas, os aminoácidos D correspondentes, os aminoácidos de N-metilo correspondentes, aminoácidos de cadeia lateral modificada, os aminoácidos biossinteticamente disponíveis, os quais não são encontrados em proteínas (*e. g.*, 4-hidroxi-prolina, 5-hidroxi-lisina, citrulina, ornitina, canavanina, ácido djencólico, cianolanina  $\beta$ ) e aminoácidos  $\alpha$  derivados sinteticamente, tais como ácido amino-isobutírico, norleucina, norvalina, homocisteína e homoserina. Alanina  $\beta$  e ácido  $\gamma$ -aminobutírico são exemplos de 1,3 e 1,4-aminoácidos,



respetivamente, e muitos outros são bem conhecidos da técnica. Isoésteres de tipo estatina (um dipéptido compreendendo dois aminoácidos, em que a ligação de CONH é substituída por um CHOH), isoésteres de hidroxietileno (um dipéptido compreendendo dois aminoácidos, em que a ligação de CONH é substituída por um CHOHCH<sub>2</sub>), isoésteres de amida reduzida (um dipéptido compreendendo dois aminoácidos, em que a ligação de CONH é substituída por uma ligação de CH<sub>2</sub>NH) e isoésteres de tioamida (um dipéptido compreendendo dois aminoácidos, em que a ligação de CONH é substituída por uma ligação de CSNH) também são resíduos úteis para esta invenção.

Os aminoácidos utilizados nesta invenção são aqueles que estão disponíveis comercialmente ou estão disponíveis por métodos sintéticos de rotina. Determinados resíduos podem requerer métodos especiais para incorporação no péptido e as abordagens sintéticas sequenciais, divergentes ou convergentes à sequência peptídica são úteis nesta invenção. Os aminoácidos codificados de modo natural e seus derivados são representados por códigos de três letras, de acordo com as convenções da IUPAC. Quando não existe indicação, foi utilizado o isómero L.

As substituições conservativas de aminoácidos, como conhecidas dos especialistas na técnica, estão no âmbito da presente invenção. As substituições conservativas de aminoácidos incluem substituição de um aminoácido com outro tendo o mesmo tipo de grupo funcional ou cadeia lateral, e. g., alifático, aromático, carregado positivamente, carregado negativamente. Estas substituições podem melhorar a biodisponibilidade oral, penetração no sistema nervoso central, direcionamento para populações celulares específicas e semelhantes. Um especialista reconhecerá que as substituições, deleções ou adições

individuais à sequência de péptido, polipéptido ou proteína que alteram, adicionam ou delecionam um único aminoácido ou uma pequena percentagem de aminoácidos na sequência codificada são um "variante conservativamente modificado", onde a alteração resulta na substituição de um aminoácido com um aminoácido quimicamente semelhante. As tabelas de substituições conservativas proporcionando aminoácidos funcionalmente semelhantes são bem conhecidas na técnica.

Os seguintes seis grupos contêm, cada, aminoácidos que são substituições conservativas mútuas:

1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);  
e

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W).

Os seguintes exemplos são apresentados de modo a ilustrarem mais integralmente algumas formas de realização da invenção.

## **EXEMPLOS**

### Materiais e métodos

Polipéptidos multiepitópicos multiméricos: São apresentados exemplos de polipéptidos multiepitópicos multiméricos, compreendendo várias repetições dos epitopos peptídicos E1 a E9 de vírus influenza listados na Tabela 1. Os polipéptidos incluem aminoácidos e péptidos curtos como espaçadores. Os polipéptidos estão dispostos numa estrutura polimérica sequencial alternante ou numa estrutura de copolímero em bloco. Os polipéptidos são preparados por expressão num vetor de expressão a partir de uma construção polinucleotídica, compreendendo diversos sítios de restrição para manipulação adicional do polipéptido. A construção polinucleotídica é proporcionada a partir de uma fonte comercial.

Vacinas: as vacinas preparadas a partir dos polipéptidos multiepitópicos multiméricos apresentados nos exemplos 1-3 foram utilizadas para estudos de imunização de diversas estirpes de murganho. OS exemplos para vacinas específicas produzidas e testadas são:

A **multimérica Nº 11** é preparada a partir do polipéptido multimérico compreendendo cinco repetições de nove epitopos peptídicos de influenza, dispostos na estrutura polimérica sequencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>5</sub> apresentada no exemplo 1.

A **multimérica Nº 12** é preparada a partir do polipéptido multimérico, três repetições de nove epitopos peptídicos de

influenza, dispostos na estrutura polimérica sequencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>3</sub> apresentada no exemplo 3.

A **multimérica Nº 14** é preparada a partir do polipéptido multimérico compreendendo três repetições de nove epitopos peptídicos de influenza, dispostos na estrutura de copolímero em bloco [E1]<sub>3</sub>-[E2]<sub>3</sub>-[E3]<sub>3</sub>-[E4]<sub>3</sub>-[E5]<sub>3</sub>-[E6]<sub>3</sub>-[E7]<sub>3</sub>-[E8]<sub>3</sub>-[E9]<sub>3</sub>, apresentada no exemplo 2.

Estudos de imunização: três estirpes de murganhos: uma estirpe não consanguínea (ICR), uma estirpe consanguínea (BALB/c) e uma estirpe transgênica para moléculas de HLA A\*0201 humano (HLA A\*0201), foram utilizadas para estudos de imunização, assim como coelhos em algumas experiências. Os vírus utilizados incluíam os seguintes: A/Texas/1/77, A/Wisconsin/67/05 (WISC), A/WSN/33 (WSN), B/Malaysia/2506/04 (MAL), A/California/07-2007, A/New Caledonia20/99 (NC) e outros. Todos os estudos foram conduzidos com administração intramuscular de 150 mcg de polipéptido multiepitópico multimérico, em 100 microlitros, administrado igualmente a ambos os membros posteriores.

Exemplo 1: Polipéptido multimérico com cinco repetições de uma unidade contendo nove epitopos diferentes dispostos em estrutura sequencial alternante.

Este é um exemplo de um polipéptido multimérico compreendendo cinco repetições de nove epitopos peptídicos de influenza, dispostos na estrutura polimérica sequencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>5</sub>. O peso molecular estimado é 80 kD.

A sequência de aminoácidos deste polipéptido multimérico, incluindo a cauda de histidina, é mostrada na Figura 1B. A sequência de ADN da construção polinucleotídica utilizada para preparar este péptido multimérico é mostrada na Figura 1A.

Exemplo 2: Polipéptido multimérico com três repetições de cada de nove epitopos diferentes dispostos em estrutura de copolímero em bloco.

Neste exemplo, a sequência de ADN de uma construção polinucleotídica utilizada para preparar um péptido multimérico compreendendo três repetições de nove epitopos peptídicos de influenza, dispostos na estrutura de copolímero em bloco [E1]<sub>3</sub>-[E2]<sub>3</sub>-[E3]<sub>3</sub>-[E4]<sub>3</sub>-[E5]<sub>3</sub>-[E6]<sub>3</sub>-[E7]<sub>3</sub>-[E8]<sub>3</sub>-[E9]<sub>3</sub> é mostrada na Figura 2A e a correspondente sequência de aminoácidos é mostrada na Figura 2B. O peso molecular estimado é 48 kD.

Exemplo 3: Polipéptido multimérico com três repetições de uma unidade contendo nove epitopos dispostos em estrutura sequencial alternante.

Este é um exemplo de um polipéptido multimérico compreendendo três repetições de nove epitopos peptídicos de influenza, dispostos na estrutura polimérica sequencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>3</sub>. O peso molecular estimado é 48 kD.

A sequência de aminoácidos deste polipéptido multimérico é mostrada na Figura 3B. A sequência de ADN da construção

polinucleotídica utilizada para preparar este péptido multimérico é mostrada na Figura 3A.

#### Exemplo 4: Resposta imunitária celular.

As respostas imunitárias celulares a duas concentrações diferentes de um vírus influenza de estimulação das estirpes A/Texas/1/77, A/WisxWisc/67/05, A/California/07-2007 e B/Malaysia/2506/04 foram avaliadas. Murganhos transgênicos (transgenesis para HLA A\*0201), os murganhos foram vacinados, uma vez, com duas vacinas multiméricas: N° 11 e N° 14, emulsionadas no IFA (adjuvante Incompleto de Freund). 7-10 Dias após a imunização, o seu baço e nódulos linfáticos (LN) foram removidos e ainda incubados com os vírus acima mencionados. A proliferação foi medida por absorção de timidina e é mostrada na Figura 4, como o índice de proliferação para linfócitos incubados com o vírus de estimulação. A proliferação foi associada a secreção de IFN gama, na gama de 300-1300 pg/mL. Esta resposta indica uma resposta imunitária mediada por células Th1 à vacina, a qual poderia conferir uma imunidade mais sólida à infecção de provocação de vírus.

#### Exemplo 5: Reconhecimento de antigénio imunizante e de vírus por soro imune

Os murganhos ICR foram imunizados com o polipéptido multiepitópico multimérico compreendendo cinco repetições de nove epitopos, dispostos na estrutura polimérica sequencial alternante [E1E2E3E4E5E6E7E8E9]<sub>5</sub> (Multimérica N° 11), ou com o polipéptido multiepitópico multimérico compreendendo três

repetições de nove epitopos, dispostos na estrutura de copolímero em bloco [E1]<sub>3</sub>-[E2]<sub>3</sub>-[E3]<sub>3</sub>-[E4]<sub>3</sub>-[E5]<sub>3</sub>-[E6]<sub>3</sub>-[E7]<sub>3</sub>-[E8]<sub>3</sub>-[E9]<sub>3</sub> (Multimérica N<sup>o</sup> 14), suspenso em glicerol a 50% em PBS, ou suspenso em IFA como um adjuvante ou com glicerol a 50% em PBS como um controlo de transportador. O reconhecimento de epitopos de influenza protetores conhecidos, HA 91-108 e M2 2-12, e de vários vírus influenza (WISC, WSN, NC e MAL), por soros de murganhos imunizados com polipéptido antigénico (N<sup>o</sup> 11 e N<sup>o</sup> 14, respetivamente), foi determinado por ELISA e os resultados são sumariados nas Tabelas 4a e 4b. Um reconhecimento significativo é definido como uma elevação de, pelo menos, 4 vezes em título entre os soros pré-ímmunes e soros após três imunizações IM, em intervalos de 2-3 semanas.

Tabela 4a: Fator de elevação em título para diversos antigénios de soros pré-ímmunes e soros após 3 imunizações com polipéptido multiepitópico multimérico em glicerol a 50% em PBS

Imunização	N <sup>o</sup> 11 em glicerol a 50% em PBS		N <sup>o</sup> 14 em glicerol a 50% em PBS			
	ICR	BALB/c	ICR	BALB/c	C57B1/6j	Coelhos
Murganhos						
Ab para N <sup>o</sup> 11	16		64			
Ab para N <sup>o</sup> 14	256		1024			
Ab para HA91-108	1	1	64	200	1600	10
Ab para M2 1-18	1	2	64	5	3	1,5
Ab para WISC		2		8	2	2
Ab para WSN		4		4	2	2

(continuação)

Imunização	Nº 11 em glicerol a 50% em PBS		Nº 14 em glicerol a 50% em PBS			
	ICR	BALB/c	ICR	BALB/c	C57B1/6j	Coelhos
Murganhos						
Ab para NC		ND		8	8	2
Ab para MAL		2		4	2	2

Tabela 4b: Fator de elevação em título para diversos antigénios de soros pré-ímenes e soros após 3 imunizações com polipéptido multiepitópico multimérico em glicerol a 50% em PBS

Imunização	Nº 11 em adjuvante	Nº 14 em adjuvante		
	BALB/c	BALB/c	C57B1/6j	Coelhos
Murganhos				
Ab para WISC	4	8	4	8
Ab para WSN	4	8	2	16
Ab para NC	ND	8	2	8
Ab para MAL	2	4	2	8

Ambos os grupos mostram elevado reconhecimento do antigénio imunizante, os péptidos HA91-108 e M2 2-18 foram reconhecidos apenas pelos soros de murganhos imunizados com Nº 14 mas não com soros de murganhos imunizados com Nº 11.



Os soros humanos normais puderam reconhecer candidatos de vacina Multimérica, indicativo de potenciais respostas de memória a serem deduzidas após imunização de indivíduos humanos com esta vacina. Os títulos médios de 4 soros humanos para N° 11 e N° 14 foram 6000 e 6400, respetivamente.

Exemplo 6. Proteção contra uma desafio altamente letal com H3N2 A/Texas/1/77

Grupos de oito murganhos transgênicos foram imunizados, três vezes, em intervalos de 3 semanas, intramuscularmente, com a vacina multimérica N° 14 ou com PBS. Uma infecção de desafio com uma dose altamente letal (300 LD<sub>50</sub>) de H3N2 A/Texas/1/77 foi dada três semanas após o último reforço. OS murganhos foram sacrificados cinco dias após infecção. Foi observada uma redução significativa de título de vírus em pulmões de murganhos, como descrito na Figura 5, não obstante a grande quantidade de vírus utilizado para infecção.

Exemplo 7: Estudos de eficácia *in vivo*

Duas versões vacinais foram avaliadas *in vivo*: o polipéptido multimérico suspenso em Glicerol a 50% em PBS ou em adjuvante Incompleto de Freund.

A vacina purificada é utilizada em vários modelos de murganho para estabelecer a sua eficácia, mecanismo de ação e dados de toxicologia preliminares, antes da toxicologia de dose repetida. A resposta humoral, assim como estudos de farmacodinâmica, são realizados em várias estirpes de murganhos.

Um modelo animal que é empregue para a avaliação da vacina é os murganhos transgênicos para HLA A\*0201. Este modelo é utilizado para determinação da dose ótima, assim como para parâmetros celulares da resposta imunitária, para revelar o seu mecanismo de ação.

#### Exemplo 8:

A eficácia da vacina foi demonstrada em dois estudos preliminares, utilizando murganhos ICR e transgênicos (HLA A\*0201). Os murganhos foram vacinados intramuscularmente, três vezes, com intervalo de 3 semanas, com uma dose de 150 mcg/murganho das vacinas N° 11, N° 12 e N° 14, com e sem adjuvante (IFA). Três a quatro semanas após a última imunização, os murganhos foram infectados com uma LD50 de 300 de uma estirpe H3N2 de vírus influenza adaptada de murganho (A/Texas/1/77). Cinco dias após infecção, a taxa de sobrevivência foi monitorizada. Os grupos tratados e de controlo imunizados com glicerol a 50% em PBS, com e sem IFA, foram comparados.

A taxa de sobrevivência (Figura 6A) após infecção de LD50 de 300 em murganhos ICR foi 100%, enquanto que nos grupos de controlo (Glicerol a 50% em PBS) foi demonstrada uma taxa de sobrevivência de 20%.

A carga viral nos seus pulmões é detalhada na figura 6B, apenas para as vacinas N° 11 e N° 14. A carga viral nos grupos onde se verificou 100% de sobrevivência é significativamente inferior à carga viral nos grupos de controlo ( $p < 0,05$ ). Devido ao pequeno número de murganhos por grupo (5 murganhos), a análise estatística foi feita utilizando o Teste Exato de Fisher

Bilateral. O valor de P de 5% ou inferior é considerado estatisticamente significativo. OS dados foram analisados utilizando a versão 9.1 de SAS® (SAS Institute, Cary North Carolina).

Quanto à sobrevivência em murganhos transgênicos (Figura 7) imunizados com a vacina em PBS/Glicerol a 50%, utilizando os mesmos processos de vacinação e infecção mencionados acima, as taxas de sobrevivência foram 80% e 60% para vacinação com N° 11 e N° 14, respectivamente, em comparação com 20% no grupo de controle. A vacina N° 12 não foi protetora neste modelo de murganho, assim como as vacinas com adjuvante (IFA) testadas. Parece que neste modelo animal ou, pelo menos, neste estudo, a adição de adjuvante foi desnecessária e até reduziu o potencial protetor da vacina.

#### Exemplo 9: Toxicologia de dose repetida

Os ensaios de toxicologia de dose repetida são realizados com a vacina N° 14 (vacina Multimérica em repetições de três blocos, suspensa em Glicerol a 50% em PBS ou em adjuvante Incompleto de Freund, de acordo com um protocolo baseado em: [http://www3.niaid.nih.gov/daids/vaccine/Science/VRTT/06\\_SafetyTest.htm](http://www3.niaid.nih.gov/daids/vaccine/Science/VRTT/06_SafetyTest.htm)).

Um estudo preliminar de toxicologia relacionada com dose é realizado em murganhos ICR não consanguíneos. Três animais por gênero, por dose, para cada intervalo de tempo de sacrifício, são empregues para testar a histopatologia dos seus principais órgãos, após administração intramuscular da vacina, uma, duas e três vezes.

A dose mais elevada destinada à clínica, empregue numa dosagem de repetição de 6 semanas, contendo três vacinações quinzenais, é suscetível de ser suficiente para avaliar a toxicidade do produto e possibilitar duas repetições. Os estudos incluem monitorização da fase em vivo, seguida de uma gama completa de parâmetros toxicológicos, incluindo necropsia e exame histopatológico completo de todos os principais órgãos nos dias 2 dias e 2 semanas após imunização, de modo a demonstrar que quaisquer efeitos toxicológicos verificados durante o período de tratamento eram reversíveis.

#### Exemplo 10: Ensaio clínico de fase I/IIa

O objetivo primário deste estudo clínico é examinar a segurança da vacina anti-influenza preventiva, após uma única ou dupla administração intramuscular. O estudo é conduzido sob clínicas controladas entre voluntários saudáveis, com idades de 18 anos a 49 anos. O objetivo secundário é estimar a imunogenicidade induzida pela administração da vacina multimérica. Este estudo de fase I/II avalia os efeitos adversos agudos mais comuns e examina o tamanho das doses que os doentes podem tomar com segurança, sem uma incidência elevada de efeitos secundários.

Exemplo 11: Resposta antiviral em soros de murganhos imunizados com vacina de influenza comercial seguida de imunização com vacina Multimérica

Os murganhos transgênicos para HLA A\*0201 foram imunizados com a vacina de influenza inativada comercial (virião fracionado) BP Vaxigrip<sup>®</sup>, três vezes, nos dias 0, 60, 81, ou com Vaxigrip<sup>®</sup>, uma vez, no dia 0, e 2 imunizações adicionais (nos dias 60 e 81) com as vacinas Multiméricas N<sup>o</sup> 11, N<sup>o</sup> 12 e N<sup>o</sup> 14. A recolha de sangue foi realizada antes da imunização (pré-imune) e após a última imunização. Os anticorpos para várias estirpes de influenza foram determinados em soros agregados: H3N2: A/Wisconsin/67/05, A/Texas/1/77, A/California/07/2007, A/Fujian/411/2002, A/Moscow/10/99 e A/Panama/2007/99; H1N1: A/New Caledonia/20/99, A/WSN/33, A/PR8/34 B: B/Malaysia/2506/04, B/Lee/40.

Após a primeira imunização com Vaxigrip<sup>®</sup>, a qual é destinada a uma única imunização em humano, não existiu elevação significativa em títulos para a totalidade dos vírus (exceto elevação de título de x4 vezes para A/California).

Os resultados são mostrados nas Tabelas 5A e 5B. Com as formulações Multiméricas, a imunização anterior com Vaxigrip<sup>®</sup> não elevou significativamente a resposta aos vírus, em comparação com outros dados de estudos de imunização onde foram demonstradas respostas humorais semelhantes. Um máximo de elevação de 8 vezes em títulos de pós/pré-imune foi observado após duas imunizações com a vacina Multimérica. O grupo de controlo administrado com PBS foi negativo para todos os vírus. Na comparação dos diferentes variantes multiméricos, o N<sup>o</sup> 14 foi o melhor candidato em termos de resposta humoral aos vírus.

Tabela 5A. H3N2

Tratamento	imune	WISC		Texas		Califor		Fujian		Moscow		Panama	
		t	f	t	f	t	f	t	f	t	f	t	f
1x Vaxigrip + 2x Multi Nº 11	0	200		200		800		400		400		400	
	1	400	2	400	2	800	1	800	2	800	2	800	2
	2+	800	4	400	2	3200	4	800	2	800	2	1600	4
1xVaxigrip + 2x Multi Nº 12	0	400		200		400		400		800		800	
	1	800	2	400	2	1600	4	400	1	800	1	800	1
	2+	800	2	400	2	3200	8	1600	4	1600	2	3200	4
1xVaxigrip + 2x Multi Nº 14	0	200		200		800		400		400		800	
	1	800	4	400	2	1600	2	800	2	1600	4	3200	4
	2+	160	0 8	1600	8	3200	4	1600	4	3200	8	6400	8
PBS	1	200		100		200		200		200		200	
	2+	200	1	100	1	200	1	200	1	200	1	400	2

t=título, f=factor

Tabela 5B. H1N1 e Influenza B

Tratamento	imune	NC		WSN		PR8/34		B/Malaysia		B/Lee	
		t	f	t	f	t	f	t	f	t	f
1xVaxigrip + 2x Multi Nº 11	0	100		200		400		400		200	
	1	400	4	400	2	800	2	1600	4	400	2
	2+	400	4	800	4	800	2	1600	4	400	2
1 x Vaxigrip + 2x Multi Nº 12	0	200		200		200		800		100	
	1	400	2	400	2	400	2	800	1	400	4
	2+	400	2	800	4	400	2	800	1	400	4

(continuação)

Tratamento	imune	NC		WSN		PR8/34		B/Malaysia		B/Lee	
		t	f	t	f	t	f	t	f	t	f
1 xVaxigrip + 2x Multi N° 14	0	100		200		100		200		200	
	1	400	4	800	4	400	4	400	2	400	2
	2+	400	4	1600	8	400	4	1600	8	400	2
PBS	1	100		100		100		100		100	
	2+	100	1	200	2	200	2	200	2	100	1

t=título, f=factor

### Exemplo 12. Síntese peptídica

Os péptidos e péptidos multiméricos foram sintetizados utilizando síntese peptídica de fase sólida típica, com os seguintes materiais: Aminoácidos protegidos, 9-fluorenilmetiloxycarbonil-N-hidroxissuccinimida (Fmoc-OSu), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidona-fosfónio (PyBrop), resinas de poliestireno de Rink amida metilbenzidrilamina (MBHA) e muitos orgânicos e suportes para síntese peptídica de fase sólida (SPPS) foram adquiridos a Nova Biochemicals (Laufelfingen, Suíça). Bis(triclorometil)carbonato (BTC) foi adquirido a Lancaster (Lancashire, Inglaterra), Ácido trifluoroacético (TFA) e solventes para cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC) foram adquiridos a Bio-Lab (Jerusalém, Israel).

OS solventes para química orgânica foram adquiridos a Frutarom (Haifa, Israel). OS espetros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram registados num espectrómetro Bruker

AMX-300 MHz. Os espectros de massa foram realizados num espectrómetro de massa de barreira iónica Finnigan LCQ DUO. A cromatografia de camada fina (TLC) foi realizada em placas de sílica gel Merck F245 60 (Darmstadt, Alemanha). A análise de HPLC foi realizada utilizando uma coluna de RP analítica Vydac (C18, 4,6X 250 mm, número de catálogo 201TP54) e foi efetuada numa bomba Merck-Hitachi L-7100 e um detetor de comprimento de onda variável Merck-Hitachi L-7400, operando a 215 nm. A fase móvel consistia de um sistema de gradiente, com o solvente A correspondendo a água com TFA a 0,1% e o solvente B correspondendo a acetonitrilo (ACN) com TFA a 0,1%. A fase móvel começou com 95% de A, de 0 a 5 min, seguido de gradiente linear de 5% de B a 95% de B, de 5 a 55 min. O gradiente permaneceu a 95% de B, durante 5 min. adicionais e, depois, foi diminuído para 95% de A e 5% de B, de 60 a 65 min. O gradiente permaneceu a 95% de A, durante 5 min. adicionais, para se alcançar o equilíbrio de coluna. O caudal da fase móvel foi 1 mL/min. A purificação de péptido foi realizada por HPLC de fase inversa (RP-HPLC) (em bomba L-6200A, Merck-Hitachi, Japão), utilizando uma coluna de RP preparativa Vydac (C8, 22 x 250 mm, número de catálogo 218TP1022). Todos os HPLC preparativos foram efetuados utilizando um sistema de gradiente, com o solvente A correspondendo a água com TFA a 0,1% e o solvente B correspondendo a ACN com TFA a 0,1%.



LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> BiondVax Pharmaceuticals Ltd.

<120> VACINAS DE INFLUENZA MULTIEPITÓPICAS MULTIMÉRICAS

<130> BNDVX/005/PCT

<160> 88

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 1

**Glu Val Glu Thr**  
**1**

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 2

**Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp**  
**1 5 10 15**

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 3

**Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg**  
**1 5**

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

**Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys**  
**1 5 10**

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial



<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 8

**Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile**  
**1 5 10**

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 9

**Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Leu Thr**  
**1 5**

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 10

**Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp**  
**1 5 10 15**

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 11

**Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly**  
**1 5 10 15**

**Cys Arg**

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 12

**Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Lys Asn Gly Trp**  
**1 5 10 15**

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 13

**Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp**  
**1 5 10 15**

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 14

**Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg**  
**1 5**

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 15

**Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn**  
**1 5 10**

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 16

**Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu**  
**1 5**

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 17

**Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp**  
**1 5 10**

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 18

**Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu**  
**1 5 10**

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 19

**Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg**  
**1 5 10 15**

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 20

**Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn**  
**1 5**

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético



<400> 21

**Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Glu**  
**1 5 10 15**

**Cys Arg**

<210> 22

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 22

**Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Glu Cys**  
**1 5 10 15**

**Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp**  
**20**

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 23

**Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys**  
**1 5 10 15**

**Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp**  
**20**

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 24

**Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp**  
**1 5**

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 25

**Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu**  
**1 5 10**

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 26

**Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Pro**  
**1 5 10**

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 27

**Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val**  
**1 5**

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 28

**Ser Ile Val Pro Ser Gly Pro Leu**  
**1 5**

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 29

**Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val**  
**1                  5                  10                  15**

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 30

**Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu**  
**1                  5                  10**

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 31

**Arg Leu Glu Asp Val Phe Ala Gly Lys**  
**1                  5**

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 32

**Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile**  
**1 5 10**

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 33

**Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile**  
**1 5 10**

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 34

**Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile**  
**1 5**

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 35

**Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser**  
**1 5 10 15**

**Glu Arg Gly**

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 36

**Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val**  
**1 5 10**

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 37

**Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val**  
**1 5 10**

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 38

**Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu**  
**1 5**

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 39

**Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu**  
**1 5**

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 40

**Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr**  
**1 5**

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 41

**Ala Ser Cys Met Gly Leu Ile Tyr**  
**1 5**

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 42

**Arg Met Gly Ala Val Thr Thr Glu Val**  
**1 5**

<210> 43

<211> 11



<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 43

**Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala**  
**1 5 10**

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 44

**Gln Met Val Ala Thr Thr Asn Pro Leu**  
**1 5**

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 45

**Gln Met Val Ala Thr Thr Asn Pro Leu Ile**  
**1 5 10**

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 46

**Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys**  
**1 5 10**

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 47

**Asp Leu Leu Glu Asn Leu Gln Thr Tyr**  
**1 5**

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 48

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

**Ser Leu**

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 49

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

**Ser Leu**

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 50

**Ser Thr Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala**  
**1 5 10 15**

**Ser Leu**

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 51

**Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn**  
**1 5**

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 52

**Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro**  
**1 5 10**

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 53

**Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro**  
**1 5 10**

<210> 54

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 54

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

**Asn Val Pro**

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 55

**Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Ile Tyr Gln**  
**1 5 10**

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 56

**Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly**  
**1 5 10**

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 57

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

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 58

**Lys Val Lys Ile Leu Pro Lys Asp Arg Trp Thr Gln His Thr Thr Thr**  
**1 5 10 15**

**Gly Gly**

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 59

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

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 60

**Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr Arg Arg**  
**1 5**

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 61

**Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr**  
**1 5**

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 62

**His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro**  
**1 5 10**

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 63

**His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly**  
**1 5 10**

<210> 64

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial



<220>

<223> péptido sintético

<400> 64

**Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg**  
**1 5 10 15**

**Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys**  
**20**

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 65

**Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys**  
**1 5**

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 66

**Lys Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr**  
**1 5**

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 67

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

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 68

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

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 69

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

<210> 70

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 70

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

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 71

**Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile**  
**1 5**

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 72

**Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg**  
**1 5**

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 73

**Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly**  
**1 5 10**

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 74

**Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg**  
**1 5**

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 75

**Leu Pro Phe Asp Lys Pro Thr Ile Met**  
**1 5**

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 76

**Val Ser Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr**  
**1 5**

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 77

**Arg Arg Ser Phe Glu Leu Lys Lys Leu**  
**1 5**



<400> 80

**Ala Asp Arg Gly Leu Leu Arg Asp Ile**

**1**

**5**

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 81

**Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn**

**1**

**5**

**10**

<210> 82

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 82

**Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly**

**1**

**5**

**10**

**15**

**Phe Leu Glu**

<210> 83

<211> 2199

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 83

```
atgcatatga gatctccagc taaacttctg aaagaacgtg gatttttcgg tgcaatcgct      60
ggttttctgg aggggtcgaa agcctacagt aactgttacc cctacgatgt gcccgattat      120
gccagcctgg gtagcctcct tacagaagtt gaaacttatg tgctcggctg gctgacaggg      180
aaaaacggcc tttatcctgt gtggaccggc gtgacgcaga acggattctg gcggtggcga      240
aatggacgta aaactcgagc tgcgtatgag cgcattgtga acatcctcaa aggtaaaggc      300
ccgaaatagc tgaaacagaa tacattaata tttagccaccg gcgagagcgc tgcctttgaa      360
gacctccgtg tgctcagttt tatcccggtt tatggggaac tgcgttctcg ctattgggag      420
atccgtaccg gggtcaggggg tccaccggcg aagctgctga aagaacgtgg gttcttcggt      480
gcgattgccg gtttcttggg aggatcaaaa gcgtattcga actgctaccg gtatgatgtg      540
ccagattacg ccagcctggg ctccctcttg acagaggctc aaacctatgt actgggttgg      600
ctgaccggta agaacggtct gtatccggtt tggactgggtg tgacacaaaa cggcttttgg      660
cggggggaaa acggccggaa aaccgcagc gcttacgagc gcatgtgcaa cattctgaaa      720
ggcaaaggcc cgaaatacgt gaagcagaat acgctcaaac ttgccacggg cgcaagcgca      780
gcctttgaag acctgcgggt cttgagcttt atccgcggtt acggggagct gcggtcgcgc      840
tactggcgca ttcgtacgcy tagtggtgga cctcccgcga aacttctgaa agagcggggc      900
ttctttggag cgattgctgg cttcttggag ggaagcaaa cctactctaa ttgttaccga      960
tacgatgtgc ctgattatgc gagcctcggg agcttctgta cagaagtgga aacctacggt      1020
ctcggctggc tgacgggcaa aaatggtctc taccagtggt ggaccggagt taccagaat      1080
gggttctggc gcggtgagaa cggccgtaaa acacgttcag cgtacgagcg gatgtgcaac      1140
atcttaaaag gcaaaggacc gaaatacgtc aagcagaata ctctgaagt agccactggg      1200
gcctcagccc ctttgaaga ccttcgcgctc ttgagtttta tccgggggta tggggaactg      1260
cggagccgct actgggctat tcgtacgcyg tcgggtggcc cactcgagcc ggccaaattg      1320
ctcaaagaac gtggtttctt cggagcgatc gcaggttttc ttgaaggctc taaagcgtag      1380
agcaactggt atccatacga tgtgccggat tacgccagtc tgggttcctt cctgaccgag      1440
gtggaacgtg atgtactagg atggctcacg ggtaaaaatg gtctctatcc tgtgtggagc      1500
ggcgtaaccg agaacggctt ttggcggggc gaaaacggcc gaaaacccg tagcgcatac      1560
gagcgtatgt gtaacatcct taaaggcaaa ggtccaaaat acgttaagca gaataccctg      1620
```



aaactggcta cgggcgccag tgcggccttc gaagatttac gggtgctgct cttcatccgc 1680  
ggctatggtg aactgcgctc tcgttactgg gcaatccgta cccgcagtgg cggacctccg 1740  
gctaaactgt tgaaagaacg cggttctttt ggtgctatcg caggttttct ggaaggaagt 1800  
aaagcatatt cgaattgtta tccctacgac gtgccggatt atgcgtcgct cggttcgctg 1860  
ctgaccgagg tggaaaccta cgttctaggg tggttgacag gtaagaacgg gctttaccgg 1920  
gtatggaccg gcgttaccca gaacggtttt tggcgcggtg aaaatggccg taaaactcgg 1980  
tcagcatacg aacggatgtg caatatcttg aaaggtaaag gaccgaaata cgttaaacag 2040  
aacacgctga aactggcaac aggcgccagc gcggcgtttg aggatttacg cgtcctgtca 2100  
tttattcggg gctacggcga attacgtagt cgttattggg cgattcgtac cgcagcgga 2160  
gggctcgagt aataaaagct ttctagacat atgatgcat 2199

<210> 84

<211> 723

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 84

Met His Met Arg Ser Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe  
1 5 10 15  
Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys  
20 25 30  
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr  
35 40 45  
Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu  
50 55 60  
Tyr Pro Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu  
65 70 75 80  
Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu  
85 90 95

Lys Gly Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala  
 100 105 110  
 Thr Gly Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile  
 115 120 125  
 Arg Gly Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg  
 130 135 140  
 Ser Gly Gly Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr  
 165 170 175  
 Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu  
 180 185 190  
 Val Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr  
 195 200 205  
 Pro Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn  
 210 215 220  
 Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys  
 225 230 235 240  
 Gly Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
 245 250 255  
 Gly Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg  
 260 265 270  
 Gly Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser  
 275 280 285  
 Gly Gly Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala  
 290 295 300  
 Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro  
 305 310 315 320  
 Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val  
 325 330 335  
 Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro  
 340 345 350

Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly  
 355 360 365

Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly  
 370 375 380

Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly  
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly  
 405 410 415

Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly  
 420 425 430

Gly Pro Leu Glu Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly  
 435 440 445

Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr  
 450 455 460

Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu  
 465 470 475 480

Val Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr  
 485 490 495

Pro Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn  
 500 505 510

Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys  
 515 520 525

Gly Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
 530 535 540

Gly Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg  
 545 550 555 560

Gly Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser  
 565 570 575

Gly Gly Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala  
 580 585 590

Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro  
595 600 605

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val  
610 615 620

Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro  
625 630 635 640

Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly  
645 650 655

Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly  
660 665 670

Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly  
675 680 685

Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly  
690 695 700

Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly  
705 710 715 720

Gly Leu Glu

<210> 85

<211> 1299

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 85

```
atgcatatga gatctccagc taaacttctg aaagaacgtg gatttttcgg tgcaatcgct      60
ggttttctgg agccaccggc gaagctgctg aaagaacgtg ggttcttcgg tgcgattgcc     120
ggtttcttgg aacctccgc gaaacttctg aaagagcggg gcttctttgg agcgattgcg     180
ggcttcttgg agccatcgaa agcctacagt aactgttacc cctacgatgt gcccgattat     240
```

```

gccagcctgc cttcaaaagc gtattcgaac tgctaccctg atgatgtgcc agattacgcc 300
agcctgccaa gcaaagccta ctctaattgt tacccatacg atgtgcctga ttatgcgagc 360
ctccctagcc tccttacaga agttgaaact tatgtgctca gcttgctgac agaagtggaa 420
acctacgttc tcagcttget gacagaagtg gaaacctacg ttctctggct gacagggaaa 480
aacggccttt atccttggct gaccggtaag aacggctctg atccgtggct gacgggcaaa 540
aatggtctct acccatggac cggcgtgacg cagaaccctt ggactggtgt gacacaaaac 600
ccatggaccg gagttacca gaatcctttc tggcgtggcg aaaatggacg taaaactcgc 660
agtgcgtatg agcgcagtgt taacatcctc aaaggtaaac ccttttggcg gggggaaaa 720
ggccggaaaa cccgcagcgc ttacgagcgc atgtgcaaca ttctgaaagg caaacattc 780
tggcgcggtg agaacggccg taaaacacgt tcagcgtacg agcggatgtg caacatctta 840
aaaggcaaac ctccgaaata cgtgaagcag aatacgtcga aacttgccac gccaccgaaa 900
tacgtcaagc agaatactct gaagttagcc actccgccga aatacgtcaa gcagaatact 960
ctgaagttag ccactccttc agccgccttt gaagacctc gcgtcttgag ttttatccgg 1020
ggttatccaa gcgcagcctt tgaagacctg cgggtcttga gctttatccg cggttaccct 1080
tcagccgcct ttgaagacct tcgctcttg agttttatcc ggggttatcc agaactgcgt 1140
tctcgctatt gggcgatccg taccgggtca gggccggagc tgcggtcgcg ctactgggcg 1200
attcgtacgc gtagtgggcc agaactgcgg agccgctact gggctattcg tacgcggtcg 1260
ggttaataac tcgagaggct ttctagacat atgatgcat 1299

```

<210> 86

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 86

Met His Met Arg Ser Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe  
1 5 10 15

Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu  
20 25 30

Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu Pro Pro Ala Lys  
35 40 45

Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Leu Glu  
 50 55 60

Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr  
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val  
 85 90 95

Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Pro Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro  
 100 105 110

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Pro Ser Leu Leu Thr Glu Val  
 115 120 125

Glu Thr Tyr Val Leu Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu  
 130 135 140

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Trp Leu Thr Gly Lys  
 145 150 155 160

Asn Gly Leu Tyr Pro Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Trp  
 165 170 175

Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn  
 180 185 190

Pro Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Pro Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn  
 195 200 205

Pro Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu  
 210 215 220

Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Pro Phe Trp Arg Gly Glu Asn  
 225 230 235 240

Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys  
 245 250 255

Gly Lys Pro Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ser Ala  
 260 265 270

Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Pro Pro Lys Tyr Val  
 275 280 285

Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Pro Pro Lys Tyr Val Lys Gln  
 290 295 300  
 Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Pro Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr  
 305 310 315 320  
 Leu Lys Leu Ala Thr Pro Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu  
 325 330 335  
 Ser Phe Ile Arg Gly Tyr Pro Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val  
 340 345 350  
 Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr Pro Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg  
 355 360 365  
 Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr Pro Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp  
 370 375 380  
 Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Pro Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala  
 385 390 395 400  
 Ile Arg Thr Arg Ser Gly Pro Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile  
 405 410 415  
 Arg Thr Arg Ser Gly  
 420

<210> 87

<211> 1335

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> polinucleótido sintético

<400> 87

atgagatctc	cggcgaaact	gctgaaagaa	cgtggctttt	ttggcgcgat	tgcgggcttt	60
ctggaaggca	gcaaagcgta	tagcaactgc	tatccgatg	atgtgccgga	ttacgcgagt	120
ctgggctctc	tgctgaccga	agtggaaacc	tatgtgctgg	gctggctgac	cggcaaaaac	180
ggcctgtatc	cggtgtggac	cggcgtgacc	cagaacggct	tttggcgtgg	cgaaaacggc	240

cgtaaaaccc gtagcgcgta tgaacgtatg tgcaacatcc tgaaaggcaa aggccccgaaa 300  
 tatgtgaaac agaacaccct gaaactggcc accggtgcga gcgcggcggtt tgaggacctg 360  
 cgtgttctga gctttattcg tggctatggc gaactgcgta gccgttattg ggcgattcgt 420  
 acccgtagcg gtgggtccgcc ggccaaactg ctgaaagaac gcggtttctt cgggtgcgatc 480  
 gccggttttc tggaaaggtag caaagcctac tctaattggtt acccgtagca tgttccggat 540  
 tacgccagcc tgggtagcct gctgaccgaa gttgaaacct acgttctggg ttggctgacc 600  
 ggtaaaaatg gtctgtaccc ggtttggacc ggtgttacc agaatggttt ctggcgcggt 660  
 gaaaatggtc gcaaaacccg cagcgcctac gaacgcatgt gtaatattct gaaaggtaaa 720  
 ggtccgaaat acgttaaaca gaataccctg aaactggcca ccggcgccag cgccgccttc 780  
 gaggacctgc gcgttctgag cttcatccgc ggttacggtg aactgcgcag ccgctactgg 840  
 gccatccgca cccgcagcgg tgggtccgccg gcgaaactgc tgaaagaacg cggttttttt 900  
 ggtgccattg cgggttttct ggaaggtagc aaagcctatt ctaactgcta tccgtacgat 960  
 gttccggatt atgcgagcct gggtagcctg ctgaccgaag tggaaaccta tgttctgggt 1020  
 tggctgaccg gcaaaaacgg tctgtatccg gtttggaccg gtgtgacca gaacggtttt 1080  
 tggcgcggtg aaaacggccg taaaaccgc agcgcctatg aacgcatgtg caacattctg 1140  
 aaaggcaaag gtccgaaata cgtgaaacag aacaccctga aactggccac cggcgcgagc 1200  
 gcggcctttg aggacctgcg cgttctgagc tttattcgcg gctatggtga actgcgcagc 1260  
 cgctattggg cgattcgtac ccgcagcggc ggctaataac tcgagaagct ttctagacat 1320  
 atgatgcatg agctc 1335

<210> 88

<211> 431

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 88

**Met Arg Ser Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala**

**1**

**5**

**10**

**15**

**Ile Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro**

**20**

**25**

**30**



Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val  
 35 40 45

Glu Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro  
 50 55 60

Val Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly  
 65 70 75 80

Arg Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly  
 85 90 95

Lys Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly  
 100 105 110

Ala Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly  
 115 120 125

Tyr Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly  
 130 135 140

Gly Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile  
 145 150 155 160

Ala Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr  
 165 170 175

Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu  
 180 185 190

Thr Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Val  
 195 200 205

Trp Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg  
 210 215 220

Lys Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys  
 225 230 235 240

Gly Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Ala  
 245 250 255

Ser Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr  
 260 265 270

Gly Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly  
 275 280 285

Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile Ala  
 290 295 300  
 Gly Phe Leu Glu Gly Ser Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp  
 305 310 315  
 Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr  
 325 330 335  
 Tyr Val Leu Gly Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Val Trp  
 340 345 350  
 Thr Gly Val Thr Gln Asn Gly Phe Trp Arg Gly Glu Asn Gly Arg Lys  
 355 360 365  
 Thr Arg Ser Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn Ile Leu Lys Gly Lys Gly  
 370 375 380  
 Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Ala Ser  
 385 390 395 400  
 Ala Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Arg Gly Tyr Gly  
 405 410 415  
 Glu Leu Arg Ser Arg Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly  
 420 425 430

Lisboa, 22 de junho de 2015

## REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido multiepitópico multimérico, compreendendo múltiplas cópias de uma pluralidade de epitopos peptídicos de vírus influenza, dispostos numa configuração selecionada da estrutura polimérica sequencial alternante  $(X_1X_2X_3..X_9)$  e uma estrutura de copolímero em bloco  $(X_1)_n(X_2)_n(X_3)_n... (X_9)_n$ , em que  $n$  é, em cada ocorrência, independentemente, um número inteiro de 3-5; e cada de  $X_1$ - $X_9$  é um epitopo peptídico de influenza diferente, selecionado do grupo consistindo de HA 354-372 correspondendo a E1 e SEQ ID N°: 82, HA 91-108 correspondendo a E2 e SEQ ID N°: 48, M1 2-12 correspondendo a E3 e SEQ ID N°: 25, HA 150-159 correspondendo a E4 e SEQ ID N°: 52, HA 143-149 correspondendo a E5 e SEQ ID N°: 51, NP 206-229 correspondendo a E6 e SEQ ID N°: 64, HA 307-319 correspondendo a E7 e SEQ ID N°: 59, NP 335-350 correspondendo a E8 e SEQ ID N°: 69 e NP 380-393 correspondendo a E9 e SEQ ID N°: 70.
  
2. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, compreendendo:
  - (i) nove epitopos peptídicos de vírus influenza diferentes, dispostos na seguinte estrutura polimérica sequencial alternante  $[E1E2E3E4E5E6E7E8E9]_n$ , em que  $n$  é 3 ou 5; ou
  - (ii) três repetições de nove epitopos peptídicos de vírus influenza diferentes, dispostos na seguinte estrutura de copolímero em bloco  $[E1E1E1-E2E2E2-E3E3E3-E4E4E4-E5E5E5-E6E6E6-E7E7E7-E8E8E8-E9E9E9]$ .

3. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, como exposto numa sequência selecionada do grupo consistindo de SEQ ID N°: 84, SEQ ID N°: 86 e SEQ ID N°: 88.
4. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, compreendendo, ainda, uma sequência veículo.
5. Polinucleótido isolado codificando um polipéptido multiepitópico de influenza de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3.
6. Polinucleótido isolado de acordo com a reivindicação 5, codificando uma sequência polipeptídica selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 84, SEQ ID N°: 86, e SEQ ID N°: 88; ou compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo de: SEQ ID N°: 83, SEQ ID N°: 85 e SEQ ID N°: 87.
7. Vacina para imunização de um indivíduo contra influenza compreendendo, pelo menos, um polipéptido de acordo com a reivindicação 1.
8. Vacina de acordo com a reivindicação 7, compreendendo, ainda, um adjuvante.
9. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 ou 8, para utilização na indução de uma resposta imunitária e conferindo proteção contra influenza.

10. Utilização de um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, para a preparação de uma composição vacinal para imunização contra influenza.

Lisboa, 22 de junho de 2015

ATGCATATGAGATCTCCAGCTAAACTTCTGAAAGAACGTGGATTTTTTCGGTGCAATCGCT  
GGTTTTCTGGAGGGGTCGAAAGCCTACAGTAACTGTTACCCCTACGATGTGCCCGATTAT  
GCCAGCCTGGGTAGCCTCCTTACAGAAGTTGAACTTATGTGCTCGGCTGGCTGACAGGG  
AAAAACGGCCTTTATCCTGTGTGGACCGGCTGACGCAGAACGGATTCTGGCGTGGCGAA  
AATGGACGTAAAACTCGCAGTGCCTATGAGCGCATGTGTAACATCCTCAAAGGTAAAGGC  
CCGAAATATGTGAAACAGAATACATTAATAATTAGCCACCGGCGCGAGCGCTGCCTTTGAA  
GACCTCCGTGTGCTCAGTTTTATCCGCGGTTATGGGGAACCTGCGTTCTCGCTATTGGGCG  
ATCCGTACCCGGTCAGGGGGTCCACCGGCGAAGCTGCTGAAAGAACGTGGGTTCTTCGGT  
GCGATTGCCGGTTTTCTTGAAGGATCAAAGCGTATTTCGAACTGCTACCCGTATGATGTG  
CCAGATTACGCCAGCCTGGGCTCCCTCTTGACAGAGGTGCAAACCTATGTACTGGGTTGG  
CTGACCGGTAAGAACGGTCTGTATCCGGTTTGGACTGGTGTGACACAAAACGGCTTTTGG  
CGGGGGGAAAACGGCCGAAAACCCGCAGCGCTTACGAGCGCATGTGCAACATTCTGAAA  
GGCAAAGGCCCGAAATACGTGAAGCAGAATACGCTCAAACCTGCCACGGGCGCAAGCGCA  
GCCTTTGAAGACCTGCGGGTCTTGAGCTTTATCCGCGGTTACGGGGAGCTGCGGTCGCGC  
TACTGGGCGATTTCGTACGCGTAGTGGTGGACCTCCCGCGAAACTTCTGAAAGAGCGGGGC  
TTCTTTGGAGCGATTGCGGGCTTCTTGGAGGGAAGCAAAGCCTACTCTAATTGTTACCCA  
TACGATGTGCCTGATTATGCGAGCCTCGGTAGCTTGTGACAGAAGTGAAACCTACGTT  
CTCGGCTGGCTGACGGGCAAAAATGGTCTCTACCCAGTGTGGACCGGAGTTACCCAGAAT  
GGGTTCTGGCGCGGTGAGAACGGCCGTAAAACACGTTACGCGTACGAGCGGATGTGCAAC  
ATCTTAAAAGGCAAAGGACCGAAATACGTCAAGCAGAATACTCTGAAGTTAGCCACTGGG  
GCCTCAGCCGCCCTTTGAAGACCTTCGCGTCTTGAGTTTTATCCGGGGTTATGGGGAACCTG  
CGGAGCCGCTACTGGGCTATTTCGTACGCGGTCGGGTGGCCCACTCGAGCCGGCCAAATTG  
CTCAAAGAACGTGGTTTTCTTCGGAGCGATCGCAGGTTTTCTTGAAGGCTCTAAAGCGTAC  
AGCAACTGTTATCCATACGATGTGCCGGATTACGCCAGTCTGGGTTCCCTCCTGACCGAG  
GTGGAAACGTATGTACTAGGATGGCTCACGGGTAAAATGGTCTCTATCCTGTGTGGACG  
GGCGTAACCCAGAACGGCTTTTGGCGGGGCGAAAACGGCCGCAAACCCGTAGCGCATA  
GAGCGTATGTGTAACATCCTTAAAGGCAAAGTCCAAAATACGTTAAGCAGAATACCCTG  
AAACTGGCTACGGGCGCCAGTTCGCGCCTTCGAAGATTTACGGGTGCTGTCCTTCATCCGC  
GGCTATGGTGAACCTGCGCTCTCGTTACTGGGCAATCCGTACCCGCAGTGGCGGACCTCCG  
GCTAAACTGTTGAAAGAACGCGGCTTCTTTGGTGTCTATCGCAGGTTTTCTGGAAGGAAGT  
AAAGCATATTCGAATTGTTATCCCTACGACGTGCCGGATTATGCGTCGCTCGGTTGCTG  
CTGACCGAGGTGGAAACCTACGTTCTAGGCTGGTTGACAGGTAAGAACGGGCTTTACCCG  
GTATGGACCGGCGTTACCCAGAACGGTTTTTGGCGCGGTGAAAATGGCCGTAAAACCTCGG  
TCAGCATAACGAACGGATGTGCAATATCTTGAAGGTAAAGGACCGAAATACGTTAAACAG  
AACACGCTGAAACTGGCAACAGGCGCCAGCGCGGCGTTTGGAGGATTTACGCGTCCGTCA  
TTTTATTCGGGGCTACGGCGAATTACGTAGTCGTTATTGGGCGATTTCGTACCCGCAGCGGA  
GGGCTCGAGTAATAAAAGCTTCTAGACATATGATGCAT

**FIG. 1 A**

M H M R S P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S  
N C Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G  
K N G L Y P V W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E  
R M C N I L K G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E  
D L R V L S F I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A  
K L L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V  
P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V  
W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K  
G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F  
I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A K L L K E R G  
F F G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G  
S L L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N  
G F W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V  
K Q N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R G Y G E L  
R S R Y W A I R T R S G G P L E P A K L L K E R G F F G A I  
A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E  
V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N G F W R G  
E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V K Q N T L  
K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R G Y G E L R S R Y W  
A I R T R S G G P P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G S  
K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G  
W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R  
S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S  
A A F E D L R V L S F I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G  
G L E

FIG. 1B

ATGCATATGAGATCTCCAGCTAAACTTCTGAAAGAACGTGGATTTTTTCGGTGCAATCGCT  
GGTTTTCTGGAGCCACCGGCCGAAGCTGCTGAAAGAACGTGGGTTCTTCGGTGCGATTGCC  
GGTTTCTTGGAACCTCCCGCGAAACTTCTGAAAGAGCGGGGCTTCTTTGGAGCGATTGCG  
GGCTTCTTGAGCCATCGAAAGCCTACAGTAACTGTTACCCCTACGATGTGCCGATTAT  
GCCAGCCTGCCTTCAAAGCGTATTGAACTGCTACCCGTATGATGTGCCGATTACGCC  
AGCCTGCCAAGCAAAGCCTACTCTAATTGTTACCCATACGATGTGCCTGATTATGCGAGC  
CTCCCTAGCCTCCTTACAGAAGTTGAACTTATGTGCTCAGCTTGCTGACAGAAGTGGAA  
ACCTACGTTCTCAGCTTGCTGACAGAAGTGGAAACCTACGTTCTCTGGCTGACAGGGAAA  
AACGGCCTTTATCCTTGGCTGACCGGTAAGAACGGTCTGTATCCGTGGCTGACGGGCAA  
AATGGTCTCTACCCATGGACCGCGTGACGCAGAACCCTTGGACTGGTGTGACACAAAAC  
CCATGGACCGGAGTTACCCAGAATCCTTTCTGGCGTGGCGAAAATGGACGTAAAACTCGC  
AGTGCGTATGAGCGCATGTGTAACATCCTCAAAGGTAAACCCTTTTGGCGGGGGGAAAAC  
GGCCGGAAAACCCGCAGCGCTTACGAGCGCATGTGCAACATTCGAAAGGCAAACCATT  
TGGCGCGGTGAGAACGGCCGTAAAACACGTTTACGCGTACGAGCGGATGTGCAACATCTTA  
AAAGGCAAACCTCCGAAATACGTGAAGCAGAATACGCTCAAACCTGCCACGCCACCGAAA  
TACGTCAAGCAGAATACTCTGAAGTTAGCCACTCCGCCGAAATACGTCAAGCAGAATACT  
CTGAAGTTAGCCACTCCTTCAGCCGCCTTTGAAGACCTTCGCGTCTTGAGTTTTATCCGG  
GGTATCCAAGCGCAGCCTTTGAAGACCTGCGGGTCTTGAGCTTTATCCGCGGTTACCCT  
TCAGCCGCCTTTGAAGACCTTCGCGTCTTGAGTTTTATCCGGGGTTATCCAGAACTGCGT  
TCTCGCTATTGGGCGATCCGTACCCGCTCAGGGCCGGAGCTGCGGTGCGGCTACTGGGCG  
ATTCGTACGCGTAGTGGTCCAGAACTGCGGAGCCGCTACTGGGCTATTCGTACGCGGTCG  
GGTAATAACTCGAGAGGCTTTCTAGACATATGATGCAT

**FIG. 2A**



M H M R S P A K L L K E R G F F G A I A G F L E P P A K L L  
K E R G F F G A I A G F L E P P A K L L K E R G F F G A I A  
G F L E P S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L P S K A Y S N  
C Y P Y D V P D Y A S L P S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S  
L P S L L T E V E T Y V L S L L T E V E T Y V L S L L T E V  
E T Y V L W L T G K N G L Y P W L T G K N G L Y P W L T G K  
N G L Y P W T G V T Q N P W T G V T Q N P W T G V T Q N P F  
W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K P F W R G E N  
G R K T R S A Y E R M C N I L K G K P F W R G E N G R K T R  
S A Y E R M C N I L K G K P P K Y V K Q N T L K L A T P P K  
Y V K Q N T L K L A T P P K Y V K Q N T L K L A T P S A A F  
E D L R V L S F I R G Y P S A A F E D L R V L S F I R G Y P  
S A A F E D L R V L S F I R G Y P E L R S R Y W A I R T R S  
G P E L R S R Y W A I R T R S G P E L R S R Y W A I R T R S  
G

*FIG. 2B*

ATGAGATCTCCGGCGAAACTGCTGAAAGAACGTGGCTTTTTTGGCGCGATTGCGGGCTTT  
CTGGAAGGCAGCAAAGCGTATAGCAACTGCTATCCGTATGATGTGCCGGATTACGCGAGT  
CTGGGCTCTCTGCTGACCGAAGTGGAAACCTATGTGCTGGGCTGGCTGACCGGCAAAAAC  
GGCCTGTATCCGGTGTGGACCGGCGTGACCCAGAACGGCTTTTTGGCGTGGCGAAAACGGC  
CGTAAAACCCGTAGCGCGTATGAACGTATGTGCAACATCCTGAAAGGCAAAGGCCCGAAA  
TATGTGAAACAGAACACCCTGAAACTGGCCACCGGTGCGAGCGCGGCTTTGAGGACCTG  
CGTGTTCGAGCTTTATTTCGTGGCTATGGCGAACTGCGTAGCCGTTATTGGGCGATTTCGT  
ACCCGTAGCGGTGGTCCGCCGGCCAAACTGCTGAAAGAACCGCGTTTTCTTCGGTGCGATC  
GCCGGTTTTCTGGAAGGTAGCAAAGCCTACTCTAATTGTTACCCGTACGATGTTCCGGAT  
TACGCCAGCCTGGGTAGCCTGCTGACCGAAGTTGAAACCTACGTTCTGGGTGGCTGACC  
GGTAAAATGGTCTGTACCCGGTTTTGGACCGGTGTTACCCAGAATGGTTTTCTGGCGCGGT  
GAAAATGGTCGCAAACCCGCAGCGCCTACGAACGCATGTGTAATATTCTGAAAGGTAAA  
GGTCCGAAATACGTTAAACAGAATACCCTGAAACTGGCCACCGGCGCCAGCGCCGCTTC  
GAGGACCTGCGGTTCTGAGCTTCATCCGCGGTTACGGTGAAC TGCGCAGCCGCTACTGG  
GCCATCCGCACCCGCAGCGGTGGTCCGCCGGCGAAACTGCTGAAAGAACCGCGTTTTTTTT  
GGTGCCATTGCGGGTTTTCTGGAAGGTAGCAAAGCCTATTCTAACTGCTATCCGTACGAT  
GTTCCGGATTATGCGAGCCTGGGTAGCCTGCTGACCGAAGTGGAAACCTATGTTCTGGGT  
TGGCTGACCGGCAAAAACGGTCTGTATCCGGTTTTGGACCGGTGTGACCCAGAACGGTTTTT  
TGGCGCGGTGAAAACGGCCGTAAAACCCGCAGCGCCTATGAACGCATGTGCAACATTCTG  
AAAGGCAAAGGTCCGAAATACGTGAAACAGAACACCCTGAAACTGGCCACCGGCGCGAGC  
GCGGCCTTTGAGGACCTGCGGTTCTGAGCTTTATTTCGCGGCTATGGTGAAC TGCGCAGC  
CGCTATTGGGCGATTTCGTACCCGCAGCGGCGGCTAATAACTCGAGAAGCTTTCTAGACAT  
ATGATGCATGAGCTC

**FIG. 3A**

M R S P A K L L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S N C  
Y P Y D V P D Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G K N  
G L Y P V W T G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E R M  
C N I L K G K G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E D L  
R V L S F I R G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A K L  
L K E R G F F G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D  
Y A S L G S L L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T  
G V T Q N G F W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K  
G P K Y V K Q N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R  
G Y G E L R S R Y W A I R T R S G G P P A K L L K E R G F F  
G A I A G F L E G S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L G S L  
L T E V E T Y V L G W L T G K N G L Y P V W T G V T Q N G F  
W R G E N G R K T R S A Y E R M C N I L K G K G P K Y V K Q  
N T L K L A T G A S A A F E D L R V L S F I R G Y G E L R S  
R Y W A I R T R S G G

**FIG. 3B**

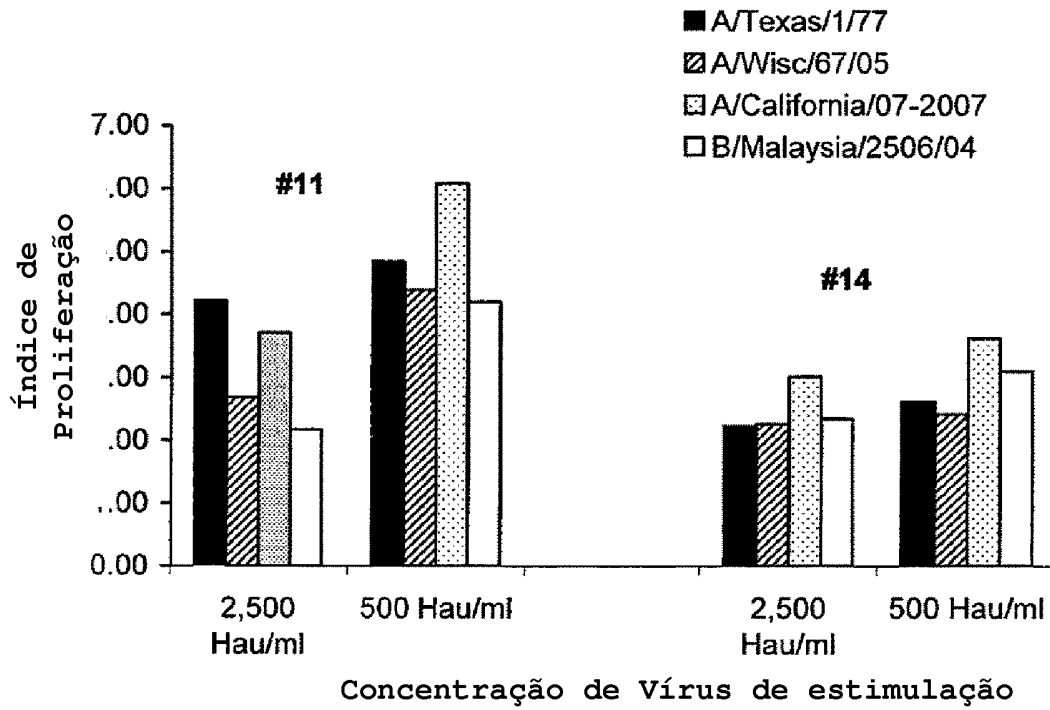


FIG. 4

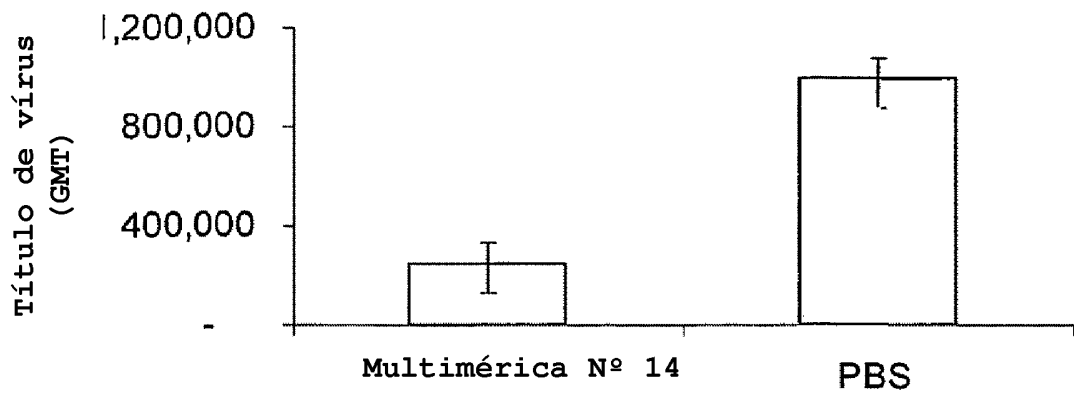


FIG. 5

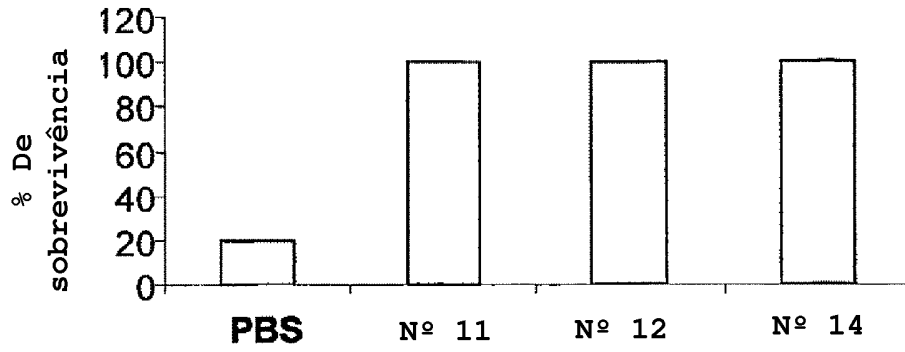


FIG. 6A

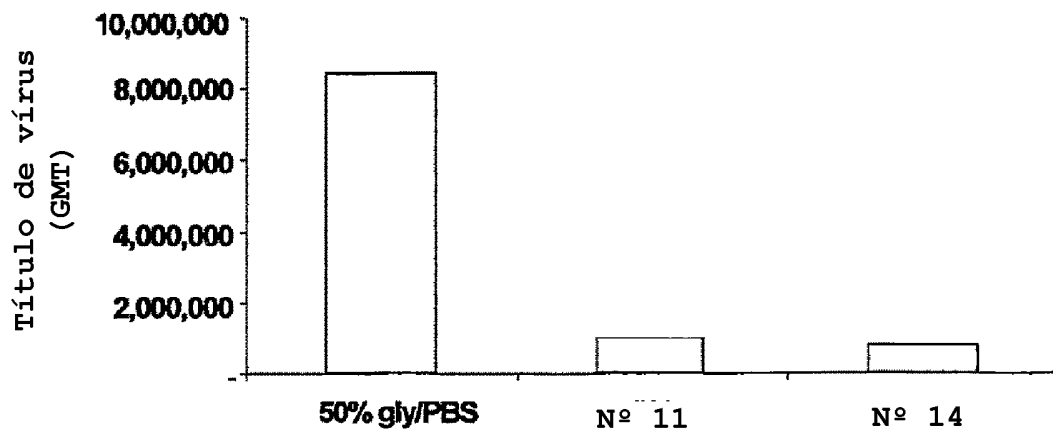


FIG. 6B

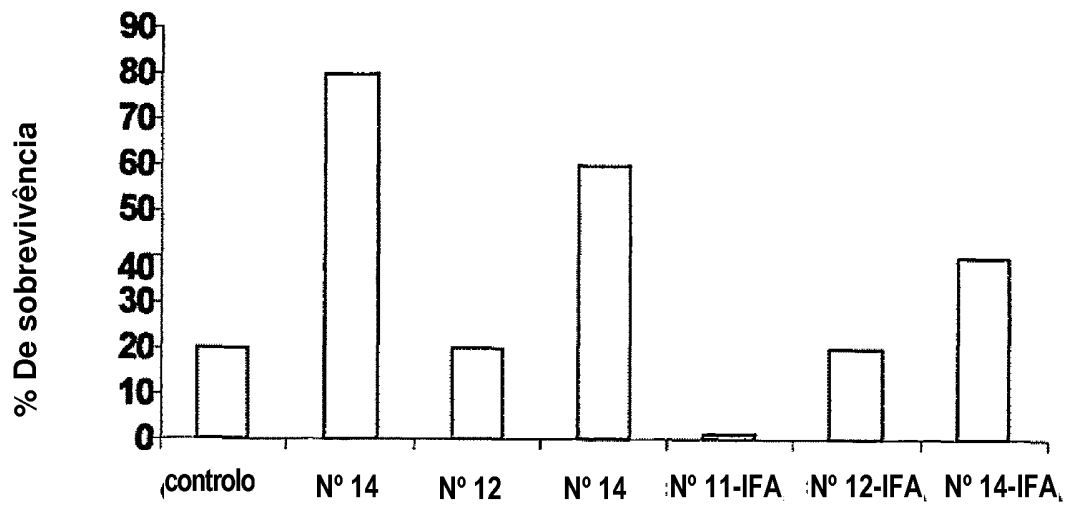


FIG. 7