



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112014023900-2 A2



(22) Data do Depósito: 12/03/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 24/11/2020

(54) **Título:** POLIPEPTÍDEO DE HEMAGLUTIMINA DE INFLUENZA RECOMBINANTE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, CÉLULA ISOLADA, PARTÍCULA SEMELHANTE AO VÍRUS DA INFLUENZA, PROTEÍNA DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, E USO

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/11; C12N 15/44; A61K 39/145; A61K 31/16.

(30) **Prioridade Unionista:** 30/03/2012 US 61/617,815.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION.

(72) **Inventor(es):** TED M. ROSS; DONALD M. CARTER; COREY J. CREVAR.

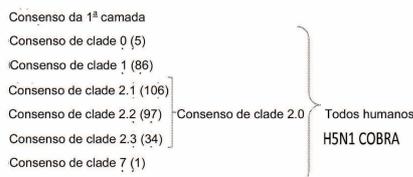
(86) **Pedido PCT:** PCT US2013030530 de 12/03/2013

(87) **Publicação PCT:** WO 2013/148164 de 03/10/2013

(85) **Data da Fase Nacional:** 26/09/2014

(57) **Resumo:** POLIPEPTÍDEO DE HEMAGLUTIMINA DE INFLUENZA RECOMBINANTE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, CÉLULA ISOLADA, PARTÍCULA SEMELHANTE AO VÍRUS DA INFLUENZA, PROTEÍNA DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, E USO. A presente invenção refere-se a geração de polipeptídeos de HA de influenza H5N1 e H1N1 otimizados para evocar uma resposta imune amplamente reativa aos isolados do vírus influenza. Os polipeptídeos de HA otimizados foram desenvolvidos através de uma série de alinhamentos de proteína HA, e geração subsequente de sequências de consenso, com base em isolados de influenza H5N1 e H1N1. Fornecidos aqui são polipeptídeos de HA de influenza H5N1 e H1N1 otimizados, e composições, proteínas de fusão e VLPs compreendendo os polipeptídeos de HA. Fornecidas ainda são sequências de ácido nucleico otimizadas de códon que codificam os polipeptídeos de HA. Métodos de evocar uma resposta imune contra vírus influenza em um indivíduo também são fornecidos pela presente descrição.

PATH H5N1 COBRA



**"POLIPEPTÍDEO DE HEMAGLUTIMINA DE INFLUENZA RECOMBINANTE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, CÉLULA ISOLADA, PARTÍCULA SEMELHANTE AO VÍRUS DA INFLUENZA, PROTEÍNA DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, E USO".**

**REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS**

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Nº 61/617.815, depositado em 30 de Março de 2012, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

**CAMPO**

[002] Esta descrição diz respeito a proteínas hemaglutinina da gripe otimizadas que evocam respostas imunes amplamente reativas aos vírus influenza H5N1 e H1N1, e seu uso como vacinas.

**ANTECEDENTES**

[003] O vírus influenza é um membro da família *Orthomyxoviridae*. Existem três subtipos de vírus influenza, designados influenza A, influenza B, e influenza C. O vírion influenza contém um genoma de RNA de sentido negativo segmentado, que codifica as proteínas seguintes: hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA), matriz (M1), proteína de canal de íon protônico (M2), nucleoproteína (NP), proteína 1 básica de polimerase (PB1), proteína 2 básica de polimerase (PB2), proteína ácida de polimerase (PA), e proteína 2 não estrutural (NS2). As proteínas HA, NA, M1, e M2 são associadas à membrana, ao passo que NP, PB1, PB2, PA, e NS2 são proteínas associadas a nucleocapsídeo. A proteína M1 é a proteína mais abundante em partículas de influenza. As proteínas HA e NA são glicoproteínas de envelope, responsáveis pela fixação do vírus e penetração das partículas virais na célula, e as fontes dos principais epítopos imunodominantes para neutralização do vírus e imunidade protetiva. Tanto proteínas HA quanto NA são consideradas os componentes mais importantes para vacinas profiláticas contra a gripe.

[004] Todo ano, a gripe sazonal causa mais de 300.000 hospitali-

zações e 36.000 mortes apenas nos E.U.A. (Simonsen *et al.*, *Lancet Infect Dis* 7:658 - 66, 2007). A emergência do novo vírus influenza H1N1 em 2009 demonstrou quão rapidamente uma nova pandemia de gripe pode estender-se através do mundo.

[005] Existem correntemente dois métodos de vacina contra gripe licenciados nos Estados Unidos - a vacina fragmentada, inativada e a vacina com vírus atenuado vivo. As vacinas inativadas podem induzir eficientemente respostas imunes humorais, mas geralmente apenas respostas imunes celulares deficientes. Vacinas com vírus vivo não podem ser administradas a pacientes imunocomprometidas ou grávidas devido ao seu risco aumentado de infecção. Assim, uma necessidade existe para uma vacina contra o vírus da gripe amplamente protetiva.

### SUMÁRIO

[006] Descrita aqui é a geração de polipeptídeos de HA de influenza H5N1 e H1N1 computacionalmente otimizados para evocar uma resposta imune amplamente reativa ao vírus influenza. Os polipeptídeos de HA otimizados foram desenvolvidos através de uma série de alinhamentos de proteína HA, e geração subsequente de sequências de consenso com base em selecionado isolados de vírus influenza H5N1 e H1N1.

[007] Fornecidos aqui são polipeptídeos de HA de influenza recombinantes tendo uma sequência de aminoácido otimizada para evocar uma resposta imune amplamente reativa contra influenza H5N1 ou H1N1, em que o polipeptídeo de HA compreende ou consiste na sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de HA de influenza carece do resíduo de metionina N-terminal.

[008] Moléculas de ácido nucleico isoladas e vetores que codificam os polipeptídeos de HA recombinantes também são fornecidas

pela presente descrição. Fornecidas ainda são células isoladas compreendendo tais vetores.

[009] Também fornecidas são partículas semelhantes ao vírus influenza (VLPs) e proteínas de fusão compreendendo os polipeptídeos de HA otimizados divulgados aqui.

[0010] Fornecidas ainda são composições que incluem os polipeptídeos de HA de influenza otimizados, proteínas de fusão ou VLPs divulgados aqui em um carregador farmacologicamente aceitável. Métodos de evocar uma resposta imune contra vírus influenza em um indivíduo administrando-se as composições, proteínas de fusão ou VLPs divulgadas também são fornecidos pela presente descrição.

[0011] Também fornecidos são métodos de imunizar um indivíduo contra vírus influenza administrando-se ao indivíduo uma composição compreendendo uma VLP que contém um polipeptídeo de HA otimizado.

[0012] Os objetivos, características, e vantagens precedentes e outros da invenção tornar-se-ão mais evidentes a partir da descrição detalhada seguinte, que procede com referência às figuras anexas.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0013] A FIG. 1 é um esquematismo que resume o processo para gerar uma sequência de HA COBRA usando 426 isolados de H5N1 humanos de clades 0, 1, 2,1, 2,2, 2,3 e 7, que é referida aqui como a HÁ "PATH H5N1 COBRA".

[0014] A FIG. 2 é um esquematismo que resume o processo para gerar uma sequência de HA COBRA usando 205 isolados do vírus influenza H1N1 humanos e suínos, que é referida aqui como a HÁ "PATH H1N1 COBRA".

[0015] A FIG. 3 é um gráfico que mostra títulos de HAI contra cepas de inoculação de clade 1 e clade 2 a seguir da vacinação com VLPs contendo a sequência de HA PATH H5N1 COBRA (SEQ ID NO:

1), VLPs contendo uma sequência de HA COBRA de vírus influenza clade 2 humana (COBRA-2 humana), ou VLPs contendo HA de vírus influenza de cisne-bravo (A/Cisne-bravo/Mongólia/244/2005). Vacinações (3 µg) foram realizadas em 0 e 3 semanas com adjuvante (Imject<sup>®</sup>).

[0016] A FIG. 4 é um gráfico mostrando o peso corpóreo de animais vacinados com VLPs contendo a sequência de HA PATH H5N1 COBRA (SEQ ID NO: 1), VLPs contendo a sequência de HA COBRA-2 humana, ou VLPs de cisne-bravo e subsequentemente inoculados com vírus de clade 2.1 da Indonésia de 5000 PFU (A/Indonésia/5/2005). Vacinações (3 µg) foram realizadas em 0 e 3 semanas com adjuvante (Imject<sup>®</sup>); a inoculação viral ocorreu durante a semana 5.

[0017] A FIG. 5 é um gráfico mostrando o peso corpóreo de animais vacinados com VLPs contendo a sequência de HA PATH H5N1 COBRA (SEQ ID NO: 1) e subsequentemente inoculados com vírus de clade 1 do Vietnã de 5000 PFU (A/Vietnã/1203/2004). Vacinações (3 µg) foram realizadas em 0 e 3 semanas com adjuvante (Imject<sup>®</sup>); a inoculação viral ocorreu durante a semana 5.

[0018] A FIG. 6 é um gráfico mostrando o peso corpóreo de animais vacinados com VLPs contendo a sequência de HA PATH H5N1 COBRA (SEQ ID NO: 1), VLPs contendo a sequência de HA COBRA-2 humana, ou VLPs de cisne-bravo, e subsequentemente inoculados com vírus de clade 1 do Vietnã. Uma única vacinação (3 µg) foi realizada na semana 0 com adjuvante (Imject<sup>®</sup>), seguido por inoculação viral durante a semana 4.

[0019] A FIG. 7 é um gráfico mostrando a porcentagem de sobrevivência de animais vacinados com VLPs contendo a sequência de HA PATH H5N1 COBRA (SEQ ID NO: 1), VLPs contendo a sequência de HA COBRA-2 humana, ou VLPs de cisne-bravo, e subsequentemente

inoculados com vírus de clade 1 do Vietnã. Uma única vacinação (3 µg) foi realizada na semana 0 sem adjuvante, seguido por inoculação viral durante a semana 4.

[0020] A FIG. 8 é um gráfico mostrando o peso corpóreo de animais vacinados com VLPs contendo a sequência de HA PATH H5N1 COBRA (SEQ ID NO: 1), VLPs contendo a sequência de HA COBRA-2 humana, ou VLPs de cisne-bravo, e subsequentemente inoculados com vírus de clade 1 do Vietnã. Uma única vacinação em uma dose de 0,6 µg foi realizada na semana 0 com adjuvante (Imject<sup>®</sup>), seguido por inoculação viral durante a semana 4.

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[0021] As sequências de aminoácido listadas na listagem de sequência anexa são mostradas usando código de três letras para aminoácidos, como definido em 37 C.F.R. 1.822. A listagem de sequência é submetida como um arquivo de texto ASCII, criado em 7 de Fevereiro de 2013, 10,0 KB, que é incorporado por referência aqui. Na listagem de sequência anexa:

[0022] SEQ ID NO: 1 é uma sequência de aminoácido COBRA para HA de influenza H5N1 ("PATH H5N1 COBRA").

[0023] SEQ ID NO: 2 é uma sequência de aminoácido COBRA para HA de influenza H1N1 ("PATH H1N1 COBRA").

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

##### I. Abreviações

[0024] COBRA: antígeno amplamente reativo computacionalmente otimizado

[0025] HA: hemaglutinina

[0026] HAI: inibição de hemaglutinação

[0027] HRP: peroxidase de raiz forte

[0028] M1: proteína 1 de matriz

[0029] NA: neuraminidase

[0030] PFU: unidade de forma de placa

[0031] VLP: partícula semelhante a vírus

## **II. Termos e Métodos**

[0032] A menos que de outro modo observado, termos técnicos são usados de acordo com uso convencional. Definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas em Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

[0033] De modo a facilitar a revisão das várias modalidades da descrição, as explicações seguintes de termos específicos são fornecidas:

[0034] Adjuvante: Uma substância ou veículo que não especificamente realça a resposta imune a um antígeno. Adjuvantes podem incluir uma suspensão de minerais (alume, hidróxido de alumínio, ou fosfato) na qual o antígeno é adsorvido; ou emulsão água-em-óleo em que a solução de antígeno é emulsificada em óleo mineral (por exemplo, adjuvante incompleto de Freund), algumas vezes com a inclusão de micobactérias mortas (adjuvante completo de Freund) para realçar ainda a antigenicidade. Oligonucleotídeos imunoestimuladores (tais como aqueles incluindo um motivo de CpG) também podem ser usados como adjuvantes (por exemplo, ver as Patentes U.S. N<sup>os</sup> 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; 6.339.068; 6.406.705; e 6.429.199). Adjuvantes também incluem moléculas biológicas, tais como moléculas coestimuladoras. Adjuvantes biológicos exemplares incluem IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L e 41 BBL.

[0035] Administração: como usado aqui, administrar uma composição a um indivíduo significa fornecer, aplicar ou ligar a composição em contato com o indivíduo. A administração pode ser realizada por qualquer uma de várias vias, tais como, por exemplo, tópica, oral, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intratecal e intradérmica.

[0036] Anticorpo: uma molécula de imunoglobulina produzida por células linfoides B com uma sequência de aminoácido específica. Anticorpos são evocados em seres humanos ou outros animais por um antígeno específico (imunógeno). Anticorpos são caracterizados reagindo-se especificamente com o antígeno em algum modo demonstrável, anticorpo e antígeno todos sendo definidos em termos do outro. "Evocar uma resposta do anticorpo" refere-se à capacidade de um antígeno ou outra molécula de induzir a produção de anticorpos.

[0037] Antígeno: um composto, composição, ou substância que podem estimular a produção de anticorpos ou uma resposta de célula T em um animal, incluindo composições que são injetadas ou absorvidas em um animal. Um antígeno reage com os produtos de imunidade humoral ou celular específica, incluindo aqueles induzidos por imunógenos heterólogos. Em algumas modalidades das composições e métodos divulgados, o antígeno é uma proteína HA de influenza.

[0038] Otimizado de códon: um ácido nucleico "otimizado de códon" refere-se a uma sequência de ácido nucleico que foi alterada tal que os códons são ideais para expressão em um sistema particular (tal como uma espécie particular ou grupo de espécies). Por exemplo, uma sequência de ácido nucleico pode ser otimizada para expressão em células mamíferas. A otimização de códon não altera a sequência de aminoácido da proteína codificada.

[0039] Proteína de fusão: uma proteína gerada por expressão de uma sequência de ácido nucleico engendrada das sequências de áci-

do nucleico que codificam pelo menos uma porção de duas proteínas diferentes (heterólogas). Para criar uma proteína de fusão, as sequências de ácido nucleico devem estar na mesma estrutura de leitura e não contêm nenhum códon de parada interno. Por exemplo, uma proteína de fusão pode incluir uma HA de influenza fundida a uma proteína heteróloga.

[0040] Hemaglutinina (HA): uma glicoproteína da superfície do vírus influenza. HA medeia a ligação da partícula viral a uma célula hospedeira e subsequente entrada do vírus na célula hospedeira. As sequências de nucleotídeo e aminoácido de numerosas proteínas HA de influenza são conhecidas na técnica e estão publicamente disponíveis, tal como através da base de dados de NCBI Influenza Virus Resource (Bao *et al.*, *J Virol* 82:596 - 601, 2008). HA (junto com NA) é um dos dois determinantes antigênicos do vírus influenza principais.

[0041] Resposta imune: uma resposta de uma célula do sistema imune, tal como uma célula B, célula T, macrófago ou polimorfonucleócito, a um estímulo tal como um antígeno ou vacina. Uma resposta imune pode incluir qualquer célula do corpo envolvida em uma resposta de defesa do hospedeiro, incluindo por exemplo, uma célula epitelial que secreta um interferon ou uma citocina. Uma resposta imune inclui, mas não é limitada a, uma resposta imune inata ou inflamação. Como usado aqui, uma resposta imune protetiva refere-se a uma resposta imune que protege um indivíduo da infecção (previne a infecção ou previne o desenvolvimento da doença associada com a infecção). Métodos de medir respostas imunes são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, medir a proliferação e/ou atividade de linfócitos (tais como células B ou T), secreção de citocinas ou quimiocinas, inflamação, produção de anticorpo e semelhantes.

[0042] Imunógeno: um composto, composição, ou substância que é capaz, sob condições apropriadas, de estimular uma resposta imu-

ne, tal como a produção de anticorpos ou uma resposta de célula T em um animal, incluindo composições que são injetadas ou absorvidas em um animal. Como usado aqui, uma "composição imunogênica" é uma composição compreendendo um imunógeno (tal como um polipeptídeo de HA).

[0043] Imunização: para tornar um indivíduo protegido de uma doença infecciosa, tal como por vacinação.

[0044] Vírus influenza: um vírus de RNA de filamento negativo segmentado que pertence à família *Orthomyxoviridae*. Existem três tipos de vírus influenza, A, B e C. Os vírus influenza A infectam uma variedade ampla de aves e mamíferos, incluindo seres humanos, cavalos, mamíferos marinhos, porcos, furões, e frangos. Em animais, a maioria dos vírus influenza A causam infecções localizadas suaves do trato respiratório e intestinal. Entretanto, cepas de influenza A altamente patogênicas, tais como H5N1, causam infecções sistêmicas em aves domésticas em que a mortalidade pode atingir 100 %. Em 2009, influenza H1N1 foi a causa mais comum de gripe humana. Uma nova cepa de H1N1 de origem suína emergiu em 2009 e foi declarada pandêmica pela Organização Mundial da Saúde. Esta cepa foi referida como "gripe suína." Vírus influenza A H1N1 também foram responsáveis pela gripe espanhola pandêmica em 1918, a epidemia de Fort Dix em 1976, e a gripe russa epidêmica em 1977 a 1978.

[0045] Isolado: um componente biológico "isolado" (tal como um ácido nucleico, proteína ou vírus) foi substancialmente separado ou purificado de outros componentes biológicos (tais como fragmentos celulares, ou outras proteínas ou ácidos nucleicos). Componentes biológicos que foram "isolados" incluem aqueles componentes purificados por métodos de purificação padrão. O termo também inclui ácidos nucleicos, proteínas ou vírus (ou VLPs) recombinantes, assim como ácidos nucleicos ou peptídeos quimicamente sintetizados.

[0046] Ligador: um ou mais aminoácidos que servem como um espaçador entre dois polipeptídeos de uma proteína de fusão.

[0047] Proteína de matriz (M1): Uma proteína estrutural do vírus influenza encontrada dentro do envelope viral. M1 é considerada funcionar na montagem e desenvolvimento.

[0048] Neuraminidase (NA): uma glicoproteína de membrana do vírus influenza. NA está envolvida na destruição do receptor celular para a HA viral clivando-se resíduos de ácido siálico terminais de porções de carboidrato nas superfícies de células infectadas. NA também cliva resíduos de ácido siálico de proteínas virais, impedindo a agregação de vírus. NA (junto com HA) é um dos dois determinantes antigênicos do vírus influenza principais.

[0049] Operavelmente ligado: uma primeira sequência de ácido nucleico é operavelmente ligada com uma segunda sequência de ácido nucleico quando a primeira sequência de ácido nucleico é colocada em uma relação funcional com a segunda sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor é operavelmente ligado a uma sequência de codificação se o promotor afeta a transcrição ou expressão da sequência de codificação. Geralmente, sequências de DNA operavelmente ligadas são contíguas e, onde necessário para unir duas regiões de codificação de proteína, na mesma estrutura de leitura.

[0050] Proteína HA de influenza otimizada: como usado aqui, "proteína HA de influenza otimizada" refere-se a uma sequência de consenso de proteína HA gerada por alinhamentos de sequência de isolados de vírus influenza H5N1 e H1N1 (como descrito nos exemplos 1 e 2 abaixo). Sequências de nucleotídeo que codificam proteínas HA otimizadas são otimizadas ainda para expressão em células mamíferas por intermédio de otimização de códon e otimização de RNA (tal como para aumentar a estabilidade do RNA). Proteínas HA de influenza otimizadas divulgadas aqui (e apresentadas aqui como SEQ ID NO: 1 e

SEQ ID NO: 2) também são referidas como sequências "COBRA" (antígeno amplamente reativo computacionalmente otimizado). Polipeptídeos de HA otimizados são designados para evocar respostas imunes amplamente reativas em um indivíduo. No contexto da presente descrição, "amplamente reativo" significa que a sequência de proteína evoca uma resposta imune em um indivíduo que é suficiente para inibir, neutralizar ou impedir a infecção de uma faixa ampla de vírus influenza (tais como a maioria ou todos os vírus influenza dentro de um subtipo específico). Em alguns exemplos, a proteína HA de influenza otimizada é capaz de evocar uma resposta imune, tal como uma resposta imune protetiva, contra a maioria ou todos os isolados do vírus influenza H5N1, ou a maioria ou todos os isolados do vírus influenza H1N1.

[0051] Epidemia: como usado aqui, uma "epidemia" de vírus influenza refere-se a uma coleção de isolados de vírus de dentro de um único país em um dado ano.

[0052] Veículos farmacêuticamente aceitáveis: os carregadores farmacêuticamente aceitáveis (veículos) úteis nesta descrição são convencionais. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975), descreve composições e formulações adequadas para a liberação farmacêutica de uma ou mais composições terapêuticas, tais como uma ou mais vacinas contra gripe, e agentes farmacêuticos adicionais.

[0053] Em geral, a natureza do carregador dependerá do modo particular de administração que é utilizado. Por exemplo, formulações parenterais usualmente compreendem fluidos injetáveis que incluem fluidos farmacêuticos e fisiologicamente aceitáveis tais como água, solução salina fisiológica, soluções salinas balanceadas, dextrose aquosa, glicerol ou semelhantes como um veículo. Para composições sólidas (por exemplo, formas de pó, pílula, tablete, ou cápsula), carregadores sólidos não tóxicos convencionais podem incluir, por exemplo,

graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, ou estearato de magnésio. Além de carregadores biologicamente neutros, composições farmacêuticas a serem administradas podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes umectantes ou emulsificadores, conservantes, e agentes tamponantes de pH e semelhantes, por exemplo acetato de sódio ou monolaurato de sorbitano.

[0054] Polipeptídeo: um polímero em que os monômeros são resíduos de aminoácido que são unidos através de ligações amida. Quando os aminoácidos são alfa-aminoácidos, o isômero óptico L ou o isômero óptico D pode ser usado. Os termos "polipeptídeo" ou "proteína" como usado aqui são intencionados a abranger qualquer sequência de aminoácido e incluem sequências modificadas tais como glicoproteínas. O termo "polipeptídeo" é especificamente intencionado a abranger proteínas que ocorrem naturalmente, assim como aquelas que são recombinante ou sinteticamente produzidas. O termo "resíduo" ou "resíduo de aminoácido" inclui referência a um aminoácido que é incorporado em uma proteína, polipeptídeo, ou peptídeo.

[0055] Prevenção, tratamento ou melhora de uma doença: "prevenção" de uma doença refere-se a inibir o desenvolvimento total de uma doença. "Tratamento" refere-se a uma intervenção terapêutica que melhora um sinal ou sintoma de uma doença ou condição patológica depois que ela começou a desenvolver. "Melhora" refere-se à redução no número ou severidade de sinais ou sintomas de uma doença.

[0056] Promotor: um promotor é um arranjo de sequências de controle de ácido nucleico que conduzem a transcrição de um ácido nucleico. Um promotor inclui sequências de ácido nucleico necessárias próximas ao sítio de início da transcrição. Um promotor também opcionalmente inclui elementos realçadores ou repressores distais. Um

"promotor constitutivo" é um promotor que é continuamente ativo e não está sujeito à regulação por sinais ou moléculas externos. Ao contrário, a atividade de um "promotor induzível" é regulada por um sinal ou molécula externos (por exemplo, um fator de transcrição). Em algumas modalidades aqui, o promotor é um promotor de CMV.

[0057] Purificado: o termo "purificado" não requer pureza absoluta; preferivelmente, ele é intencionado como um termo relativo. Assim, por exemplo, um peptídeo, proteína, vírus, VLP purificados ou outro composto ativo é um que é isolado inteiro ou em partes de proteínas naturalmente associadas e outros contaminantes. Em certas modalidades, o termo "substancialmente purificado" refere-se a um peptídeo, proteína, vírus, VLP ou outro composto ativo que foi isolado de uma célula, meio de cultura celular, ou outra preparação bruta e submetido ao fracionamento para remover vários componentes da preparação inicial, tais como proteínas, fragmentos celulares, e outros componentes.

[0058] Recombinante: um ácido nucleico, proteína, vírus ou VLP recombinante é um que tem uma sequência que não está ocorrendo naturalmente ou tem uma sequência que é fabricado por uma combinação artificial de dois segmentos de outro modo separados de sequência. Esta combinação artificial é frequentemente realizada por síntese química ou pela manipulação artificial de segmentos isolados de ácidos nucleicos, por exemplo, por técnicas de engenharia genética.

[0059] Indivíduo: organismos vertebrados multicelulares vivos, uma categoria que inclui tanto mamíferos humanos quanto não humanos, tais como primatas não humanos.

[0060] Quantidade terapeuticamente eficaz: uma quantidade de um agente específico suficiente para obter um efeito desejado em um indivíduo sendo tratado com este agente. Por exemplo, esta pode ser a quantidade de uma vacina contra o vírus da gripe útil para evocar uma resposta imune em um indivíduo e/ou para prevenir infecção ou

doença causadas por vírus influenza. Idealmente, no contexto da presente descrição, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma vacina contra gripe é uma quantidade suficiente para aumentar a resistência à, prevenir, melhorar, e/ou tratar a infecção causada por vírus influenza em um indivíduo sem causar um efeito citotóxico substancial no indivíduo. A quantidade eficaz de uma vacina contra gripe útil para aumentar a resistência à, prevenir, melhorar, e/ou tratar infecção em um indivíduo será dependente, por exemplo, do indivíduo sendo tratado, do modo de administração da composição terapêutica e outros fatores.

[0061] Transformada: uma célula transformada é uma célula em que foi introduzida uma molécula de ácido nucleico por técnicas de biologia molecular. Como usado aqui, o termo transformação abrange todas as técnicas pelas quais uma molécula de ácido nucleico poderia ser introduzida em uma tal célula, incluindo transfecção com vetores virais, transformação com vetores plasmídicos, e introdução de DNA nu por eletroporação, lipofecção, e aceleração por pistola de partículas.

[0062] Vacina: uma preparação de material imunogênico capaz de estimular uma resposta imune, administrada para a prevenção, melhora, ou tratamento de doença, tal como uma doença infecciosa. O material imunogênico pode incluir, por exemplo, microorganismos atenuados ou mortos (tais como vírus atenuados), ou proteínas antigênicas (incluindo VLPs), peptídeos ou DNA derivados dos mesmos. Vacinas podem evocar tanto respostas profiláticas (preventivas) quanto terapêuticas. Métodos de administração variam de acordo com a vacina, mas podem incluir inoculação, ingestão, inalação ou outras formas de administração. Inoculações podem ser liberadas por qualquer uma de várias vias, incluindo parenteral, tal como intravenosa, subcutânea ou intramuscular. Vacinas podem ser administradas com um adjuvante

para reforçar a resposta imune.

[0063] Vetor: um vetor é uma molécula de ácido nucleico que permite a inserção de ácido nucleico estranho sem interromper a capacidade do vetor de replicar e/ou integrar em uma célula hospedeira. Um vetor pode incluir sequências de ácido nucleico que permitem que ele replique em uma célula hospedeira, tal como uma origem de replicação. Um vetor insercional é capaz de inserir por si só em um ácido nucleico hospedeiro. Um vetor também pode incluir um ou mais genes marcadores selecionáveis e outros elementos genéticos. Um vetor de expressão é um vetor que contém as sequências reguladoras necessárias para permitir a **transcrição** e **tradução** de um gene ou genes inseridos. Em algumas modalidades da presente descrição, o vetor codifica uma proteína HA, NA ou M1 de influenza. Em algumas modalidades, o vetor é o vetor de expressão pTR600 (Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2002/0106798; Ross *et al.*, *Nat Immunol.* 1(2):102 - 103, 2000; Green *et al.*, *Vaccine* 20:242 - 248, 2001).

[0064] Partícula semelhante a vírus (VLP): partículas virais compostas de uma ou mais proteínas estruturais virais, mas carecendo do genoma viral. Porque VLPs carecem de um genoma viral, elas são não infecciosas. Além disso, VLPs podem ser frequentemente produzidas por expressão heteróloga e podem ser facilmente purificadas. A maioria de VLPs compreende pelo menos uma proteína de núcleo viral que conduz o desenvolvimento e liberação de partículas de uma célula hospedeira. Um exemplo de uma tal proteína de núcleo é influenza M1. Em algumas modalidades aqui, uma VLP de influenza compreende as proteínas HA, NA e/ou M1. VLPs de influenza podem ser produzidas por transfecção de células hospedeiras com plasmídeos que codificam as proteínas HA e NA, e opcionalmente a proteína M1. Depois da incubação das células transfectadas por um tempo apropriado para levar em consideração a expressão da proteína (tal como por aproxi-

madamente 72 horas), VLPs podem ser isoladas de sobrenadantes de cultura celular. O Exemplo 4 fornece um protocolo exemplar para purificar VLPs de influenza de sobrenadantes celulares. Neste exemplo, VLPs são isoladas por centrifugação em velocidade baixa (para remover fragmentos celulares), filtração a vácuo e ultracentrifugação através de 20 % de glicerol. Outros métodos de produzir VLPs de influenza são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Publicações de Pedido de Patente U.S. N<sup>os</sup> 2006/0263804; 2008/0031895; 2010/0166769; e 2010/0239610).

[0065] A menos que de outro modo explicado, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica à qual esta descrição pertence. Os termos singulares "um," "uma," e "o", "a" incluem referentes no plural a menos que o contexto claramente indique de outro modo. "Compreendendo A ou B" significa incluindo A, ou B, ou A e B. Deve ser entendido ainda que todos os tamanhos de base ou tamanhos de aminoácido, e todos os valores de peso molecular ou massa molecular, fornecidos para ácidos nucleicos ou polipeptídeos são aproximados, e são fornecidos para descrição. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente descrição, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outras referências mencionadas aqui são incorporados por referência em sua totalidade. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo as explanações de termos, controlará. Além disso, os materiais, métodos, e exemplos são ilustrativos apenas e não intencionados a serem limitantes.

### **III. Visão Geral de Várias Modalidades**

[0066] Descrita aqui é a geração de polipeptídeos de HA de influenza H5N1 e H1N1 computacionalmente otimizados para evocar uma

resposta imune amplamente reativa ao vírus influenza. Os polipeptídeos de HA otimizados foram desenvolvidos através de uma série de alinhamentos de proteína HA, e geração subsequente de sequências de consenso com base em isolados de vírus influenza H5N1 e H1N1 selecionados. Os métodos usados para gerar as sequências de consenso de HÁ otimizadas são descritos nos exemplos 1 e 2, e mostrados nas FIGS. 1 e 2. As sequências de aminoácido de 2 polipeptídeos de HA específicos são apresentadas aqui como SEQ ID NO: 1 (H5N1) e SEQ ID NO: 2 (H1N1). A sequência de H5N1 foi gerada usando 426 isolados de H5N1 humanos de clades 0, 1, 2,1, 2,2, 2,3 e 7, e é referida aqui como a HÁ "PATH H5N1 COBRA". A sequência de H1N1 foi gerada usando 205 isolados do vírus influenza H1N1 humanos e suínos, e é referida aqui como a HÁ "PATH H1N1 COBRA".

[0067] Fornecidos aqui são polipeptídeos de HA de influenza recombinantes tendo uma sequência de aminoácido otimizada para evocar uma resposta imune amplamente reativa contra influenza H5N1 ou H1N1. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácido do polipeptídeo de HA compreende ou consiste na sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2.

[0068] Em outras modalidades, a sequência de aminoácido do polipeptídeo de HA compreende ou consiste na sequência de aminoácido dos resíduos 2 a 568 da SEQ ID NO: 1, ou resíduos 2 a 566 da SEQ ID NO: 2.

[0069] Fornecidas ainda são moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam um polipeptídeo de HA de influenza recombinante divulgado aqui. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é otimizada de códon para expressão em células mamíferas. A molécula de ácido nucleico é opcionalmente otimizada ainda para estabilidade do RNA.

[0070] Vetores compreendendo as moléculas de ácido nucleico

que codificam os polipeptídeos de HA recombinantes também são fornecidos pela presente descrição. O vetor pode ser qualquer vetor adequado para a expressão do polipeptídeo de HA, tal como um vetor de expressão mamífero. Em exemplos particulares, o vetor é o vetor de expressão pTR600 (Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2002/0106798, aqui incorporada por referência; Ross *et al.*, *Nat Immunol.* 1(2):102 - 103, 2000; Green *et al.*, *Vacina* 20:242 - 248, 2001).

[0071] Em alguns exemplos, o vetor inclui um promotor operavelmente ligado à sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de HA. Em exemplos particulares, o promotor é um promotor de CMV.

[0072] Também fornecidas são células isoladas compreendendo os vetores divulgados. Em alguns casos, a célula é qualquer tipo de célula adequado para a produção e expressão de VLPs, tal como uma célula mamífera.

[0073] Fornecidas ainda são VLPs de influenza compreendendo um polipeptídeo de HA otimizado divulgado aqui. As VLPs de influenza podem incluir ainda quaisquer proteínas de influenza adicionais necessárias para formar a partícula viral. Em algumas modalidades, as VLPs de influenza incluem ainda proteína neuraminidase (NA) de influenza, proteína de matriz (M1) de influenza, ou ambas.

[0074] Também fornecidas são VLPs de influenza compreendendo um polipeptídeo de HA de influenza divulgado aqui, produzido transfectando-se uma célula hospedeira com um vetor que codifica o polipeptídeo de HA, um vetor que codifica uma proteína NA de influenza e um vetor que codifica uma proteína M1 de influenza sob condições suficientes para levar em consideração a expressão das proteínas HA, M1 e NA.

[0075] Proteínas de fusão compreendendo um polipeptídeo de HA de influenza otimizado são fornecidas ainda pela presente descrição.

[0076] Também fornecidas aqui são composições compreendendo

uma proteína HA de influenza otimizada como divulgado aqui, ou uma proteína de fusão ou VLP compreendendo a proteína HA de influenza otimizada. Em algumas modalidades, as composições compreendem ainda um carregador farmacologicamente aceitável e/ou um adjuvante. Por exemplo, o adjuvante pode ser alume, adjuvante completo de Freund, um adjuvante biológico ou oligonucleotídeos imunoestimuladores (tais como oligonucleotídeos de CpG).

[0077] Fornecido ainda é um método de evocar uma resposta imune ao vírus influenza em um indivíduo administrando-se uma proteína HA de influenza otimizada, uma proteína de fusão compreendendo uma HA de influenza otimizada, VLPs contendo uma HA de influenza otimizada, ou composições destas, como divulgado aqui. Em algumas modalidades, o vírus influenza é um vírus influenza H5N1 ou H1N1. Em algumas modalidades, a proteína HA, proteína HA de fusão ou VLP podem ser administradas usando qualquer via adequada de administração, tal como, por exemplo, intramuscular, intranasal ou oral. Em algumas modalidades, a proteína HA, proteína de fusão ou VLP é administrada como uma composição compreendendo ainda um carregador farmacologicamente aceitável e/ou um adjuvante. Por exemplo, o adjuvante pode ser alume, adjuvante completo de Freund, um adjuvante biológico ou oligonucleotídeos imunoestimuladores (tais como oligonucleotídeos de CpG).

[0078] Também fornecido é um método de imunizar um indivíduo contra vírus influenza administrando-se ao indivíduo VLPs contendo uma proteína HA de influenza otimizada descrita aqui, ou administrando-se uma composição destas. Em algumas modalidades do método, a composição compreende ainda um carregador farmacologicamente aceitável e/ou um adjuvante. Por exemplo, o adjuvante pode ser alume, adjuvante completo de Freund, um adjuvante biológico ou oligonucleotídeos imunoestimuladores (tais como oligonucleotídeos de

CpG). Em algumas modalidades, as VLPs (ou composições destas) são administradas intramuscularmente.

[0079] Em algumas modalidades dos métodos de evocar uma resposta imune ou imunizar um indivíduo, o indivíduo é administrado cerca de 1 a cerca de 25 µg das VLPs contendo uma proteína HA otimizada. Em exemplos particulares, o indivíduo é administrado cerca de 5 a cerca de 20 µg das VLPs, ou cerca de 10 a cerca de 15 µg das VLPs. Em um exemplo não limitante específico, p indivíduo é administrado cerca de 15 µg das VLPs. Entretanto, uma pessoa de habilidade na técnica é capaz de determinar uma quantidade terapeuticamente eficaz (por exemplo uma quantidade que fornece proteção contra infecção por vírus influenza H5N1 ou H1N1) de VLPs para administrar a um indivíduo.

#### **IV. Influenza**

[0080] Vírus influenza são vírus de RNA de filamento negativo segmentados que pertencem à família *Orthomyxoviridae*. Existem três tipos de vírus influenza, A, B e C. Vírus influenza A infectam uma variedade ampla de aves e mamíferos, incluindo seres humanos, cavalos, mamíferos marinhos, porcos, furões, e frangos. Em animais, a maioria dos vírus influenza A causa infecções localizadas suaves do trato respiratório e intestinal. Entretanto, cepas de influenza A altamente patogênicas, tais como H5N1, causam infecções sistêmicas em aves domésticas em que a mortalidade pode atingir 100 %. Animais infectados com influenza A frequentemente agem como um reservatório para os vírus influenza e certos subtipos foram mostrados cruzar a barreira da espécie para seres humanos.

[0081] Vírus influenza A podem ser classificados em subtipos com base em variações alélicas em regiões antigênicas de dois genes que codificam glicoproteínas de superfície, isto é, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) que são necessárias para fixação viral e liberação

celular. Correntemente, dezesseis subtipos de HA (H1 a H16) e nove variantes antigênicas de NA (N1 a N9) são conhecidos para o vírus influenza A. Previamente, apenas três subtipos foram conhecidos circular em seres humanos (H1N1, H1N2, e H3N2). Entretanto, nos últimos anos, o subtipo patogênico de H5N1 de influenza A aviária foi relatado cruzar a barreira de espécie e infectar seres humanos como documentado em Hong Kong em 1997 e 2003, levando à morte de vários pacientes.

[0082] Em 2009, influenza H1N1 foi a causa mais comum de gripe humana. Uma nova cepa de H1N1 de origem suína emergiu em 2009 e foi declarada pandêmica pela Organização Mundial da Saúde. Esta cepa foi referida como "gripe suína." Vírus influenza A H1N1 também foram responsáveis pela gripe espanhola pandêmica em 1918, a epidemia de Fort Dix em 1976, e a gripe russa epidêmica em 1977 a 1978.

[0083] O genoma do vírus influenza segmentado contém oito segmentos de gene de RNA de sentido negativo (nsRNA) (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA e NA) que codificam pelo menos dez polipeptídeos, incluindo proteínas de RNA polimerase dirigidas ao RNA (PB2, PB1 e PA), nucleoproteína (NP), neuraminidase (NA), hemaglutinina (subunidades HA1 e HA2), as proteínas de matriz (M1 e M2) e as proteínas não estruturais (NS1 e NS2) (Krug *et al.*, *Em "The Influenza Viruses,"* R. M. Krug, ed., Plenum Press, N.Y., 1989, páginas 89 152).

[0084] A capacidade do vírus influenza de causar doença muito difundida é devido à sua capacidade de evadir o sistema imune passando-se por mudança antigênica, que acredita-se que ocorra quando um hospedeiro é infectado simultaneamente tanto com um vírus influenza animal quanto um vírus influenza humano. Durante a mutação e reclassificação no hospedeiro, o vírus pode incorporar um gene de proteína de superfície de HA e/ou NA de um outro vírus em seu geno-

ma, desse modo produzindo um novo subtipo de influenza e evadindo o sistema imune.

[0085] HA é uma glicoproteína de superfície viral geralmente compreendendo aproximadamente 560 aminoácidos e representando 25 % da proteína viral total. Ela é responsável pela adesão da partícula viral à, e sua penetração em, uma célula hospedeira nos estágios iniciais da infecção. A clivagem do precursor HA0 viral nos subfragmentos HA1 e HA2 é uma etapa necessária adequada para o vírus infectar uma célula. Assim, a clivagem é necessária de modo a converter novas partículas virais em uma célula hospedeira em vírions capazes de infectar novas células. A clivagem é conhecida ocorrer durante o transporte da proteína de membrana HA0 integral do retículo endoplasmático da célula infectada à membrana plasmática. No curso de transporte, a hemaglutinina passa por uma série de modificações co- e pós-traducionais incluindo clivagem proteolítica da HA precursora no fragmento amino-terminal HA1 e o carbóxi terminal HA2. Uma das principais dificuldades em cultivar cepas de influenza em cultura de tecido primária ou linhagens de célula estabelecidas surge da necessidade para ativação de clivagem proteolítica da hemaglutinina de influenza na célula hospedeira.

[0086] Embora seja conhecido que uma HA não clivada possa mediar a fixação do vírus aos seus receptores contendo ácido neurâmico em uma superfície celular, ela não é capaz da etapa seguinte no ciclo infeccioso, que é a fusão. Foi relatado que a exposição do término amino hidrofóbico de HA2 por clivagem é necessária de modo que ele possa ser inserido na célula alvo, desse modo formando uma ponte entre o vírus e a membrana celular alvo. Este processo é seguido por fusão das duas membranas e entrada do vírus na célula alvo.

[0087] A ativação proteolítica de HA envolve clivagem em um resíduo de arginina por uma endoprotease semelhante à tripsina, que é

frequentemente uma enzima intracelular que é dependente de cálcio e tem um pH neutro ideal. Visto que as proteases de ativação são enzimas celulares, o tipo de célula infectada determina se a HA é clivada. A HA dos vírus influenza mamíferos e os vírus influenza aviários não patogênicos é suscetível à clivagem proteolítica apenas em um número restrito de tipos de célula. Por outro lado, HA de vírus aviários patogênicos entre os subtipos H5 e H7 são clivados por proteases presentes em uma faixa ampla de células hospedeiras diferentes. Assim, existem diferenças na faixa de hospedeiro resultantes das diferenças na capacidade de clivagem da hemaglutinina que são correlacionadas com as propriedades patogênicas do vírus.

[0088] Neuraminidase (NA) é uma segunda glicoproteína de membrana dos vírus influenza. A presença de NA viral mostrou ser importante para gerar uma resposta imune protetiva multifacetada contra um vírus infectante. Para a maioria dos vírus influenza A, NA é de 413 aminoácidos em comprimento, e é codificada por um gene de 1413 nucleotídeos. Nove subtipos de NA diferentes foram identificados em vírus influenza (N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 e N9), todos os quais foram encontrados entre aves selvagens. NA está envolvida na destruição do receptor celular para a HA viral clivando-se os resíduos de ácido neuramínico terminais (também chamado ácido siálico) de porções de carboidrato nas superfícies de células infectadas. NA também cliva resíduos de ácido siálico de proteínas virais, impedindo a agregação dos vírus. Usando este mecanismo, postula-se que NA facilita a liberação da progênie viral impedindo-se partículas virais recentemente formadas de acumular ao longo da membrana celular, assim como promovendo-se o transporte do vírus através do muco presente na superfície mucosa. NA é um determinante antigênico importante que está sujeito à variação antigênica.

[0089] Além das proteínas de superfície HA e NA, o vírus influenza

compreende seis genes internos adicionais, que dão origem a oito proteínas diferentes, incluindo os genes de polimerase PB1, PB2 e PA, proteínas de matriz M1 e M2, nucleoproteína (NP), e proteínas não estruturais NS1 e NS2 (Horimoto *et al.*, *Clin Microbiol Rev.* 14(1):129 - 149, 2001).

[0090] De modo a ser empacotado em vírions da progênie, o RNA viral é transportado do núcleo como um complexo de ribonucleoproteína (RNP) composto das três proteínas polimerase do vírus influenza, a nucleoproteína (NP), e o RNA viral, em associação com a proteína de matriz 1 (M1) do vírus influenza e proteína de exportação nuclear (Marsh *et al.*, *J Virol*, 82:2295 - 2304, 2008). A proteína M1 que encontra-se dentro do envelope é considerada funcionar na montagem e desenvolvimento. Um número limitado de proteínas M2 é integrado nos vírions (Zebedee, *J. Virol.* 62:2762 - 2772, 1988). Eles formam tetrâmeros tendo atividade de canal de íon H<sup>+</sup>, e quando ativados pelo pH baixo em endossomas, acidificam o interior do vírion, facilitando seu não revestimento (Pinto *et al.*, *Cell* 69:517 - 528, 1992). Amantadina é um fármaco antigripal que previne a infecção viral interferindo-se com a atividade do canal iônico de M2, inibindo assim o não revestimento viral.

[0091] NS1, uma proteína não estrutural, tem múltiplas funções, incluindo regulação da junção e exportação nuclear de mRNAs celulares assim como estímulo da tradução. A principal função de NS1 parece ser contrariar a atividade de interferon do hospedeiro, visto que um vírus knockout de NS1 foi viável embora ele cresça menos eficientemente do que o vírus precursor em células não defeituosas de interferon (Garcia-Sastre, *Virology* 252:324 - 330, 1998).

[0092] NS2 foi detectado em partículas virais (Richardson *et al.*, *Arch. Virol.* 116:69 - 80, 1991; Yasuda *et al.*, *Virology* 196:249 - 255, 1993). O número médio de proteínas NS2 em uma partícula viral foi

estimado como sendo de 130 a 200 moléculas. Um ensaio de ligação *in vitro* mostra o contato direto de proteína-proteína entre M1 e NS2. Complexos de NS2-M1 também foram detectados por imunoprecipitação em lisatos celulares infectados com vírus. A proteína NS2 é considerada desempenhar um papel na exportação de RNP do núcleo através da interação com proteína M1 (Ward *et al.*, *Arch. Virol.* 140:2067 - 2073, 1995).

#### **V. VLPs de influenza e Administração Destas**

[0093] VLPs de influenza compreendendo uma HA otimizada (tal como a HA tendo a sequência de aminoácido apresentada como SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2) são fornecidas aqui. As VLPs de influenza são geralmente compostas das proteínas HA, NA e M1. A produção de VLPs de influenza foi descrita na técnica e está dentro das capacidades de uma pessoa de habilidade comum na técnica. Por exemplo, VLPs de influenza podem ser produzidas por transfecção de células hospedeiras com plasmídeos que codificam as proteínas HA, NA e M1. Depois da incubação das células transfectadas por um tempo apropriado para levar em consideração a expressão da proteína (tal como por aproximadamente 72 horas), VLPs podem ser isoladas de sobrenadantes de cultura celular. O Exemplo 4 abaixo fornece um protocolo exemplar para purificar VLPs de influenza de sobrenadantes celulares. Neste exemplo, VLPs são isoladas por centrifugação em velocidade baixa (para remover fragmentos celulares), filtração a vácuo e ultracentrifugação através de 20 % de glicerol.

[0094] As VLPs de influenza divulgadas aqui podem ser usadas como vacinas contra gripe para evocar uma resposta imune protetiva contra os vírus influenza H5N1 e H1N1.

[0095] VLPs de influenza, ou composições destas, podem ser administradas a um indivíduo por qualquer uma das vias normalmente usadas para introduzir vírus recombinante em um indivíduo. Métodos

de administração incluem, mas não são limitados a, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, parenteral, intravenosa, subcutânea, vaginal, retal, intranasal, inalação ou oral. A administração parenteral, tal como administração subcutânea, intravenosa ou intramuscular, é geralmente obtida por injeção. Injetáveis podem ser preparados em formas convencionais, como soluções ou suspensões líquidas, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção, ou como emulsões. Soluções e suspensões de injeção podem ser preparadas de pós estéreis, grânulos, e tabletes do tipo previamente descrito. A administração pode ser sistêmica ou local.

[0096] VLPs de influenza, ou composições destas, são administradas em qualquer maneira adequada, tal como com carregadores farmacologicamente aceitáveis. Carregadores farmacologicamente aceitáveis são determinados em parte pela composição particular sendo administrada, assim como pelo método particular usado para administrar a composição. Consequentemente, existe uma variedade ampla de formulações adequadas de composições farmacêuticas da presente descrição.

[0097] Preparações para administração parenteral incluem soluções, suspensões, e emulsões aquosas ou não aquosas estéreis. Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietilenoglicol, óleos vegetais tais como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis tais como oleato de etila. Carregadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo solução salina e meio tamponado. Veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactado, ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluido e nutriente, reabastecedores de eletrólito (tais como aqueles com base em dextrose de Ringer), e semelhantes. Conservantes e outros aditivos também podem estar presentes tais como,

por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, e gases inertes e semelhantes.

[0098] Algumas das composições podem ser potencialmente administradas como um sal de adição de ácido ou base farmacêuticamente aceitável, formado por reação com ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido perclorídrico, ácido nítrico, ácido tiociânico, ácido sulfúrico, e ácido fosfórico, e ácidos orgânicos tais como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malônico, ácido succínico, ácido maleico, e ácido fumárico, ou por reação com uma base inorgânica tal como hidróxido de sódio, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, e bases orgânicas tais como mono-, di-, trialkil e aril aminas e etanolaminas substituídas.

[0099] A administração pode ser realizada por doses únicas ou múltiplas. A dose administrada a um indivíduo no contexto da presente descrição deve ser suficiente para induzir uma resposta terapêutica benéfica em um indivíduo com o passar do tempo, ou para inibir ou prevenir infecção por vírus influenza H5N1 ou H1N1. A dose necessária variará de indivíduo a indivíduo dependendo da espécie, idade, peso e condição geral do indivíduo, da severidade da infecção sendo tratada, da composição particular sendo usada e seu modo de administração. Uma dose apropriada pode ser determinada por uma pessoa de habilidade comum na técnica usando apenas experimentação de rotina.

[00100] Fornecidas aqui são composições farmacêuticas que incluem uma quantidade terapêuticamente eficaz das VLPs de influenza sozinhas ou em combinação com um carregador farmacêuticamente aceitável. Carregadores farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, solução salina, solução salina tamponada, dextrose, água, glicerol, etanol, e combinações destes. O carregador e composição podem ser estéreis, e a formulação adapta-se ao modo de

administração. A composição também pode conter quantidades menores de agentes umectantes ou emulsificadores, ou agentes tamponantes de pH. A composição pode ser uma solução, suspensão, emulsão líquida, tablete, pílula, cápsula, formulação de liberação sustentada, ou pó. A composição pode ser formulada como um supositório, com aglutinantes e carregadores tradicionais tais como triglicerídeos. Formulações orais podem incluir carregadores padrão tais como graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, e carbonato de magnésio. Qualquer um dos carregadores farmacêuticos comuns, tais como solução salina estéril ou óleo de gergelim, podem ser usados. O meio também pode conter materiais adjuntos farmacêuticos convencionais tais como, por exemplo, sais farmacêuticamente aceitáveis para ajustar a pressão osmótica, tampões, conservantes e semelhantes. Outros meios que podem ser usados com as composições e métodos fornecidos aqui são solução salina normal e óleo de gergelim.

[00101] As VLPs de influenza descritas aqui podem ser administradas sozinhas ou em combinação com outros agentes terapêuticos para realçar a antigenicidade. Por exemplo, as VLPs de influenza podem ser administradas com um adjuvante, tal como adjuvante incompleto de Freund ou adjuvante completo de Freund.

[00102] Opcionalmente, uma ou mais citocinas, tais como IL-2, IL-6, IL-12, RANTES, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , ou IFN- $\gamma$ , um ou mais fatores de crescimento, tais como GM-CSF ou G-CSF; uma ou mais moléculas tais como OX-40L ou 41 BBL, ou combinações destas moléculas, podem ser usados como adjuvantes biológicos (ver, por exemplo, Salgaller *et al.*, 1998, *J. Surg. Oncol.* 68(2):122 - 38; Lotze *et al.*, 2000, *Cancer J. Sci. Am.* 6(Suppl 1):S61 - 6; Cao *et al.*, 1998, *Stem Cells* 16(Suppl 1):251 - 60; Kuiper *et al.*, 2000, *Adv. Exp. Med. Biol.* 465:381 - 90). Estas moléculas podem ser administradas sistemicamente (ou

localmente) ao hospedeiro.

[00103] Vários meios para induzir respostas celulares, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, são conhecidos. Lipídeos foram identificados como agentes capazes de auxiliar em iniciar CTL *in vivo* contra vários antígenos. Por exemplo, como descrito na Patente U.S. Nº 5.662.907, resíduos de ácido palmítico podem ser ligados aos grupos amino alfa e épsilon de um resíduo de lisina e depois ligados (por exemplo, por intermédio de um ou mais resíduos de ligação, tais como glicina, glicina-glicina, serina, serina-serina, ou semelhantes) a um peptídeo imunogênico. O peptídeo lipidado depois pode ser injetado diretamente em uma forma micelar, incorporado em um lipossoma, ou emulsificado em um adjuvante. Como um outro exemplo, lipoproteínas de *E. coli*, tais como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina podem ser usadas para iniciar CTL específica de tumor quando covalentemente ligada a um peptídeo apropriado (ver, Deres *et al.*, *Nature* 342:561, 1989). Além disso, como a indução de anticorpos neutralizantes também pode ser iniciada com a mesma molécula conjugada a um peptídeo que exhibe um epítipo apropriado, duas composições podem ser combinadas para evocar tanto respostas humorais quanto mediadas por célula onde esta é julgada desejável.

[00104] Embora a administração de VLPs contendo uma proteína HA otimizada seja exemplificada aqui, uma pessoa de habilidade na técnica entenderia que também é possível administrar a proteína HA de influenza otimizada por si só (na ausência de uma partícula viral) ou como uma proteína de fusão para evocar uma resposta imune em um indivíduo.

[00105] Os exemplos seguintes são fornecidos para ilustrar certas características e/ou modalidades particulares. Estes exemplos não devem ser interpretados a limitar a descrição às características ou modalidades particulares descritas.

EXEMPLOS**Exemplo 1: Geração de uma Sequência COBRA de Influenza H5N1**

[00106] Este exemplo descreve a geração de uma sequência de consenso COBRA de HA de influenza H5N1 usando 426 sequências de HA de influenza H5N1 humano de clades 0, 1, 2,1, 2,2, 2,3 e 7. A sequência COBRA resultante é referida como "PATH H5N1 COBRA."

[00107] Para gerar a sequência COBRA de HA de influenza H5N1 final, três camadas de sequências de consenso foram geradas (FIG. 1). Na primeira camada, seis sequências de consenso individuais foram geradas usando (1) 5 isolados de clade 0; (2) 86 isolados de clade 1; (3) 106 isolados de clade 2.1; (4) 97 isolados de clade 2.2; (5) 34 isolados de clade 2.3; e (6) 1 isolado de clade 7. Na segunda camada, uma sequência de consenso de clade 2 foi gerada usando as três sequências de consenso de clade 2 geradas na primeira camada (sequências de consenso de clade 2.1, clade 2.2 e clade 2.3). Uma sequência de consenso final foi gerada usando as sequências de consenso de clade 0, clade 1 e clade 7 individuais geradas na primeira camada e a sequência de consenso de clade 2 gerada na segunda camada. A sequência PATH H5N1 COBRA é mostrada abaixo e é apresentada aqui como SEQ ID NO: 1.

**PATH H5N1 COBRA HA (SEQ ID NO: 1)**

```
MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDIL-
EKTHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYI-
VEKASPANDLCYPGNFNDYEELKHLLSRINHFEEKIQIIPKSSWSNHEA-
SSGVSSACPYQGRSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLV-
LWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRISKVNG-
QSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSE-
LEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLAT-
GLRNSPQRERRRKKRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNE-
QGSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLER-
```

RIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDK-  
 VRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYDYPQYSEE-  
 ARLNREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCSN-  
 GSLQCRICI

### **Exemplo 2: Geração de uma Sequência COBRA de Influenza H1N1**

[00108] Este exemplo descreve a geração de uma sequência de consenso COBRA de HA de influenza H1N1 usando 205 sequências de HA de influenza H1N1 humanas e suínas. A sequência COBRA resultante é referida como "PATH H1N1 COBRA."

[00109] Para gerar a sequência COBRA de HA de influenza H1N1 final, duas camadas de sequências de consenso foram geradas (FIG. 2). Na primeira camada, cinco sequências de consenso individuais foram geradas usando (1) 8 cepas humanas isoladas de 1933 a 1934; (2) 13 cepas humanas isoladas de 1935 a 1947; (3) 12 cepas humanas isoladas de 1948 a 1957; (4) 123 cepas humanas isoladas de 2009 a 2011; e (5) 49 cepas suínas. Uma sequência de consenso final foi produzida usando as cinco sequências de consenso individuais gradadas na primeira camada. A sequência PATH H1N1 COBRA é mostrada abaixo e é apresentada aqui como SEQ ID NO: 2.

#### **PATH H1N1 COBRA HA (SEQ ID NO: 2)**

MKARLLVLLCALAATDADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN-  
 LLED SHNGK LCKLKG IAPLQLGKCNIAGWLLGNPECESLLSARSWS-  
 YIVETPNSENGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWP-  
 NHNTTKGVTAACSHAGKSSFYRNLLWLTKKGGSYPKLSKSYVNNK-  
 GKEVLVLWGVHHPSTSTDQQSLYQENAYVSVVSSNYNRRFTPEIA-  
 ERPKVRGQAGRMNYYWTLLEPGDTIIFEATGNLIAPWYAFALS RGS-  
 GSGIITSNASMHECNTKCQTPQGAINSSLPFQNIHPVTIGEC PKYV-  
 RSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYHH-  
 QNEQSGGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFN-  
 LEKRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLL ENERTLDFHDSNVKN-

LYEKVKSQLRNNAKEIGNGCFEFYHKCDNECMESVKNGTYDYPKYS-  
EESKLNREKIDGVKLESMGVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWM-  
CSNGSLQCRICI

### **Exemplo 3: Sequências genéticas COBRA otimizadas de códon**

[00110] As sequências de aminoácido COBRA divulgadas aqui podem ser traduzidas reversas e otimizadas para expressão em células mamíferas, incluindo uso de códon e otimização de RNA (GeneArt; Regensburg, Alemanha). As sequências de ácido nucleico otimizadas podem ser inseridas em um vetor de expressão apropriado, tal como o vetor de expressão pTR600 (Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2002/0106798; Ross *et al.*, *Nat Immunol.* 1(2):102 - 103, 2000; Green *et al.*, *Vaccine* 20:242 - 248, 2001). Vetores de expressão que codificam as sequências genéticas COBRA otimizadas de códon podem ser usados, por exemplo, para gerar VLPs contendo a HÁ COBRA.

### **Exemplo 4: Preparação de e imunização com VLPs de influenza**

[00111] Os métodos seguintes podem ser usados para produzir e caracterizar VLPs de influenza compreendendo uma HÁ COBRA. Métodos exemplares para imunização de camundongos, furões e macacos também são descritos abaixo (ver também, Giles e Ross, *Vaccine* 29(16):3043 - 3054, 2011).

#### **Preparação da vacina**

[00112] 293 células T são transitoriamente transfectadas com plasmídeos que expressam M1, NA e uma HA otimizada, e incubadas por 72 horas a 37 °C. As sequências de codificação de M1, NA e HA podem ser otimizadas de códon para expressão em células mamíferas. Sobrenadantes são coletados e fragmentos celulares são removidos por centrifugação em velocidade baixa seguido por filtração a vácuo através de um filtro estéril de 0,22 µm. VLPs são purificadas por intermédio de ultracentrifugação (100.000 x g através de 20 % de glicerol, peso por volume) por 4 horas a 4 °C. As pelotas são subsequentemen-

te recolocadas em suspensão em PBS no pH 7,2 e armazenadas em alíquotas de uso único a -80 °C até o uso. A concentração de proteína total é determinada por Kit de Reagente de Ensaio de Proteína Micro BCA<sup>®</sup> (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA).

### **Determinação da dose**

[00113] O teor específico de HA pode ser determinado por western blot e densitometria. HA COBRA recombinante purificada e VLPs purificadas são preparadas em quantidades de proteína total padrão e são submetidas à eletroforese em um gel de SDS-PAGE a 10 % e transferidas para uma membrana de PVDF. A mancha é sondada com anticorpos policlonais de camundongo de camundongos infectados com influenza e os complexos de HA-anticorpo são detectados usando uma IgG anti-camundongo de cabra conjugada à peroxidase de raiz forte (HRP) (Southern Biotech; Birmingham, AL, USA). HRP é detectada por substrato quimioluminescente (Pierce Biotechnology; Rockford IL, USA) e exposta à filme de raio X (ThermoFisher; Pittsburgh, PA, USA). A densidade das faixas é determinada usando o software ImageJ (NIH). A densidade de faixas de HA recombinante é usada para calcular uma curva padrão e a densidade das VLPs purificadas é interpolada usando os resultados da HA recombinante.

### **Estudos em Camundongos**

[00114] Camundongos BALB/c (*Mus musculus*, fêmeas, 6 a 8 semanas de idade) podem ser adquiridos da Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, USA). Os camundongos são alojados em unidades microisoladoras e deixados com acesso livre a alimento e água e são cuidados sob as diretrizes de USDA para animais de laboratório. Os camundongos são vacinados com uma de três doses de VLPs de HA COBRA purificadas (1,5 µg, 0,3 µg ou 0,06 µg), com base no teor de HA a partir de um ensaio de densitometria, por intermédio de injeção intramuscular na semana 0 e depois reforçados com a mesma dose na

semana 3. Vacinas em cada dose são formuladas com adjuvante de alume (Imject<sup>®</sup> Alum, Pierce Biotechnology; Rockford, IL, USA), oligonucleotídeos de CpG, ou veículo apenas. Quatorze a vinte e um dias depois de cada vacinação, o sangue é coletado de camundongos anestesiados por intermédio do plexo retro-orbital e transferido para um tubo de microcentrífuga. Os tubos são centrifugados e os soros são removidos e congelados a  $-80 \pm 5$  °C. O título de anticorpo sérico de inibição de hemaglutinação (HAI) para cada grupo de vacina é determinado na semana 5 usando vírus recombinantes representativos ou VLPs de HA COBRA.

[00115] Três semanas depois da vacinação final, os camundongos são inoculados intranasalmente com um vírus influenza H5N1 ou H1N1 patogênico em um volume de 50 µl. Depois da infecção, os camundongos são monitorados diariamente quanto à perda de peso, sinais de doença e morte por 14 dias depois da infecção. Pesos corporais individuais, registros de doença (Toapanta e Ross, *Respiratory Research* 10(1):112, 2009) e morte são registrados para cada grupo em cada dia depois da inoculação.

### **Estudos em furões**

[00116] Furões Fitch (*Mustela putorius furo*, fêmeas, 6 a 12-meses de idade), ingênuos de influenza e sem olfato, podem ser adquiridos da Marshall Farms (Sayre, PA, USA). Furões são alojados aos pares em gaiolas de aço inoxidável (Shor-line, Kansas City, KS, USA) contendo Sani-chips Laboratory Animal Bedding (P.J. Murphy Forest Products, Montville, NJ, USA). Furões são fornecidos com Teklad Global Ferret Diet (Harlan Teklad, Madison, WI, USA) e água potável à vontade. As VLPs de HA COBRA são diluídas em PBS, pH 7,2 para obter a concentração final. Furões são vacinados com uma de duas doses de VLPs COBRA purificadas (15 µg, 3 µg), com base no teor de HA como determinado por ensaio de densitometria, por intermédio de injeção

intramuscular no músculo do quadríceps em um volume de 0,25 ml na semana 0 e depois reforçados com a mesma dose na semana 3. Vacinas são armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes do uso e formula das com adjuvante de alume (Imject Alum; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) imediatamente antes do uso. Os animais são monitorados quanto a eventos adversos incluindo perda de peso, temperatura, diminuição na atividade, descarga nasal, espirro e diarreia semanalmente durante o regime de vacinação. Antes da vacinação, os animais são confirmados por ensaio de HAI como sendo soronegativos para vírus influenza A e influenza B circulantes. Quatorze a vinte e um dias depois de cada vacinação, o sangue é coletado de furões anestesiados por intermédio da veia cava anterior e transferido para um tubo de microcentrífuga. Os tubos são centrifugados e os soros são removidos e congelados a  $-80 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . o título de anticorpo sérico de HAI para cada grupo de vacina é determinado na semana 5 usando vírus recombinantes representativos ou VLPs de HA COBRA.

[00117] Três semanas depois da vacinação final, os furões são inoculados intranasalmente com um vírus influenza H5N1 ou H1N1 patogênico em um volume de 1 ml. Depois da infecção, os furões são monitorados diariamente quanto à perda de peso, sinais de doença e morte por 14 dias depois da infecção. Pesos corporais individuais, registros de doença, e morte são registrados para cada grupo em cada dia depois da inoculação. Lavagens nasais são realizadas infundindo-se 3 ml de PBS nas narinas de furões anestesiados todo dia por 7 dias depois da inoculação. As lavagens são coletadas e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### **Imunizações de Primatas**

[00118] Macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*, machos, 3 a 5 anos de idade) podem ser adquiridos da Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN, USA). Os macacos são vacinados com VLPs de HA

COBRA purificadas (15 µg), com base no teor de HA de um ensaio de densitometria, por intermédio de injeção intramuscular na semana 0 e depois reforçados com a mesma dose nas semanas 3 e 6. Vacinas são formuladas com adjuvante de alume (Imject Alum, Pierce Biotechnology; Rockford, IL, USA) imediatamente antes do uso. Vinte e um dias depois de cada vacinação, o sangue é coletado de macacos anestesiados por intermédio da veia femoral e transferido para um tubo separador de soro. Os tubos são deixados ativar a coagulação seguido por centrifugação e os soros são removidos e congelados a  $-80 \pm 5$  °C. Títulos de IgG de ponto final e título de anticorpo sérico de HAI para cada grupo de vacina são determinados na semana 5 usando vírus recombinantes representativos ou VLPs de HA COBRA.

[00119] Três semanas depois da vacinação final, os macacos são inoculados por inoculação intranasal, intratraqueal, e orbital com um vírus influenza H5N1 ou H1N1 patogênico em um volume de 1 ml. Depois da infecção, os macacos são monitorados diariamente quanto à perda de peso, sinais de doença e morte por 5 dias depois da infecção. Pesos corporais individuais, registros de doença e morte são registrados para cada grupo em cada dia depois da inoculação.

#### **Exemplo 5: Imunogenicidade e eficácia protetiva de VLPs contendo PATH H5N1 COBRA HA**

[00120] Este exemplo descreve quatro estudos em camundongos para testar a imunogenicidade e eficácia protetiva de VLPs de PATH H5N1 COBRA.

##### **Estudo 1 COBRA**

[00121] Este estudo foi conduzido para testar a imunogenicidade e eficácia protetiva de VLPs de PATH H5N1 COBRA contra inoculações de clade 1 e clade 2. VLPs contendo uma HA COBRA de clade 2 humana (VLPs COBRA-2 humanas) foram usadas para comparação.

[00122] Camundongos foram vacinados intramuscularmente com 3

µg de VLPs contendo a sequência de HA PATH H5N1 COBRA (SEQ ID NO: 1), VLPs contendo a sequência de HA COBRA-2 humana, ou VLPs contendo HA de vírus influenza de cisne-bravo (A/Cisne-bravo/Mongólia/244/2005). Vacinações foram realizadas na semana 0 e semana 3 com um adjuvante (Imject<sup>®</sup>). Os camundongos foram inoculados com 5000 PFU de vírus de clade 2.1 da Indonésia (A/Indonésia/5/2005) ou 5000 PFU de vírus de clade 1 do Vietnã (A/Vietnã/1203/2004) durante a semana 5. Amostras de sangue foram coletadas na semana 0, semana 3 e semana 5. Pulmões foram colhidos no dia 3 (D3) depois da inoculação para títulos virais.

[00123] Títulos de HAI contra VLPs de PATH H5N1 COBRA (controle positivo), vírus de clade 1 do Vietnã, vírus de clade 2.1 da Indonésia, vírus de clade 2.2 de Whooper Swam, Egito/3300/08 clade 2.2.1, Egito/321/07 clade 2.2.1, vírus de clade 2.3 de Anhui e vírus de clade 7 de Galinha/Vietnã em camundongos vacinados são mostrados na FIG. 3. Os resultados demonstram que a vacinação com VLPs contendo PATH H5N1 COBRA HA evoca uma resposta do anticorpo que pode reconhecer tanto vírus influenza de clade 1 quanto de clade 2.

[00124] Os pesos corporais de camundongos vacinados e ingênuos até o dia 14 (D14) após inoculação com clade 2.1 da Indonésia e com clade 1 do Vietnã são mostrados na FIG. 4 e FIG. 5, respectivamente. Como mostrado na FIG. 4, o peso corporal de todos os camundongos vacinados inoculados pouco com o passar do tempo, ao passo que camundongos ingênuos exibiram uma diminuição acentuada no peso corporal depois do dia 5 (D5) após inoculação com o vírus de clade 2.1. Como mostrado na FIG. 5, o peso corporal de camundongos vacinados com VLPs de PATH H5N1 não mudou significativamente depois da inoculação com o vírus de clade 1. Ao contrário, camundongos ingênuos exibiram uma perda de peso rápida começando em D3 após a inoculação.

**Estudo 2A COBRA**

[00125] Este estudo foi conduzido para testar a eficácia protetiva contra inoculação de clade 1 a seguir de uma vacinação única de camundongos com VLPs contendo VLPs de PATH H5N1 COBRA.

[00126] Os camundongos foram vacinados intramuscularmente com 3 µg de VLPs contendo a sequência de HA PATH H5N1 COBRA (SEQ ID NO: 1), VLPs contendo a sequência de HA COBRA-2 humana, ou VLPs contendo HA de vírus influenza de cisne-bravo (A/Cisne-bravo/Mongólia/244/2005). A vacinação foi realizada na semana 0 com um adjuvante (Imject®). Os camundongos foram inoculados com 5000 PFU de vírus de clade 2.1 da Indonésia (A/Indonésia/5/2005) ou 5000 PFU de vírus de clade 1 do Vietnã (A/Vietnã/1203/2004) durante a semana 4. Amostras de sangue foram coletadas na semana 0 e semana 3. Os pulmões foram colhidos em D2 e D3 depois da inoculação para títulos virais.

[00127] Como mostrado na FIG. 6, o peso corporal dos camundongos vacinados não mudou significativamente a seguir da inoculação com vírus de clade 1 do Vietnã, ao passo que camundongos ingênuos exibiram uma perda significativa no peso depois de D3.

**Estudo 4A COBRA**

[00128] Este estudo foi conduzido para testar a eficácia protetiva contra o vírus de clade 1 a seguir de uma vacinação única na ausência de adjuvante. Os camundongos foram vacinados intramuscularmente com 3 µg de VLPs de PATH H5N1 COBRA, VLPs COBRA-2 humanas, ou VLPs de cisne-bravo sem adjuvante. Os camundongos foram inoculados com 5000 PFU de vírus de clade 1 do Vietnã durante a semana 4. Amostras de sangue foram coletadas na semana 0 e semana 3. Os pulmões foram colhidos em D2 e D3 depois da inoculação para títulos virais.

[00129] Como mostrado na FIG. 7, camundongos ingênuos sucum-

biram à infecção durante o dia 7, ao passo que 40 a 60 % de camundongos vacinados sobreviveram a inoculação até o dia 14. Especificamente, 60 % de camundongos vacinados com VLPs COBRA-2 humanas sobreviveram inoculados enquanto 40 % de camundongos vacinados com VLPs de PATH H5N1 COBRA ou VLPs de cisne-bravo sobreviveram à inoculação.

### **Estudo 5A COBRA**

[00130] Este estudo foi conduzido para testar a eficácia protetiva contra vírus de clade 1 a seguir de uma vacinação única com adjuvante (Imject<sup>®</sup>) em uma dose mais baixa de VLP (0,6 µg). Camundongos foram vacinados intramuscularmente com 0,6 µg de VLPs de PATH H5N1 COBRA, VLPs COBRA-2 humanas, ou VLPs de cisne-bravo na presença de adjuvante. Camundongos foram inoculados com 5000 PFU de vírus de clade 1 do Vietnã durante a semana 4. Amostras de sangue foram coletadas na semana 0 e semana 3. Os pulmões foram colhidos em D2 e D3 depois da inoculação para títulos virais.

[00131] Como mostrado na FIG. 8, o peso corporal dos camundongos vacinados caiu levemente a seguir da inoculação viral mas voltou para níveis normais durante D10. Ao contrário, o peso corporal de camundongos ingênuos caiu significativamente e os camundongos não recuperaram.

[00132] Devido às muitas modalidades possíveis às quais os princípios da invenção descrita podem ser aplicados, deve ser reconhecido que as modalidades ilustradas são apenas exemplos preferidos da invenção e não devem ser tomadas como limitando o escopo da invenção. Preferivelmente, o escopo da invenção é definido pelas reivindicações seguintes. Nós portanto reivindicamos como nossa invenção tudo que entra no escopo e espírito destas reivindicações.

## REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo de hemaglutinina (HA) de influenza recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido dos resíduos 2 a 566 da SEQ ID NO: 2 ou resíduos 2 a 568 da SEQ ID NO: 1.

2. Polipeptídeo de HA de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que consiste na sequência de aminoácido dos resíduos 2 a 566 da SEQ ID NO: 2 ou resíduos 2 a 568 da SEQ ID NO: 1.

3. Polipeptídeo de HA de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 1.

4. Polipeptídeo de HA de influenza de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que consiste na sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 1.

5. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que codifica o polipeptídeo de HA de influenza como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a molécula de ácido nucleico é otimizada de códon para expressão em células mamíferas.

7. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 5 ou 6.

8. Vetor de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um promotor operacionalmente ligado à sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de HA de influenza.

9. Célula isolada, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor como definido na reivindicação 7 ou 8.

10. Partícula semelhante a vírus influenza (VLP), caracteri-

zada pelo fato de que compreende o polipeptídeo de HA de influenza como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

11. VLP de influenza de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que compreende ainda uma proteína neuramidase (NA) de influenza, uma proteína de matriz (M1) de influenza, ou ambas.

12. VLP de influenza, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo de HA de influenza como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, produzido transfectando-se uma célula hospedeira com um vetor que codifica o polipeptídeo de HA, um vetor que codifica uma proteína NA de influenza e um vetor que codifica uma proteína M1 de influenza sob condições suficientes para permitir a expressão das proteínas HA, M1 e NA.

13. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo de HA de influenza como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

14. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo de HA de influenza como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, a VLP como definida em qualquer uma das reivindicações 10 a 12 ou a proteína de fusão como definida na reivindicação 13, e um carregador farmacologicamente aceitável.

15. Método de evocar uma resposta imune ao vírus influenza em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar o polipeptídeo de HA de influenza como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, a VLP como definida em qualquer uma das reivindicações 10 a 12, a proteína de fusão como definida na reivindicação 13 ou a composição como definida na reivindicação 14.

16. Método de imunizar um indivíduo contra o vírus influenza, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma composição compreendendo a VLP como definida em qual-

quer uma das reivindicações 10 a 12 e um carregador farmacêuticamente aceitável.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um adjuvante.

18. Método de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada intramuscularmente.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, caracterizado pelo fato de que a composição compreende cerca de 1 a cerca de 25 µg da VLP.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a composição compreende cerca de 15 µg da VLP.

21. Uso do polipeptídeo HA de influenza como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, da VLP como definida em qualquer uma das reivindicações 10 a 12, ou da proteína de fusão como definida na reivindicação 13, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição para evocar uma resposta imune ao vírus influenza em um indivíduo.

22. Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a dita composição compreende a VLP como definida em qualquer uma das reivindicações 10 a 12 e um carregador farmacêuticamente aceitável.

23. Invenção, em quaisquer formas de suas concretizações ou em qualquer categoria aplicável de reivindicação, por exemplo, de produto ou de processo ou uso englobadas pela matéria inicialmente descrita, revelada ou ilustrada no pedido de patente.

FIG. 1

## PATH H5N1 COBRA

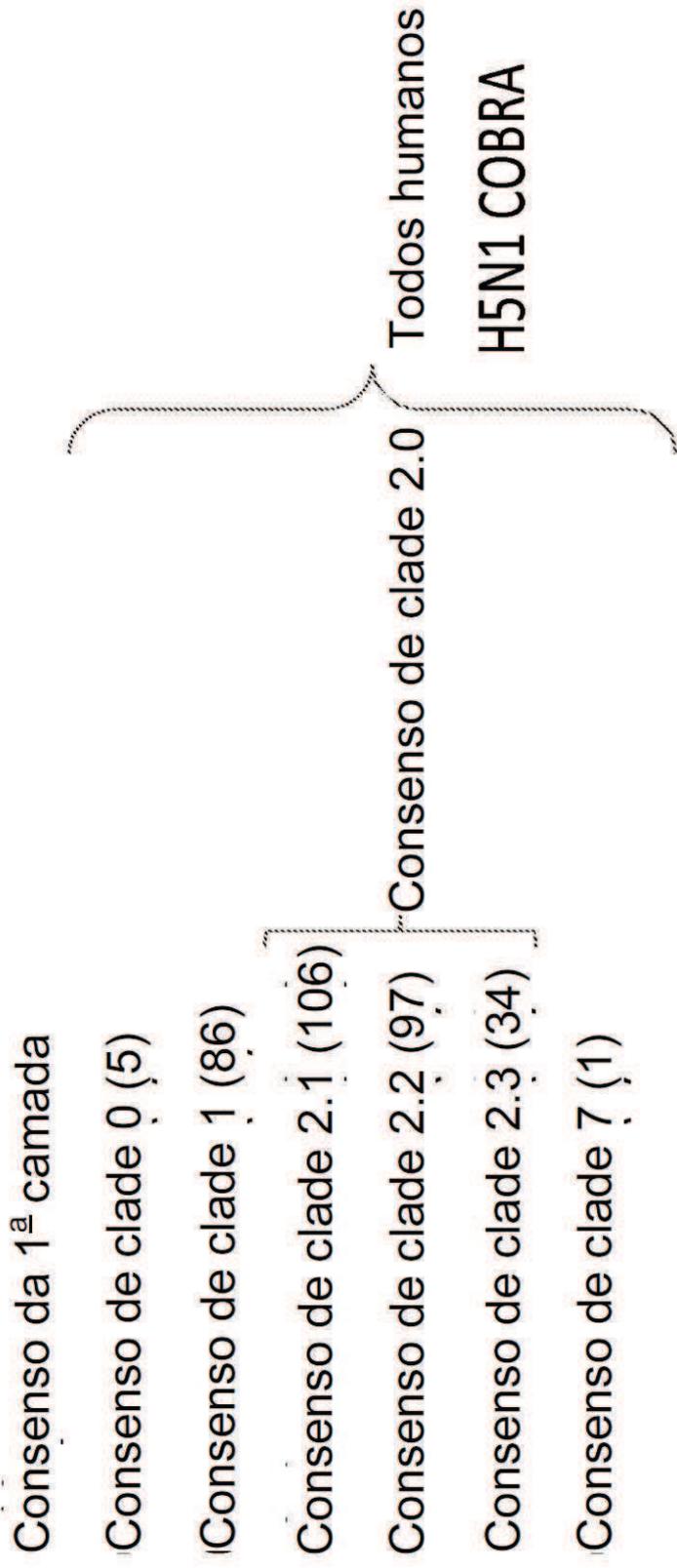
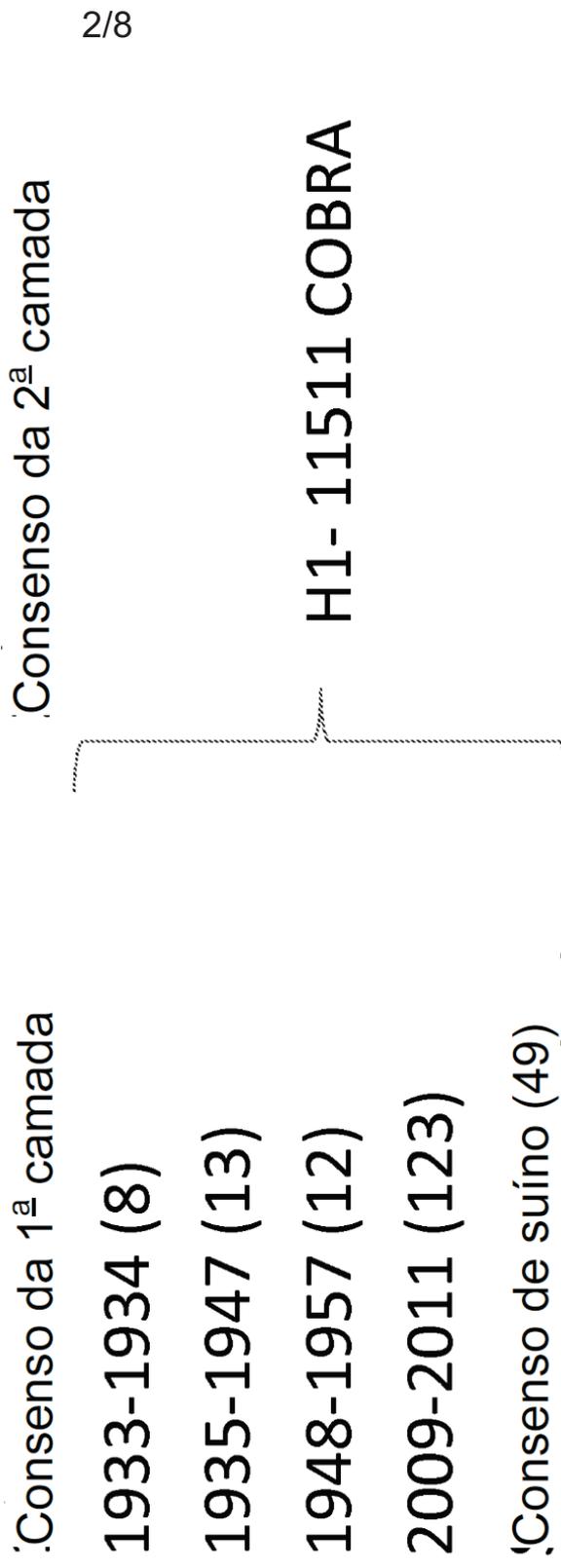


FIG. 2

## PATH H1N1 COBRA



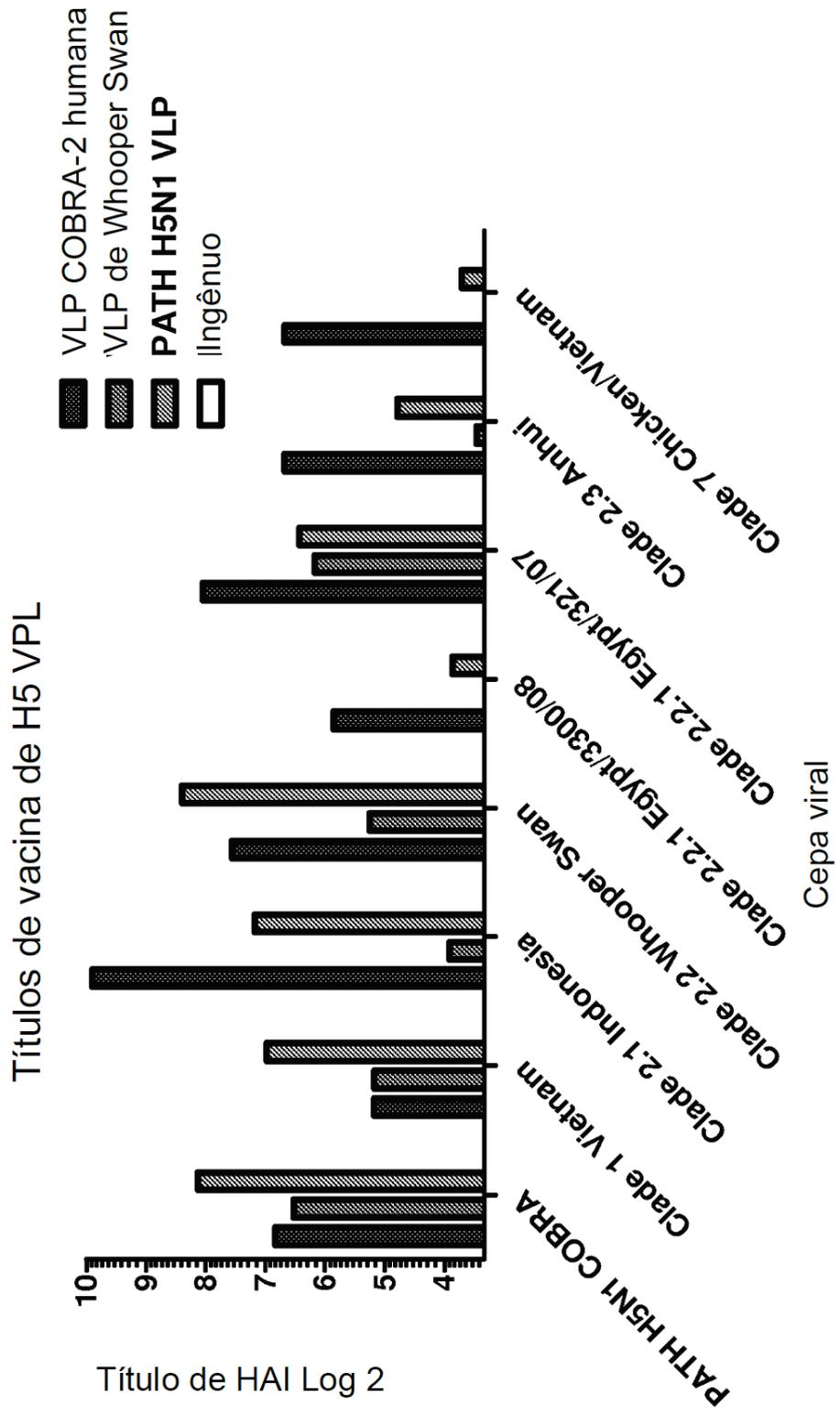


FIG. 3

FIG. 4

# Estudo 1 COBRA

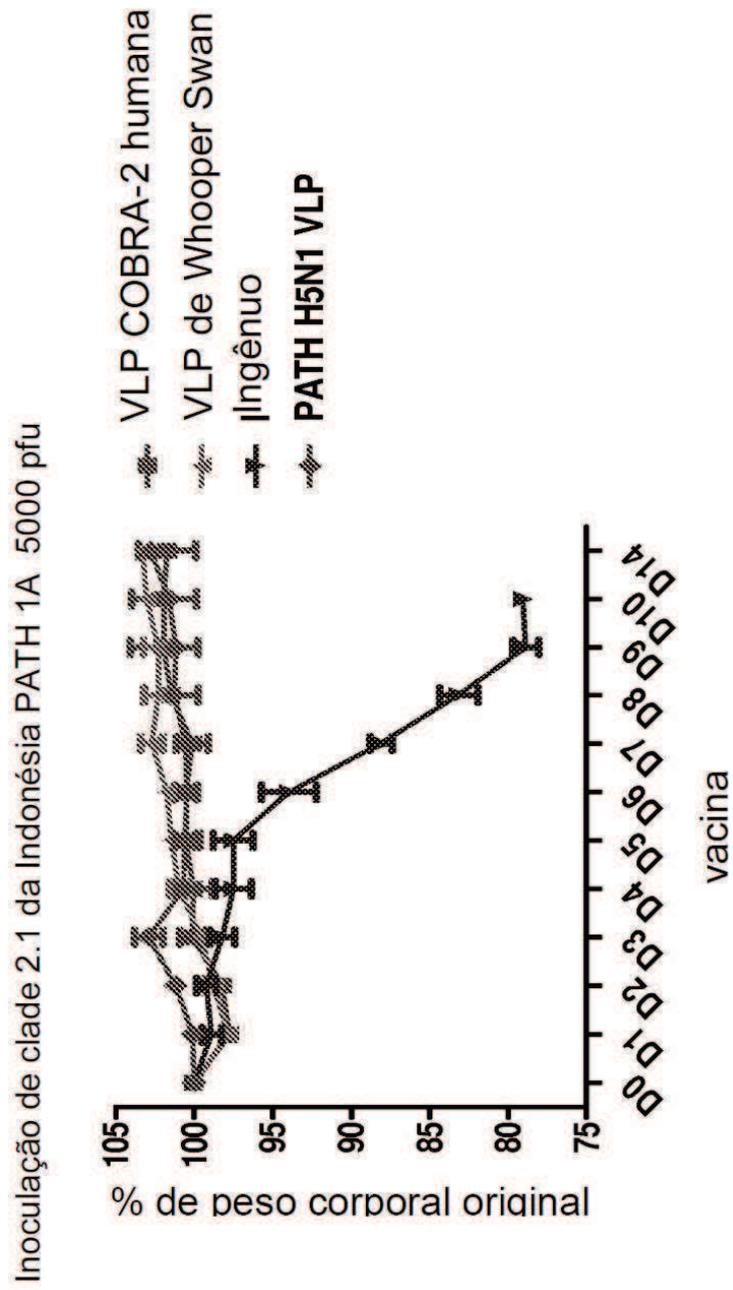


FIG. 5

## Estudo 1 COBRA

Inoculação de clade 1 do Vietnã 5000 pfu

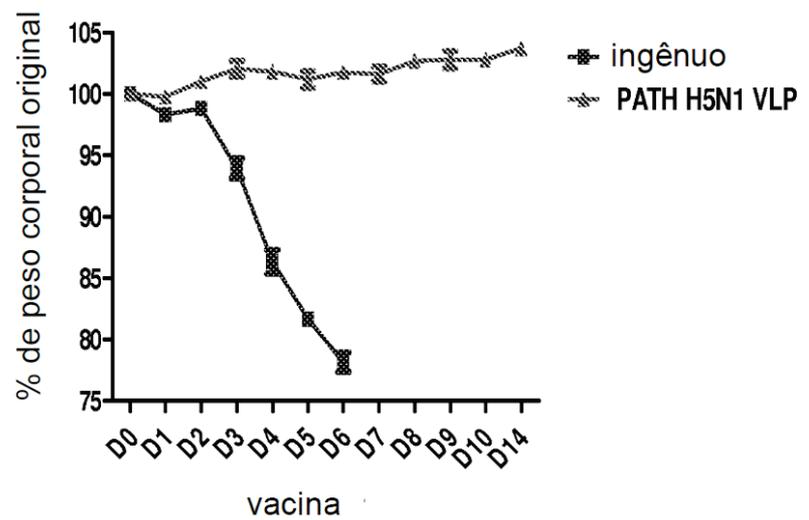


FIG. 6

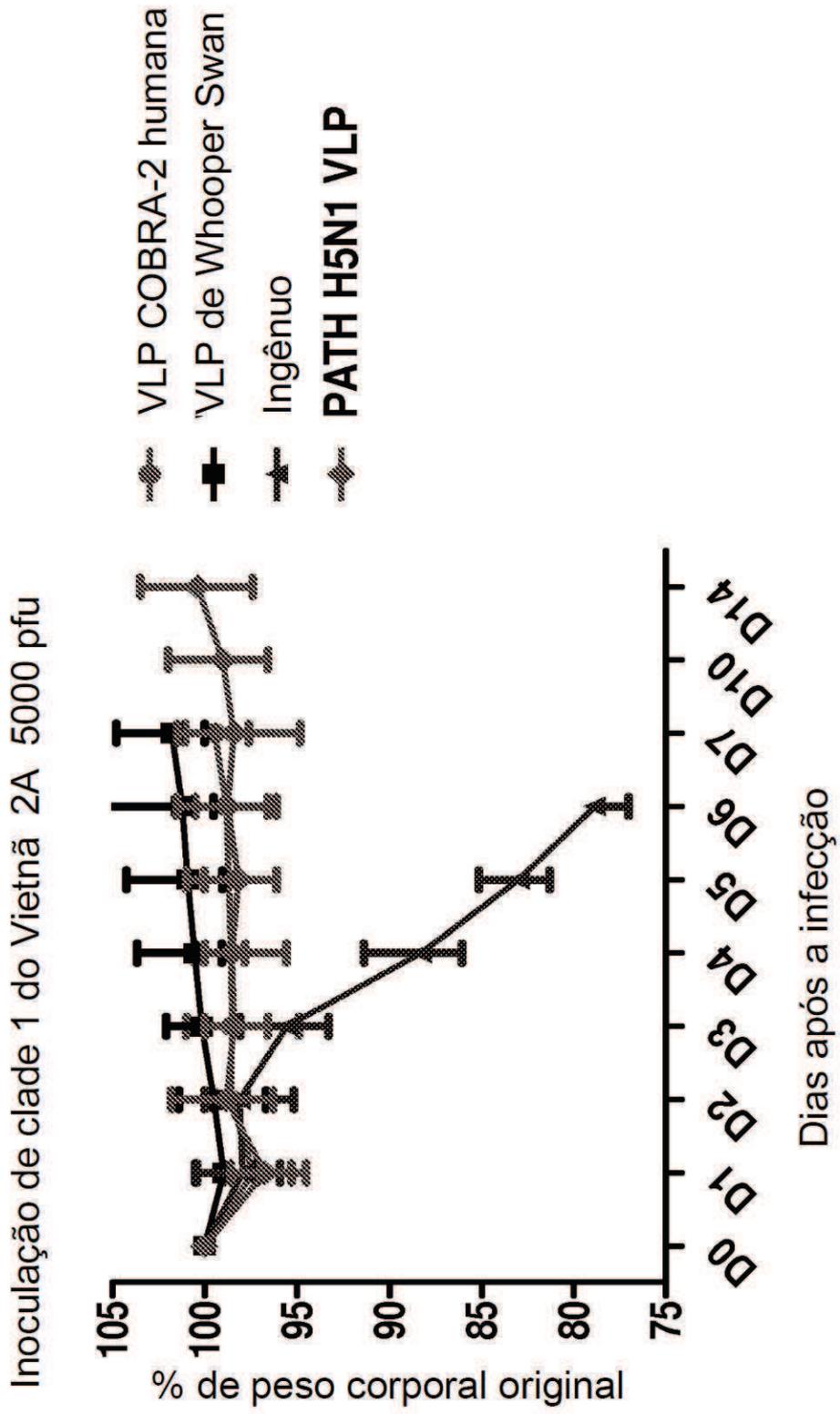


FIG. 7

# Estudo 4A COBRA

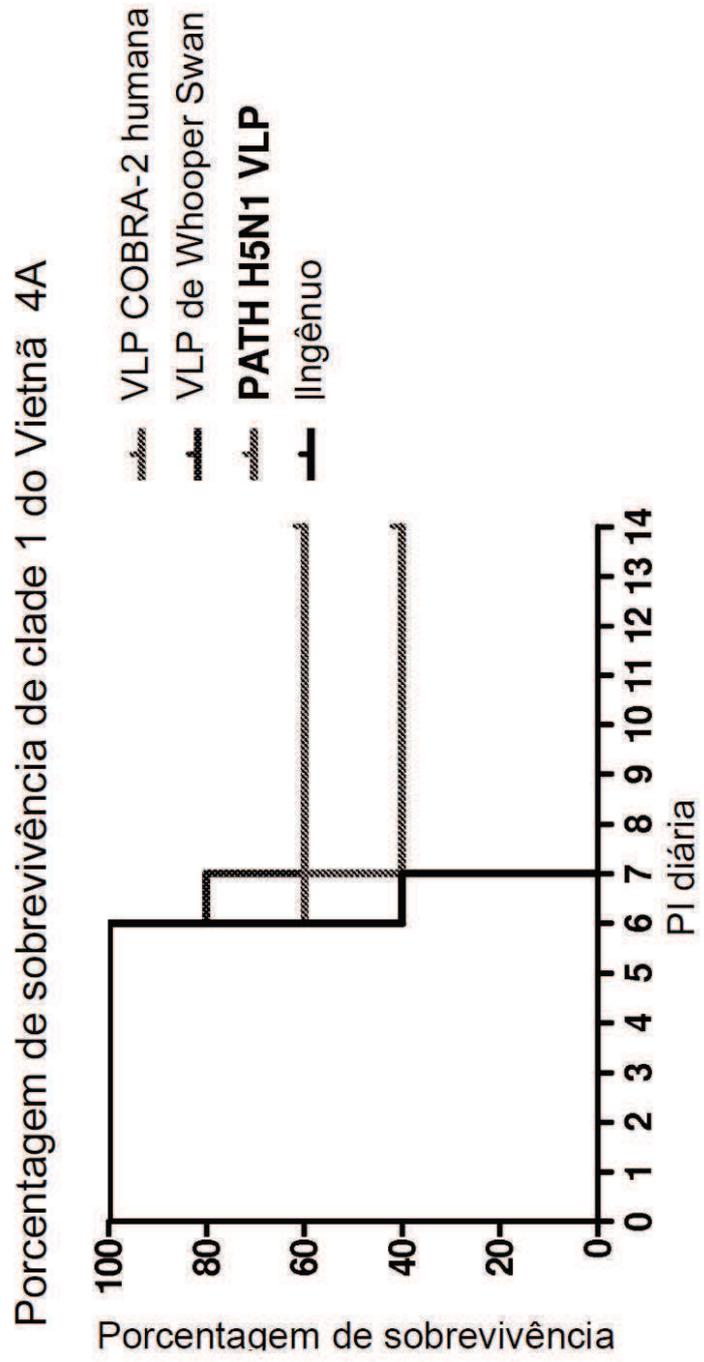
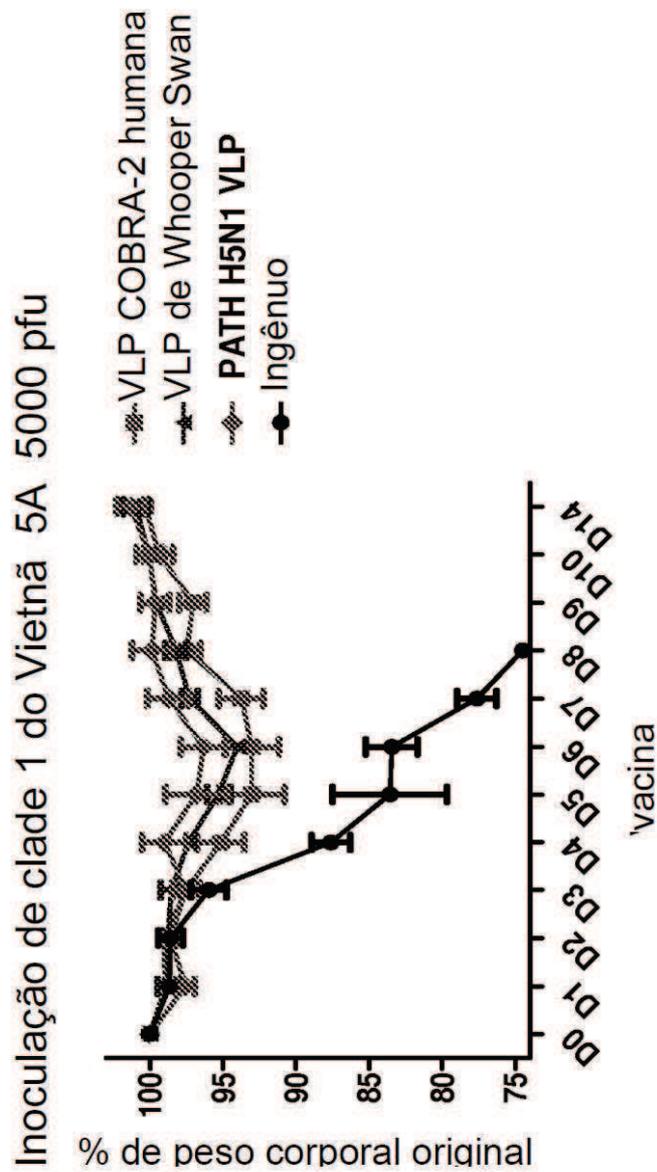


FIG. 8

# Estudo 5A COBRA



## RESUMO

Patente de Invenção: **"POLIPEPTÍDEO DE HEMAGLUTIMINA DE INFLUENZA RECOMBINANTE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, CÉLULA ISOLADA, PARTÍCULA SEMELHANTE AO VÍRUS DA INFLUENZA, PROTEÍNA DE FUSÃO, COMPOSIÇÃO, E USO"**.

A presente invenção refere-se a geração de polipeptídeos de HA de influenza H5N1 e H1N1 otimizados para evocar uma resposta imune amplamente reativa aos isolados do vírus influenza. Os polipeptídeos de HA otimizados foram desenvolvidos através de uma série de alinhamentos de proteína HA, e geração subsequente de sequências de consenso, com base em isolados de influenza H5N1 e H1N1. Fornecidos aqui são polipeptídeos de HA de influenza H5N1 e H1N1 otimizados, e composições, proteínas de fusão e VLPs compreendendo os polipeptídeos de HA. Fornecidas ainda são sequências de ácido nucleico otimizadas de códon que codificam os polipeptídeos de HA. Métodos de evocar uma resposta imune contra vírus influenza em um indivíduo também são fornecidos pela presente descrição.

## RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTÍGENOS AMPLAMENTE REATIVOS COMPUTACIONALMENTE OTIMIZADOS PARA VÍRUS INFLUENZA H5N1 E H1N1"**.

A presente invenção refere-se a geração de polipeptídeos de HA de influenza H5N1 e H1N1 otimizados para evocar uma resposta imune amplamente reativa aos isolados do vírus influenza. Os polipeptídeos de HA otimizados foram desenvolvidos através de uma série de alinhamentos de proteína HA, e geração subsequente de sequências de consenso, com base em isolados de influenza H5N1 e H1N1. Fornecidos aqui são polipeptídeos de HA de influenza H5N1 e H1N1 otimizados, e composições, proteínas de fusão e VLPs compreendendo os polipeptídeos de HA. Fornecidas ainda são sequências de ácido nucleico otimizadas de códon que codificam os polipeptídeos de HA. Métodos de evocar uma resposta imune contra vírus influenza em um indivíduo também são fornecidos pela presente descrição.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

### Código de Controle

Campo 1



149377365638416B

Campo 2



1BC115D398FDECF

### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P208403.txt
- Data de Geração do Código: 24-09-2014
- Hora de Geração do Código: 09:03:08
- Código de Controle:
  - Campo 1: 149377365638416B
  - Campo 2: 1BC115D398FDECF