

Ana Catarina Gomes Salgueira

Vacina Universal para a Gripe

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Catarina Gomes Salgueira

Vacina Universal para a Gripe

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao fim desta etapa tão importante na minha vida, quer a nível pessoal quer a nível profissional, não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para que este percurso fosse de alguma forma mais especial.

Queria agradecer à Prof. Dra. Olga Ribeiro, por toda a ajuda que me prestou durante estes meses e ainda pela sua constante disponibilidade e simpatia.

A sua ajuda foi muito importante!

O meu especial e sincero,

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 4 |
| ABSTRACT | 4 |
| 1. INTRODUÇÃO | 5 |
| 2. VÍRUS INFLUENZA..... | 7 |
| 3. VACINAS PARA A GRIPE | 10 |
| 3.1. VACINAS COMERCIALIZADAS..... | 10 |
| 3.2. VACINA UNIVERSAL (EM ESTUDO) | 11 |
| 3.2.1. Estudos pré-clínicos..... | 11 |
| 3.2.1.1. Proteína da matriz (M2)..... | 11 |
| 3.2.1.2. Nucleoproteína (NP)..... | 13 |
| 3.2.1.3. Neuraminidase (NA) | 14 |
| 3.2.1.4. Hemaglutinina (HA) | 14 |
| 3.2.2. Estudos clínicos | 17 |
| 3.2.2.1. ACAM-FLU-A | 17 |
| 3.2.2.2. VAX102 (STF2.4 x M2e) | 18 |
| 3.2.2.3. Vacina contra o vírus Ankara modificada (MVA)..... | 18 |
| 3.2.2.4. Multimeric-001 | 19 |
| 4. DISCUSSÃO / CONCLUSÃO | 19 |
| BIBLIOGRAFIA | 21 |

RESUMO

O vírus responsável pela gripe possui atualmente um grande impacto na saúde pública, a nível mundial. A maneira mais simples de proteger a população contra este vírus é através da sua prevenção e, para isso, recorre-se à vacinação. É de salientar no entanto que, devido às recorrentes alterações a nível dos antígenos virais circulantes e ao aparecimento de novas estirpes do vírus, torna-se necessário proceder a uma reformulação anual da vacina. Para além desta situação, estas vacinas serão ainda inefetivas em possíveis pandemias que poderão surgir. Assim, denota-se a importância da formulação de uma vacina universal que promova uma proteção duradoura contra as diferentes estirpes, ultrapassando assim as limitações que atualmente se verificam – proteção limitada e pouco duradoura e a dificuldade da formulação de uma vacina eficaz, num período de tempo adequado, após o aparecimento de uma pandemia. Ao longo deste trabalho serão apresentadas diferentes abordagens/estratégias que atualmente estão sob investigação, nomeadamente a utilização de proteínas altamente conservadas como a M2 e a nucleoproteína (NP), a utilização da neuraminidase (NA), a utilização de partes conservadas da hemaglutinina (HA) e ainda a utilização de misturas de partículas tipo vírus (VLPs) que expressam diferentes subtipos de HA e de outras proteínas.

ABSTRACT

Currently, the responsible virus for the flu has a major impact on public health worldwide. Immunization campaigns are the simplest way to protect the population against this virus. It should be noted however that, due to recurrent changes in circulating viral antigens and to the emergence of new strains of the virus, it becomes necessary to carry out an annual reformulation of the vaccine. In addition, these vaccines will still be ineffective in possible pandemics that may arise. Thereby denotes the importance of the formulation of a universal vaccine that promotes long-lasting protection against different strains, thus overcoming the limitations that currently occur - limited and short-lived protection and the difficulty of formulating an effective vaccine in a period of suitable time after the occurrence of a pandemic. Throughout this work are shown different approaches/strategies are currently under investigation, namely the use of proteins highly conserved as the M2 and the nucleoprotein (NP), the use of neuraminidase (NA), the use of parts conserved of hemagglutinin (HA) and also the use of mixtures of virus-like particles (VLPs) expressing the different subtypes of HA and other proteins.

I. INTRODUÇÃO

O vírus influenza é considerado, a nível global, um problema de saúde pública responsável por taxas consideráveis de morbidade e mortalidade. A manifestação da doença pode desencadear a hospitalização e, nos casos mais complicados ter como consequência a morte do doente, especialmente nos grupos de alto risco como as crianças, os idosos e os doentes crónicos (1). A OMS estima que globalmente e anualmente o vírus provoca entre 3 a 5 milhões de casos graves e entre 250 000 a 500 000 mortes (2). Deste modo, a prevenção da infeção com o vírus influenza através de campanhas de vacinação é a melhor estratégia de controlo da doença e é uma prioridade mundial, especialmente na população de alto risco.

Este vírus é geneticamente instável, essencialmente devido à ausência de enzimas que reparem os erros originados durante a replicação do seu genoma, levando assim ao aparecimento de alterações ao nível dos seus constituintes proteicos, nomeadamente potenciais antigénios. Estas alterações, também denominadas de variações antigénicas, podem ser menores ou suaves (*drift* antigénico) ou podem ser maiores ou drásticas (*shift* antigénico). O **drift antigénico** resulta do aparecimento e acumulação de mutações pontuais nos genes da hemaglutinina (HA) e da neuraminidase (NA) que se manifesta através de alterações a nível dos antigénios de superfície, ficando assim o vírus menos suscetível ao sistema imune do hospedeiro uma vez que a imunidade adquirida por uma exposição anterior deixa de ser totalmente eficaz. Estas alterações originam novas estirpes, dentro do mesmo subtipo, e estas podem ou não ser semelhantes à estirpe anteriormente em circulação. Na presença de grandes diferenças, esta nova estirpe não será reconhecida pelo sistema imunológico da população vacinada, traduzindo-se numa menor eficácia das vacinas utilizadas e, assim, esta poderá originar o aparecimento de uma epidemia. Por outro lado, o **shift antigénico** resulta principalmente da mistura aleatória do material genético de diferentes subtipos do vírus, originando assim novos subtipos, muitas vezes com grande potencial pandémico. Nesta situação, e uma vez que a população não teve qualquer tipo de exposição prévia ao vírus, a imunidade será muito reduzida ou mesmo nula, o que facilitará a disseminação do vírus. Importa referir que estas alterações são menos frequentes que as alterações menores (*drift*), no entanto apresentam um maior impacto pois afetam um maior número de pessoas e promovem o aparecimento de complicações mais graves (3).

Anualmente, devido às alterações genéticas referidas anteriormente e de maneira a garantir a imunidade da população, é necessário reformular a vacina da gripe consoante as previsões que são estabelecidas. A OMS, durante os meses de Inverno do ano anterior à colocação no mercado de uma nova vacina, reporta quais são as estirpes que estão em circulação e, com base nesses relatórios, faz as previsões de quais serão as estirpes que

estarão em circulação no próximo ano. A produção das vacinas inicia-se no mês de Janeiro para que, no início do Outono, as vacinas já possam estar disponíveis para serem administradas à população. No entanto, é de salientar que as previsões que são estabelecidas nem sempre coincidem com as estirpes que efetivamente estão em circulação na época em curso, o que traz grandes complicações uma vez que, deste modo, a população poderá não estar protegida contra o vírus (3).

As limitações das vacinas que atualmente se verificam, como por exemplo a ineficácia das previsões e a proteção limitada contra os diferentes subtipos do vírus, têm despertado o interesse dos investigadores, de maneira a tentar ultrapassar as mesmas. Assim, cada vez mais se compreende a aposta e a importância do desenvolvimento de uma vacina universal que promova uma proteção contra os diferentes subtipos do vírus e que evite a sua reformulação anual. Esta vacina permitirá uma proteção mais eficaz da população, diminuindo assim o impacto na saúde pública, das variações antigénicas do vírus. A vacina universal permitirá ainda uma atuação mais rápida em pandemias provocadas pelo vírus influenza, nomeadamente junto da população não vacinada, evitando assim as consequências da mesma, nomeadamente as complicações a nível respiratório, a febre, as dores e em situações mais extremas a morte (4). Um exemplo de uma situação pandémica relativamente recente ocorreu em 2009 no México, tendo esta resultado do aparecimento de uma nova variante do vírus do subtipo H1N1, em suínos, altamente contagiosa para os humanos, tendo-se deste modo verificado a sua expansão a nível mundial.

Ao longo deste trabalho serão apresentadas diferentes abordagens/estratégias que atualmente estão sob investigação, nomeadamente a utilização de proteínas altamente conservadas como a proteína da matriz M2 e a nucleoproteína (NP), a utilização da neuraminidase (NA), a utilização de partes conservadas da hemaglutinina (HA) e ainda a utilização de misturas de partículas tipo vírus (VLPs). Importa referir que estas VLPs são essencialmente constituídas por proteínas virais, produzidas por tecnologia de DNA recombinante, que possuem a capacidade de se auto-organizarem numa estrutura semelhante ao vírus, sendo no caso específico do vírus influenza a HA, a NA e a M2 os componentes mais utilizados para a sua produção (5). Estas partículas têm também a vantagem de serem altamente imunogénicas, conseguindo não só induzir o complexo major de histocompatibilidade classe I como ainda o de classe II das células apresentadoras de antígeno, promovendo assim uma resposta imune quer celular quer humoral (3).

2. VÍRUS INFLUENZA

O vírus influenza pertence à família *Orthomyxoviridae* e está dividido em 3 tipos: A, B e C. Estes três tipos são distintos entre si não só a nível imunológico, mas também a nível da organização do seu genoma, da sua morfologia e dos seus hospedeiros. Dos diferentes tipos, o A e o B são os que apresentam um maior interesse clínico, uma vez que são responsáveis pelo aparecimento de infeções graves do trato respiratório, nos humanos. O tipo C apenas provoca ligeiros sintomas nas crianças (1).

O **vírus tipo B** é responsável por infeções menos severas, quando comparado com o tipo A, e é constituído por duas linhas distintas que circulam em simultâneo no ambiente, a B / Yamagata e a B / Victoria, e infeta principalmente os humanos. Importa referir que dentro destas linhas, em diferentes países, aparecem vírus aparentados, os quais ficam com o nome do local onde foram descobertos, sendo estes depois incorporados nas vacinas. Por outro lado, o **vírus tipo A** é o mais virulento e o que desencadeia complicações mais graves, e é o responsável pelo aparecimento das epidemias e das pandemias. Infeta, para além dos humanos, outras espécies animais como são exemplos as aves e os suínos. O vírus influenza tipo A é o único que possui diferentes subtipos, sendo estes baseados nas diferentes combinações possíveis dos subtipos de antigénios – glicoproteínas – de superfície: a HA e a NA. Atualmente já foram identificados 18 subtipos diferentes de HA e 11 subtipos de NA, e é através da sua aleatorização que se obtém os diferentes subtipos do vírus tipo A (HxNy). Importa referir que toda a informação que se segue é principalmente relativa ao vírus tipo A, uma vez que é este que apresenta um maior impacto na população humana (3).

No que diz respeito à morfologia do vírus, este possui envelope, cápside helicoidal e o ácido nucleico, formando estas duas últimas estruturas a designada nucleocápside. A nucleocápside é constituída por 8 segmentos diferentes de RNA (polaridade negativa), responsáveis pela codificação das diferentes proteínas virais. É constituída ainda por uma nucleoproteína (NP) específica e por uma polimerase viral.

As proteínas virais englobam diferentes tipos de proteínas, entre elas, as **proteínas da matriz (M)**, a **nucleoproteína (NP)**, a **neuraminidase (NA)** e a **hemaglutinina (HA)**, tendo cada uma funções distintas e relevantes para a replicação e sobrevivência do vírus.

A **M2** funciona como um canal iónico transmembranar e é indispensável à replicação do vírus, uma vez que participa no seu processo de descapsidação, após este entrar na célula hospedeira. Além destas atividades, participa ainda no processo de maturação da HA e na libertação do genoma viral para o citoplasma da célula alvo (1). É constituída por 97 aminoácidos, dos quais 24 constituem o ectodomínio, na sua região terminal (3). No vírus

influenza A humano o ectodomínio da proteína M2 é altamente conservado nos seus 9 aminoácidos terminais, como se pode observar na *tabela 1*, e apresenta pequenas alterações na região proximal da membrana, o que torna assim esta proteína um alvo promissor para induzir uma proteção cruzada contra os diferentes subtipos do vírus. Para além desta vantagem observou-se ainda que os anticorpos que se formam e que reconhecem esta proteína possuem atividade neutralizante contra o vírus e permitem a redução dos níveis de replicação do mesmo.

Tabela 1 – Adaptada da publicação “*Universal Influenza Vaccines, a Dream to Be Realized Soon*” (3)

| Vírus | Subtipo | Sequência da M2e |
|---------------------------|---------|--------------------------------|
| Human virus M2e consensus | N/A | MSLLTEVETPIRNEWGCRCND |
| A/Philippines/2/82 | H3N2 | MSLLTEVETPIRNEWGCRCND |
| A/Puerto Rico/8/34 | H1N1 | MSLLTEVETPIRNEWGCRCNG |
| A/California/04/09 | H1N1 | MSLLTEVETPTRSEWE <u>ECRCSD</u> |
| A/Vietnam/1203/04 | H5N1 | MSLLTEVETPTRNEW <u>ECRCSD</u> |

Por outro lado, a **NP** consiste numa proteína estrutural do vírus e tem como principal função promover a encapsidação do genoma. Para além desta função, tem ainda um papel importante na transcrição e na replicação do genoma viral. Esta proteína é relativamente bem conservada e estima-se que a diferença máxima na cadeia de aminoácidos seja inferior a 11 % entre os diferentes tipos do vírus, sendo assim considerada uma candidata promissora. A NP, uma vez que não se encontra expressa à superfície do vírus, promove essencialmente uma resposta imune mediada por células, mais particularmente uma resposta mediada pelos linfócitos T citotóxicos que, apesar de não contribuir para a prevenção da infeção, permite reduzir a severidade e a taxa de mortalidade associada à doença. Verificou-se ainda que possui a capacidade de desencadear a produção de anticorpos não neutralizantes contra as suas regiões bem conservadas, contribuindo assim para a eliminação das células infetadas pelo vírus e para a imunidade cruzada contra os diferentes subtipos do vírus. Porém, o seu mecanismo, ainda não está bem esclarecido (1, 5).

A **NA** é uma glicoproteína presente na superfície do vírus influenza e tem como função promover a libertação do vírus das células infetadas por este, após a sua replicação, permitindo assim que este infete novas células. Apesar de a NA ser mais conservada que a HA, esta proteína não é imunodominante e possui um papel insignificante na prevenção da infeção. É de salientar no entanto que os seus anticorpos específicos, que são detetados normalmente após uma infeção natural ou após a vacinação, possuem a capacidade de restringir a replicação viral uma vez que impedem a libertação dos novos vírus das células infetadas, o que dificulta a disseminação do vírus pelas restantes células que consequentemente acaba por limitar a duração e a severidade da doença. Importa referir

ainda que os seus anticorpos não são classificados como anticorpos neutralizantes uma vez que o seu mecanismo de ação consiste em bloquear a libertação do vírus das células já infetadas através da sua ligação à neuraminidase quando o novo vírus é libertado pela célula infetada, impedindo assim que esta clive as ligações do ácido siálico com a hemaglutinina, e não em neutralizar a atividade do mesmo, ou seja, impedir logo no início a sua entrada nas novas células para que não exerça a sua função (1, 5).

Por fim, a **HA** é também uma glicoproteína presente na superfície do vírus e é responsável pela ligação e pela fusão do vírus com a membrana celular do hospedeiro. O vírus influenza do tipo A possui diferentes subtipos de HA, como já foi referido anteriormente, que são classificados em dois grupos filogenéticos de acordo com a homologia entre a sua sequência de aminoácidos. Durante o ciclo de infeção do vírus o precursor da HA, o HA0, é clivado por proteases em duas subunidades, a HA1 e a HA2 como se pode observar na *figura 1*, que permanecem unidas através de uma ligação de dissulfeto.

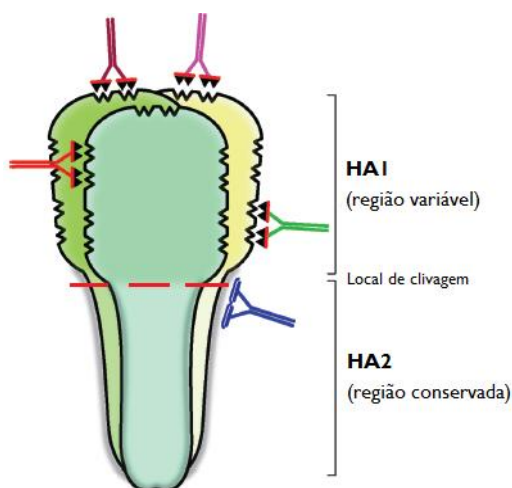


Figura 1 – Adaptada da publicação “The prospects and challenges of universal vaccines for influenza” (14)

Esta proteína é constituída por dois domínios diferentes, a **cabeça globular** e a **base**, que são funcionalmente e “antigenicamente” distintos entre si. A **cabeça globular** é constituída exclusivamente pela porção central da HA1 e

contém a maioria dos sítios antígenicos e o local de ligação ao recetor, sendo assim responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira. Os anticorpos contra esta região impedem assim a ligação da HA ao seu recetor, inibindo a entrada do vírus na célula, demonstrando deste modo possuírem uma atividade inibitória da HA e uma capacidade de neutralizar o vírus. Importa referir no entanto que a cabeça globular é altamente variável entre os diferentes subtipos do vírus, tendo esta a capacidade de sofrer alterações quando é sujeita a uma pressão por parte do sistema imunológico, permitindo-lhe assim escapar aos anticorpos neutralizantes produzidos por uma infeção ou vacinação anterior. No entanto, é de realçar que esta possui também algumas regiões conservadas entre os diferentes subtipos do vírus. Por outro lado, a **base** é composta pela parte terminal da HA1 e pela totalidade da HA2, sendo esta responsável pela fusão da membrana do vírus com a membrana celular do hospedeiro e posterior libertação do genoma viral para o citoplasma da célula. Ao contrário

do domínio anterior, a base demonstra ser relativamente bem conservada entre os diferentes subtipos do vírus, no entanto é muito menos imunogénica uma vez que o acesso à base é limitado, o que faz com que os anticorpos contra esta região sejam produzidos em menores quantidades, o que justifica o facto de estes anticorpos neutralizantes contra a base terem sido descobertos mais tarde (6, 5).

3. VACINAS PARA A GRIPE

3.1. VACINAS COMERCIALIZADAS

Como já foi referido anteriormente, é a OMS que estabelece as previsões das estirpes que estarão em circulação no próximo ano e que deverão ser incluídas na vacina. A imunidade adquirida nesta situação é apenas específica para o subtipo presente na constituição da vacina, protegendo somente contra uma infeção por esse mesmo subtipo. Assim, a eficácia da vacina dependerá da semelhança entre as estirpes incluídas na vacina e as estirpes circulantes.

Durante a época sazonal de 2015/2016, os vírus previstos para estarem em circulação na população humana no hemisfério norte foram o H1N1 e o H3N2, do tipo A, e o vírus tipo B. Esporadicamente, também outros vírus do tipo A manifestaram atividade durante os meses de estudo, como é exemplo o H5N1, o H5N6, o H7N9, e o H9N2. Assim, com base nos dados reportados pela OMS em Fevereiro de 2015, a recomendação para a composição da vacina desta época consistiu na inclusão de três vírus: o vírus A/California/7/2009 (H1N1)-like virus, o vírus A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-like virus e o vírus B/Phuket/3073/2013-like virus (7).

Por outro lado, com base nos resultados dos relatórios obtidos pela OMS, que foram apresentados à comunidade em Fevereiro de 2016, a vacina da época sazonal de 2016-2017 deverá possuir na sua composição o vírus A/California/7/2009 (H1N1)-like virus, o vírus A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like vírus e o vírus B/Brisbane/60/2008-like vírus (8).

As vacinas atualmente utilizadas têm na sua constituição as glicoproteínas de superfície do vírus, a HA e a NA, e a sua ação preventiva deve-se essencialmente à sua capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes direcionados para a cabeça globular da HA, uma vez que é esta a responsável pela ligação e entrada do vírus na célula hospedeira. No entanto, uma vez que a cabeça globular da HA é altamente variável, a sua atividade é específica para cada subtipo e estirpe deste (6). Assim, para tentar contornar este problema e de maneira a superar todas as limitações das vacinas atuais (proteção limitada e pouco duradoura e a dificuldade da formulação de uma vacina eficaz, num período de tempo adequado, após o aparecimento de uma pandemia), cada vez mais se considera a formulação

de uma vacina universal que permita uma maior proteção da população mundial e sobretudo que permita uma estabilização da composição da vacina e uma produção contínua desta.

3.2. VACINA UNIVERSAL (EM ESTUDO)

A vacina universal permitirá conferir uma proteção contra todos os subtipos do vírus e, em situação de pandemia nas populações não vacinadas, possibilitará uma rápida atuação. Esta vacina necessitará de administrações menos frequentes, idealmente apenas uma vez na vida, e permitirá uma redução nos custos relativamente à produção da vacina da gripe, uma vez que não necessitará de ser reformulada anualmente (1).

Atualmente, e de forma a ir de encontro com o objetivo principal, a descoberta de uma vacina universal, têm-se apostado na investigação das partes altamente conservadas das proteínas do vírus, os alvos antigénicos, como por exemplo o ectodomínio da proteína M2 e a base da hemaglutinina, para permitir assim uma proteção contra todos os subtipos. Apesar de se tratar de uma ideia muito promissora, desde o início foram encontrados alguns obstáculos, nomeadamente o difícil acesso dos anticorpos a estas regiões, que estão menos expostas, e o facto de serem pouco imunogénicas. Sendo assim, um dos grandes objetivos da vacina universal passa por arranjar uma estratégia que permita o aumento da sua imunogenicidade de maneira a induzir uma resposta imunológica que confira proteção (1).

Diversas proteínas expressas pelo vírus influenza têm sido consideradas como candidatas promissoras para o desenvolvimento da vacina universal, nomeadamente a proteínas M2, a NP, a NA e a HA, estando diferentes abordagens/estratégias sob investigação (1).

De seguida serão apresentadas diferentes abordagens/estratégias que atualmente estão sob estudo.

3.2.1. Estudos pré-clínicos

3.2.1.1. Proteína da matriz (M2)

Devido essencialmente à sua baixa densidade de antígenos (1 a 3 cópias de M2 por vírus) e ao seu pequeno tamanho quando comparado com os outros dois antígenos de superfície do vírus (HA e NA), é de salientar que os níveis de anticorpos produzidos contra a proteína M2 e o seu ectodomínio são muito baixos tornando assim esta proteína pouco imunogénica, o que constitui uma barreira para o seu possível uso na futura vacina universal (3). Várias têm sido as estratégias para tentar contornar esta situação, nomeadamente a adição de adjuvantes (9), a fusão da proteína M2 a proteínas transportadoras que sejam muito imunogénicas, a utilização de genes que estimulem a atividade do sistema imunitário (10), o

aumento do número de cópias da proteína na superfície do vírus (11), a utilização de VLPs (12), entre outras.

Numa das estratégias onde procederam à adição de adjuvantes, o método em estudo consistiu em adicionar o CpG-ODN, um imunopotenciador, a um antigénio, um péptido do ectodomínio da M2. Neste estudo foi possível observar que quando se adiciona um outro adjuvante, como por exemplo o alumínio, em conjunto com o anteriormente referido na vacina, estes induzem uma resposta imunológica aumentada nos murganhos, demonstrada pelos altos níveis de anticorpos e de citocinas. Contudo, verificou-se também que apesar da resposta imune ter sido potenciada, esta não era suficiente nem eficaz relativamente à proteção que conferia contra o vírus influenza. Este estudo permitiu concluir que a intensidade da resposta imunológica não está diretamente correlacionada com a maior ou menor proteção ao vírus que é conferida (9). Permitiu ainda deduzir que são necessários mais estudos para tentar perceber quais foram as falhas e onde se pode intervir de maneira a obter os resultados desejados, ou seja, uma proteção eficaz contra os diferentes subtipos do vírus.

Numa outra estratégia em estudo, utilizando a tecnologia de ADN recombinante, foi desenvolvido um plasmídeo contendo os genes que codificam a porção constante da M2. Ao utilizar este plasmídeo, observou-se que esta promovia uma boa proteção contra os subtipos do vírus que possuíssem uma sequência do seu ectodomínio semelhante à que era codificada pelo gene inserido na vacina, indicando assim uma proteção cruzada contra diferentes subtipos nos murganhos (10). Esta estratégia parece ser muito promissora uma vez que permitirá uma proteção contra uma grande variedade de subtipos do vírus, uma vez que esta porção é relativamente bem conservada nos diferentes subtipos do vírus.

Uma estratégia diferente das referidas anteriormente consiste em administrar aos murganhos por via intranasal um péptido sintético que expressa múltiplas cópias da parte conservada do antigénio, nesta situação múltiplas cópias do ectodomínio conservado da M2 (eM2). Este péptido, que é um indutor da resposta imunitária mediada pelas células Th, é produzido em laboratório e forma-se através do estabelecimento de ligações covalentes entre a sua porção terminal e o ectodomínio da proteína M2. Verificou-se que, após duas imunizações os murganhos demonstraram possuir uma boa resistência contra a replicação do vírus no trato respiratório e que este péptido tinha a capacidade de induzir uma resposta imune humoral forte. No entanto, em comparação com murganhos que foram imunizados por duas infeções heterosubtípicas consecutivas, verificou-se que a resistência a nível nasal e a nível da traqueia foi de grandeza semelhante, contudo a nível pulmonar este péptido desencadeia uma menor resistência (11). Assim, é necessário planejar mais estudos de

maneira a tentar contornar este obstáculo uma vez que assim a população não ficará totalmente protegida e corre o risco de desenvolver complicações pulmonares graves caso o vírus consiga atingir estas áreas.

Por fim, outra estratégia em estudo consiste em utilizar VLPs formadas pela proteína eM2. Neste estudo verificou-se que após a imunização intranasal com as VLPs, os anticorpos produzidos nos murghanhos foram notavelmente superiores comparativamente aos produzidos após a imunização apenas com o eM2 solúvel. Esta imunização intranasal induziu ainda uma elevada resposta celular e humoral na mucosa nasal dos murghanhos, observando-se ainda uma proteção completa contra infeções por vírus homólogos. Como o objetivo de melhorar o resultado, os autores do estudo testaram ainda uma outra formulação contendo a flagelina truncada, com a finalidade de esta aumentar a imunogenicidade do antigénio. Esta última foi introduzida através de dois métodos diferentes: no primeiro método foi ancorada na membrana da VLP contendo o eM2 e no segundo método foi também ela expressa numa VLP sendo depois administrada a mistura de VLPs. Após a análise dos resultados verificou-se que em ambos os métodos houve uma forte indução da resposta imune humoral e celular, que conferia uma proteção cruzada contra diferentes subtipos do vírus. Sendo assim os autores concluíram que esta estratégia é altamente promissora, justificando o planeamento de estudos adicionais (12).

Após a análise das diferentes abordagens apresentadas pode-se concluir que algumas parecem ser muito promissoras, uma vez que permitem a indução de uma forte resposta imune contra um grande leque de subtipos do vírus, no entanto é necessário continuar estes estudos de maneira a garantir que se trata de uma estratégia segura e eficaz antes de prosseguir para ensaios clínicos.

3.2.1.2. Nucleoproteína (NP)

Alguns estudos têm sido efetuados nos últimos anos com o objetivo de verificar se a proteína NP se trata efetivamente de uma possível candidata para a constituição da futura vacina universal, destacando-se essencialmente dois métodos para a indução da resposta efetiva dos linfócitos T citotóxicos: o uso de sistemas de entrega de antigénios baseados em vetores e o uso de vacinas de ADN (13). Tem sido várias as estratégias utilizadas com esta proteína, no entanto, apesar de se verificar que estas promovem um determinado nível de proteção contra diferentes subtipos do vírus esta ainda não é satisfatória, indicando assim que estas vacinas deverão ser reformuladas de maneira a induzirem uma resposta imune mais eficaz e aceitável. É de realçar que, de entre as diferentes estratégias, a vacina de ADN é a que promove uma proteção cruzada mais evidente (13).

3.2.1.3. Neuraminidase (NA)

Várias têm sido as estratégias baseadas nesta proteína, entre elas a produção de anticorpos contra as partes conservadas do seu local ativo que mostraram ter a capacidade de inibir a atividade enzimática de vários subtipos desta proteína, incluindo as duas linhas do vírus tipo B, no entanto esta ainda não foi testada em estudos *in vivo*. Uma vez que não possui um papel ativo e preponderante na prevenção da infecção muitos consideram a NA uma fraca aposta para a futura vacina universal visto que seria uma vacina contra a infecção permissiva, pois a NA atua após o vírus entrar nas células. É de salientar no entanto que esta proteína continua a ser uma candidata de interesse, especialmente quando em combinação com outros antígenos (1, 5).

Nos últimos anos tem-se apostado muito nos estudos experimentais. Uma abordagem em estudo consiste na utilização de VLPs contendo a NI, uma vez que é este subtipo o mais presente nos vírus que infetam a população humana, e verificou-se que estes tinham a capacidade de induzir a produção de anticorpos contra a NA, anticorpos estes que conseguiam conferir uma proteção cruzada contra os tipos H5NI e H1NI do vírus influenza (1). Numa outra abordagem, utilizando também VLPs produzidas em baculovírus contendo o subtipo NI da NA, verificou-se que estas VLPs tinham a capacidade de induzir a produção de anticorpos que conferiam proteção não só contra o vírus homólogo H1NI como também contra o vírus heterólogo H3N2, o que pressupõe que estes anticorpos sejam produzidos contra as partes conservadas da proteína, já referidas anteriormente (14). Uma outra metodologia em estudo consiste na utilização de uma combinação das formas multiméricas do subtipo H1NI do vírus, ou seja combinação da HA do tipo H1 e da NA do tipo NI, sendo que os resultados demonstraram que nesta situação a NA exerce um papel importante na proteção que é conferida pela HA, no entanto são necessários mais estudos que permitam elucidar qual é o mecanismo de ação e como decorre todo este processo (5).

3.2.1.4. Hemaglutinina (HA)

Uma vez que o local de clivagem do HA0 é altamente conservado, quer no vírus tipo A quer no tipo B, e tendo um papel essencial na replicação do vírus, este tem sido considerado um alvo atrativo para o desenvolvimento de uma vacina universal. Várias estratégias têm sido estudadas, nomeadamente a utilização de péptidos conjugados que possuem a capacidade de induzirem anticorpos contra o local de clivagem do HA0, sendo possível observar que esta é promissora para o vírus tipo B uma vez que foi possível observar que os anticorpos formados conseguiam proteger os surtos contra as duas linhagens deste vírus, funcionando assim como vacina universal. Em contrapartida, no vírus do tipo A esta

estratégia não mostrou ser tão eficaz uma vez que não promoveu uma proteção completa para os diferentes subtipos nos murganhos que foram vacinados, no entanto observou-se uma diminuição da mortalidade e morbidade (5).

Uma vez que a HA está abundantemente presente na superfície do vírus, esta torna-se num alvo atrativo para o sistema imune do hospedeiro. Assim, denota-se a importância da descoberta de anticorpos que consigam neutralizar o vírus pela ligação a esta proteína. Como a cabeça globular possui também algumas regiões conservadas entre os diferentes subtipos do vírus, e uma vez que os epítomos da cabeça globular são muito mais facilmente acedidos pelos anticorpos, a descoberta de anticorpos contra os seus epítomos é muito mais importante que contra a base no entanto, tem-se apostado essencialmente na indução de anticorpos contra a base da HA, uma vez que esta última possui essencialmente regiões conservadas. Os anticorpos contra a base da HA dos vírus pertencentes ao grupo I podem ser induzidos por uma infeção ou vacinação, no entanto estes mantêm-se subdominantes relativamente aos anticorpos específicos contra a cabeça globular, uma vez que o acesso à base é limitado, como já foi referido anteriormente (5).

Assim, cada vez mais se tem apostado na descoberta de anticorpos e de estratégias que promovam uma melhor resposta imune contra estas regiões conservadas da HA de maneira a conseguir-se uma proteção contra os diferentes grupos e linhagens do vírus, com a finalidade de tornar a tão desejada vacina universal uma realidade.

Felizmente têm sido várias as descobertas, como se pode observar na *tabela 2*. Importa referir que estes anticorpos foram descobertos e obtidos a partir de bases de dados humanas, no entanto foram testadas em modelos animais.

Tabela 2 – Adaptada da publicação “*Options and Obstacles for Designing a Universal Influenza Vaccine*” (6)

| Anticorpo Monoclonal | Local de Ligação | Especificidade de Proteção | | |
|----------------------|------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|
| | | Vírus Influenza A | | Vírus Influenza B |
| | | Grupo 1 | Grupo 2 | |
| A06 | Stalk | H1, H5 | NA ^b | NT ^c |
| CR6261 | Stalk | H1, H2, H5, H6, H8, H9 | NA | NT |
| F10 | Stalk | H1, H2, H5, H6, H8, H9 | NA | NT |
| CR8020 | Stalk | NA | H3, H7 | NT |
| CR8043 | Stalk | NT | H3, H7, H10 | NT |
| FI6v3 | Stalk | H1, H5 | H3, H7 | NT |
| CR9114 | Stalk | H1 | H3 | Yam, Vic |
| CR8033 | Head | NT | NT | Yam, Vic |
| CR8071 | Head | NT | NT | Yam, Vic |
| CH65 | Head | H1 | NT | NT |
| 5J8 | Head | H1 | NT | NT |
| C05 | Head | H1, H2, H9, H12 | H3 | NT |

Ao analisar a *tabela 2* podemos observar que existe uma grande variedade de anticorpos monoclonais contra a HA, anticorpos estes que foram identificados a partir de humanos, no entanto muitos deles apenas são eficazes contra um dado grupo específico do vírus, não conferindo assim uma proteção geral contra os diferentes subtipos. Exemplo destes anticorpos são o A06, CR6261e F10 que são anticorpos contra a base da HA e que mostraram ter atividade neutralizante apenas para o grupo 1 do vírus influenza do tipo A, o CR8020 e o CR8043 que mostraram ter atividade neutralizante apenas para o grupo 2 do vírus influenza A e ainda o CH65 e o 5J8 que apesar de serem direcionados para a cabeça globular mostraram ter atividade neutralizante apenas para o subtipo H1 do vírus influenza A. Para além destes, temos ainda o exemplo do CR8033 e do CR8071, que mostraram ser eficazes apenas para o vírus influenza do tipo B.

É de salientar no entanto que foram também identificados anticorpos monoclonais com atividade neutralizante quer para o grupo 1 quer para o grupo 2 do vírus influenza do tipo A. Esses anticorpos, o F16v3 e o C05 (o primeiro direcionado para a base da HA e o segundo para a cabeça globular), demonstraram ser efetivos contra os subtipos que atualmente estão mais presentes na população humana, nomeadamente o H1 e o H3, e contra os que aparecem esporadicamente, nomeadamente o H5, H7 e H9, no entanto estes possuem a desvantagem de ainda não terem sido testados para verificar se possuem ou não a capacidade de neutralizar o vírus do tipo B. Para contornar este problema, um outro anticorpo foi identificado, o CR9114. Este último mostrou ser eficaz não só a neutralizar o vírus influenza tipo A, como também o vírus influenza tipo B (6).

Com todos estes conhecimentos adquiridos, cada vez mais se acredita na formulação de uma vacina universal que consiga induzir uma combinação de anticorpos neutralizantes contra a base da HA, uma vez que esta possui maioritariamente regiões conservadas ao contrário da cabeça globular (nesta as regiões variáveis tendem a ser imunodominantes), e que consiga efetivamente conferir proteção contra todos os subtipos do vírus influenza.

Com a finalidade de induzir a produção de anticorpos que tenham a capacidade de reconhecer os epítomos conservados da base da HA, várias estratégias de vacinação têm sido estudadas, nomeadamente a utilização de uma HA truncada, onde lhe é removida a cabeça globular de maneira a que a base se mantenha na sua forma íntegra. Nesta experiência os murganhos primeiro foram vacinados com um fragmento de ADN que codifica a HA truncada, sendo depois vacinados com VLPs que contêm a proteína HA truncada. Os resultados desta experiência foram promissores, uma vez que se verificou que esta vacinação induzia uma produção de anticorpos com uma reatividade mais abrangente comparativamente ao uso da HA na sua totalidade. Uma outra estratégia em estudo consiste

em repetidas vacinações com uma molécula de HA quimérica que contém a mesma base no entanto vai diferindo na sua cabeça globular. Observou-se que a resposta dos anticorpos produzidos contra a base da HA ia melhorando a cada vacinação enquanto a resposta contra a cabeça globular era sempre uma resposta primária (5). É de realçar no entanto que, apesar de os resultados destas estratégias serem promissores, são necessários mais estudos que permitam elucidar o mecanismo e quais os anticorpos que de facto são produzidos e também maneiras de tornar estes anticorpos mais eficazes na proteção contra os diferentes subtipos do vírus.

3.2.2. Estudos clínicos

Uma vez que os resultados dos ensaios pré-clínicos têm sido muito favoráveis, vários estudos já se encontram neste momento em estudos clínicos, com a finalidade de verificar na prática se os resultados se repetem aquando a sua experimentação em humanos.

De entre os diferentes estudos decidi abordar apenas aqueles que na minha opinião são mais promissores e aqueles que se encontram em fases mais avançadas.

Importa referir ainda que, apesar de todos os avanços e resultados positivos com a NA nos estudos pré-clínicos, não existem ainda reportados ensaios clínicos utilizando esta proteína isolada. Com base no site *ClinicalTrials.gov*, existiram alguns estudos, no entanto estes foram removidos antes da sua inscrição.

É de realçar também que existem estudos que parecem ser muito promissores, alguns deles utilizando a HA, no entanto, os seus resultados ainda não foram publicados. Por outro lado, após a análise dos resultados de alguns estudos conclui-se que são necessários mais estudos, de maneira a que se compreenda melhor qual é o mecanismo de ação envolvido na resposta imune e ainda tentar encontrar estratégias que permitam melhorar a resposta imune de maneira a garantir a segurança e uma proteção eficaz e duradoura.

3.2.2.1. ACAM-FLU-A

Neste estudo, conduzido pela Sanofi Pasteur, foi testada a segurança e a eficácia de uma vacina recombinante, a ACAM-FLU-A, num estudo de fase I (15). Nesta vacina o core do vírus da Hepatite B (HBc) foi utilizado com o objetivo de facilitar a apresentação da M2e às células do sistema imunológico. De maneira a conseguir uma maior exposição da M2e aos anticorpos, o cHB e a M2e foram apresentados como proteínas de fusão, provenientes da *Escherichia coli*, e posteriormente criaram-se as condições ideais para que estas se transformassem numa VLP, uma vez que se observou que esta adquiria uma conformação na qual o eM2 era expresso à sua superfície, em grande número, tornando-o assim mais exposta ao sistema imune, aumentando assim a sua imunogenicidade. Os resultados deste

estudo permitiram demonstrar que esta vacina é bem tolerada, uma vez que não apresentou grandes efeitos adversos, e que promove uma proteção satisfatória contra o vírus (16, 13). Observou-se ainda que na sua forma purificada, a proteção conferida por esta VLP era dependente das células natural killer (NK), que fazem parte da primeira linha de defesa do nosso organismo (3). Estes resultados permitiram inferir que esta estratégia é promissora, no entanto outros estudos serão necessários para consolidar as observações reportadas.

3.2.2.2. VAXI02 (STF2.4 x M2e)

Num outro estudo de fase I e fase II, conduzido pela VaxInnate Corp., foi testada uma outra vacina, a VAXI02 (STF2.4 x M2e). Esta vacina consiste numa proteína de fusão recombinante que resulta da fusão entre a flagelina do tipo 2 da *Salmonella typhimurium* (STF2 ou fljB), um ligando dos recetores Toll-like 5 (TLR5), e a proteína M2 na sua porção terminal. A flagelina foi utilizada neste estudo uma vez que esta consegue ligar-se aos TLR5 que estão presentes na superfície das células imunitárias dendríticas dos humanos, conseguindo ativar deste modo a imunidade inata, o que permitirá assim a esta vacina induzir uma resposta imune significativa. Os resultados destes estudos permitiram concluir que esta vacina é segura e bem tolerada e que tem a capacidade de induzir uma boa resposta imunológica em humanos (13).

3.2.2.3. Vacina contra o vírus Ankara modificada (MVA)

Recentemente foram realizados ensaios clínicos de fase I e II utilizando na composição da vacina o MVA, de maneira a expressar a nucleoproteína e a proteína da matriz M1, que também é altamente conservada (estima-se que a diferença máxima na cadeia de aminoácidos seja inferior a 5 % entre os diferentes tipos do vírus). Esta vacina foi desenvolvida através da junção da sequência nucleotídica da NP e da M1, na sua forma completa, utilizando uma sequência de ligação com 7 aminoácidos, sendo depois este fragmento inserido no material genético da vacina referida (17). Os resultados dos estudos utilizando a MVA-NP+M1 permitiram demonstrar que esta vacina será segura, a menos que sejam utilizadas doses muito elevadas, e que poderá ser efetiva na prevenção das infeções pelo vírus influenza nos humanos, uma vez que se observou uma redução de 60 % de casos confirmados de infeção pelo vírus influenza nos voluntários que foram submetidas a uma única dose de vacina. No entanto, é de salientar que o pequeno número de intervenientes no ensaio, 11 vacinados e 11 controlos, não permite afirmar que a vacina seja garantidamente eficaz, necessitando assim de mais estudos onde sejam incluídos um maior número de participantes (1, 14).

Esta proteína foi testada num outro estudo de fase I, em combinação com a HA e com a MI (18), sendo este apresentado posteriormente neste trabalho, no capítulo da hemaglutinina.

3.2.2.4. Multimeric-001

Num outro estudo de fase I, uma nova vacina, a Multimeric-001, foi testada a nível da sua segurança e da sua tolerabilidade e ainda a nível da sua capacidade em induzir uma resposta imune aceitável. Esta vacina é constituída pelos epítomos lineares conservados da HA, da NP e da MI dos vírus tipo A e tipo B que são apresentados na sua forma final como um único poliepítomo recombinante. Neste estudo foram avaliadas 60 voluntários saudáveis, que foram divididos em diferentes grupos (1. grupo de teste sem adjuvante – sem Montanide ISA 51 VG, 2. grupo de teste com adjuvante – com Montanide ISA 51 VG e 3. grupo controlo). Os resultados deste estudo permitiram concluir que esta vacina é segura e bem tolerada nos diferentes grupos em estudo. Relativamente à proteção conferida verificou-se que no grupo onde foi utilizado o adjuvante houve uma melhor resposta imune quer celular quer humoral, quando comparada à resposta obtida no outro grupo experimental. Foi ainda observada uma proteção contra diferentes subtipos do vírus em ambos os grupos experimentais (18). Assim, é possível concluir que esta vacina tem um bom potencial para desempenhar o papel de vacina universal. No entanto, uma vez que foram avaliados um pequeno grupo de participantes, é necessário alargar este estudo a um número maior de participantes de forma a verificar se os resultados positivos se repetem.

4. DISCUSSÃO / CONCLUSÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento da vacina universal para o vírus influenza tem sido uma das grandes metas a atingir, uma vez que representa um grande impacto para a saúde pública. A vacina universal ideal terá a capacidade de conferir proteção contra todos os subtipos do vírus influenza do tipo A e ainda contra as duas linhagens do tipo B. Uma vez que este vírus tem a capacidade de sofrer constantes alterações a proteção torna-se difícil no entanto, ao estudar diferentes abordagens foi possível observar que esta é possível uma vez que os resultados obtidos foram promissores. É de salientar que apesar de todos os avanços e progressos que se têm verificado ultimamente, ainda não existe nenhuma vacina comercializada que confira uma proteção eficaz e duradoura contra um amplo espectro dos diferentes subtipos do vírus no entanto, alguns investigadores estimam que possivelmente esta estará no mercado daqui a poucos anos (1).

Das diferentes estratégias que foram apresentadas neste trabalho na sua grande maioria todas elas parecem ser muito plausíveis, uma vez que apresentam bons resultados. Na minha

opinião, apesar de estas estratégias ainda não possuírem muitos estudos e consequentemente resultados, a mais promissora será a utilização de VLPs com proteínas conservadas, nomeadamente a M2e e a base da HA. Apesar de estas proteínas conservadas se mostrarem efetivas quando utilizadas isoladamente, na sua forma original, sem ajuda de adjuvantes, tornam-se pouco imunogénicas e difíceis de alcançar pelos anticorpos formados no decurso da imunização, que desempenham aqui um papel essencial uma vez que são responsáveis por neutralizar o vírus e impedir assim que este se replique e se propague pelas restantes células do hospedeiro. Assim, com o auxílio das VLPs e de outros adjuvantes que sejam necessários, estas proteínas tornam-se ainda mais efetivas pois ficam mais estáveis, uma vez que estarão à superfície da VLP, e para além desta situação tem ainda a vantagem de assim se tornarem muito mais imunogénicas, facilitando deste modo a resposta imune. Uma outra vantagem observada a nível experimental e que trará grandes avanços caso seja reportada também nos humanos é o facto de a proteção que é conseguida se verificar também nos murganhos mais velhos, o que permitirá garantir a proteção de um dos grupos de alto risco, a população idosa.

Por fim importa realçar que ainda são necessários vários estudos, quer pré-clínicos quer clínicos, com o objetivo de perceber melhor qual é o mecanismo de ação e qual o procedimento que está envolvido na indução da imunidade e ainda para demonstrar a eficácia e a segurança da vacina nos diferentes grupos populacionais. Para além desta situação, e até que não se consiga a formulação da vacina universal, é necessário investir e reformular o processo de produção das vacinas atualmente existentes no mercado de maneira a que estas possam ser adquiridas mais rapidamente de maneira a salvaguardar situações pandémicas que possam surgir.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Kesik-brodacka, M., & Plucienniczak, G. (2014). **A universal flu vaccine**, 61(3).
- (2) World Health Organization. **Influenza (seasonal). Fact sheet N° 211**, Março 2014. [Acedido a 28 de Março de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
- (3) ZHANG, H., WANG, L., COMPANS, R. W., & WANG, B.-Z. (2014). **Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon**. *Viruses*, 6(5), 1974-91.
- (4) SCHWARTZMAN, L. M., CATHCART, A.L., PUJANAUSKI, L.M., QI, L., KASH, J. C., & TAUBENBERGER, J. K. (2015). **Is It Possible? A Different Approach to Creating a Universal Influenza Vaccine**. *mBio*, 6(4).
- (5) WIERSMA, L., RIMMELZWAAN, G., & DE VRIES, R. (2015). **Developing Universal Influenza Vaccines: Hitting the Nail, Not Justo in the Head**. *Vaccines*, 3(2), 239-262.
- (6) JANG, Y.H., & SEONG, B.L. (2014). **Options and obstacles for designing a universal influenza vaccine**. *Viruses*, 6(8), 3159-80.
- (7) World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season**. [Acedido a 04 de Julho de 2016]. Disponível na Internet: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201502_recommendation.pdf.
- (8) World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season**. [Acedido a 04 de Julho de 2016]. Disponível na Internet: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201602_recommendation.pdf.
- (9) Wu F, Yuan XY, Li J, Chen YH (2009). **The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine**. *Vaccine* 27: 4320–4324
- (10) Tompkins SM, Zhao ZS, Lo CY, Mispion JA, Liu T, Ye Z, Hogan RJ, Wu Z, Benton KA, Tumpey TM, Epstein SL (2007). **Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1**. *Emerg Infect Dis* 13: 426–435
- (11) Mozdzanowska, K., Feng, J., Eid, M., Kragol, G., Cudic, M., Otvos, L. Jr., Gerhard, W. (2003). **Induction of influenza type a virus-specific resistance by**

- immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2.** *Vaccine* 2003, 21, 2616–2626
- (12) Wang, L., Wang, Y.C., Feng, H., Ahmed, T., Compans, R.W., Wang, B.Z. (2013). **Virus-like particles containing the tetrameric ectodomain of influenza matrix protein 2 and flagellin induce heterosubtypic protection in mice.** *BioMed Res. Inter.* 2013, 686549
- (13) ZHENG, M., LUO, J., & CHEN, Z. (2014). **Development of universal influenza vaccines based on influenza virus M and NP genes.** *Infection*, 42(2), 251-62.
- (14) SUBBARAO, K., MATSUOKA, Y. (2014). **The prospects and challenges of universal vaccines for influenza.** 21(7), 350-358.
- (15) LEE, Y., KIM, K., KO, E., LEE, Y., KIM, M., KWON, Y., TANG, Y., CHO, M., LEE, Y., KANG, S. (2014). **New vaccines against influenza virus.** *Clinical and experimental vaccine research.* 3, 12-28.
- (16) ClinicalTrials.gov. [Acedido a 11 de Junho de 2016]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00819013?term=ACAM+FLU+VACCINE&rank=1>.
- (17) Berthoud, T. K., Hamill, M., Lillie, P. J., Hwenda, L., Collins, K. a, Ewer, K. J., ... Gilbert, S. C. (2011). **Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA-NP+MI.** *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America.* 52(1), 1–7
- (18) Atsmon, J., Kate-Ilovitz, E., Shaikevich, D., Singer, Y., Volokhov, I., Haim, K. Y., & Ben-Yedidia, T. (2012). **Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine.** *Journal of Clinical Immunology*, 32(3), 595–603